



HAL
open science

Modification des Propriétés Physico-Chimiques des Carraghénanes par la Purification et Caractérisation de Carraghénane-Sulfatases

Préchoux Aurélie

► **To cite this version:**

Préchoux Aurélie. Modification des Propriétés Physico-Chimiques des Carraghénanes par la Purification et Caractérisation de Carraghénane-Sulfatases. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Pierre et Marie Curie - UPMC, 2012. Français. NNT: . tel-01301274

HAL Id: tel-01301274

<https://theses.hal.science/tel-01301274>

Submitted on 12 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : Biochimie

(Ecole doctorale IViv interdisciplinaire pour le vivant)

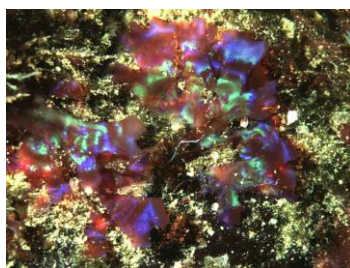
Présentée par

Melle Aurélie PRECHOUX

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Modification des propriétés physico-chimiques
des carraghénanes par la purification et caractérisation
de carraghénane-sulfatases**



Soutenue le 16 Novembre 2012

Composition du Jury

| | | |
|---------------------|----------------------|--------------------|
| M. Germain TRUGNAN | UPMC (Paris) | Président du jury |
| Mme. Estelle BONNIN | INRA (Nantes) | Examinatrice |
| M. Olivier BERTEAU | INRA (Jouy-en-Josas) | Examineur |
| M. Charles TELLIER | FRE-CNRS (Nantes) | Rapporteur |
| M. Vincent BULONE | KTH (Suède) | Rapporteur |
| M. William HELBERT | CNRS (Grenoble) | Directeur de thèse |

*« Les seules choses dont on est certain de manquer
sont celles que l'on a pas tentées... »*

CE QU'IL FAUT POUR
BIEN REUSSIR SA
THÈSE



Dessins : N. Macaisne

REMERCIEMENTS

Itinéraire d'une étoile... de mer !

Prélude

Quand arrive l'heure de l'écriture des remerciements, on sait que la page est sur le point de se tourner... Pour la danseuse, nous sommes à la veille du spectacle que l'on a mis 3 ans à préparer. On attend l'ouverture du rideau et que retentissent les premières notes de musique... A l'aube de cet instant, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à toutes celles et ceux qui ont partagé, d'une quelconque manière, ces 3 années d'entraînement à mes côtés, et plus généralement ces 5 dernières années passées à la Station Biologique de Roscoff...

Avant toute chose, je remercie l'école doctorale IViv de Paris et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour l'octroi de cette bourse de thèse, sans laquelle je n'aurais pu réaliser ce travail.

D'une bretonne à un breton, (et même entre bigoudens !) merci à Bernard Kloareg, Directeur de la Station Biologique de Roscoff, de m'avoir permis sans le savoir, de réaliser ma thèse chez moi, sur les côtes bretonnes...

Je tiens à remercier les membres du Jury qui ont accepté de lire ces quelques lignes et de juger ce travail de thèse. Un grand merci au Pr Germain Trugnan, Directeur de l'école doctorale IViv, pour l'accompagnement et le soutien reçus malgré la distance géographique. Merci aux examinateurs, le Dr Estelle Bonnin (ma tutrice au cours de ces 3 années) et le Dr Olivier Berteau, et aux rapporteurs, le Dr Vincent Bulone et le Pr Charles Tellier pour avoir accordé un peu de leur précieux temps à la lecture de ce manuscrit.

L'origine de ce ballet réside dans l'opportunité offerte par le Dr William Helbert, qui m'a permis de me lancer dans cette aventure en m'initiant au monde des carraghénanes, et en m'accordant sa confiance à travers le projet CRAZY Polysaccharides. Merci donc à ce maître de ballet d'avoir guidé mes pas, rythmé ma musique, pour tenter d'effectuer, le jour du spectacle, la plus belle des chorégraphies... Même si les entraînements sont parfois douloureux, je n'oublie pas que la fierté d'un travail s'acquiert aussi par les épreuves surmontées, créant un équilibre au fil du temps...

J'exprime ma profonde gratitude envers Catherine Boyen et Mirjam Czjzek, de m'avoir offert les 2 mois de prolongation indispensables pour finir ces travaux avec un maximum de sérénité. Merci de votre soutien sur les derniers mois difficiles. Il suffit parfois de quelques mots pour retrouver la confiance et le courage de continuer. Vous avez su les trouver... Du fond du cœur, Merci à vous...

A l'Opéra, les petits rats ont une étoile comme « petite mère ». J'ai trouvé la mienne en la personne de Sabine Genicot-Joncour. Par où commencer... ? Tu as joué tous les rôles : la collègue, la maman, l'amie... Entre confidences et rigolades, que de temps passé toutes les deux qui me restera comme un souvenir précieux. A défaut d'opéra, le petit rat est devenu celui de laboratoire... et c'est beaucoup grâce toi !

Un spectacle ne s'effectue pas seul. Aussi je tiens à remercier mon corps de ballet (exclusivement féminin!) issu de l'équipe « Structure des Polysaccharides Marins » : Maude, que dire sinon : quel vide quand tu es partie... ! Gaëlle, au-delà de l'amie, une leçon de vie..., Pi, un optimisme à toutes épreuves ; et Jessica, pour nos échanges de cette dernière année. Je n'oublie pas les intermittentes du spectacle : Sayani, Andrea, et Marianne... Pour tous les moments partagés, la vie du labo, les échanges, les conseils... un grand Merci.

J'adresse un chaleureux remerciement aux personnes qui ont partagé ma loge et qui ont dû me supporter au quotidien : Simon, Cécile, Robert et Alok... J'ai apprécié nos échanges et je vous remercie du réconfort apporté quand j'en avais besoin. Alok, my friend, I'm pleased to meet you. You brought me a lot. I hope we will be able to keep contact despite the distance between France and India. I will not forget you... especially when I would play ping-pong or eat Samoussas!

La danseuse est réservée de nature... Aussi, il est important pour moi de remercier toutes les personnes qui ont franchi le pas de venir vers moi, ou m'ont laissé la possibilité de leur parler ! Bon, plus simplement, toute la troupe de l'UMR 7139, avec laquelle j'ai pu interagir ou discuter. Et particulièrement : Murielle (Merci pour les derniers coups de mains !), JB (Le « sauveteur » de mon Sommaire !), Aurore, Alex, Patricia, Rémi, Martina, Nicolas, Ludo, Laurence D., Fiona, Bernard B., Stéphane, Jonas, Liz, Richard, François, Sabine C., Tristan, Gurvan, Thierry, Agnès, Lionel, Delphine, Sylvie, Fred, Catherine L., Bénédicte, Olivier, Mark, Susana, Sophia, Laurence MC, Zofia, Sophie. Et dans un registre moins scientifique : Marie-Noëlle, Martine, Maryvonne et Brigitte.

Une pensée spéciale pour Edyta, mon amie, qui vient de soutenir sa thèse. Grâce à toi, les « voyages » pour les rentrées de l'école doctorale furent de vraies leçons d'anglais ! Et pourquoi pas te rejoindre aux USA pour un post-doc...? ;-)

Un grand merci aussi aux différentes collaborations sur ce projet de thèse : D'abord, le Service RMN de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest, et plus particulièrement Nelly Kervarec et Stéphane Cerantola. Merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions et sollicitations. Que d'échantillons que j'aurais fait voyager entre Brest et Roscoff ! Je remercie également la Plateforme BIBS de l'INRA de Nantes, pour la réalisation des analyses en spectrométrie de masse effectuées au cours de cette thèse. Enfin, une pensée pour le Projet Européen PolymodE pour les contributions apportées : conseils, workshop... et voyages !

Enfin, l'Opéra a aussi ses fantômes... Alors, à celui qui me hante, mais qui, par l'épreuve qu'il m'impose, me rend plus forte, jour après jour...

Et du plus profond de mon cœur, je remercie, parmi ces personnes, toutes celles et ceux qui pour m'encourager, par un mot, un geste ou un regard m'ont offert, pendant de courts instants, l'impression d'être une étoile...

Un océan familial comme bulle d'oxygène...

Au cours de cette traversée, le bain familial est indispensable. Aussi je tiens à remercier mon océan personnel...

Du plus profond de mon cœur, un éternel Merci à mes parents... de leur soutien inconditionnel ces jours de grisaille où l'on se laisse dériver... mais aussi pour les instants de bonheur partagés les jours de grand soleil. Pour ces nombreux week-ends de coupure dans notre paradis Elliantais, les pieds dans les bottes et les mains dans la terre, à planter, cueillir et prendre soin des indénombrables fruits et légumes du jardin... Pour ces pauses-café sur la terrasse, ces soirées d'hiver près de la cheminée, Douçka et Darla à nos côtés... Un havre de paix et de réconfort ; une île (pas si déserte... !) pour se ressourcer... Merci Papa d'avoir été cet exemple illustrant qu'il ne faut jamais baisser les bras. Merci Maman, pour ta patience, ton écoute, tes conseils... dont je ne me passerai jamais.

A la fois ma force et ma faiblesse, je tiens à remercier très affectueusement mon banc de... sœurs ! Si semblables et pourtant si différentes... Mes quatre phares m'évitant les écueils... Leurs qualités sont des exemples que j'essaie chaque jour d'appliquer : le courage d'Isa, celle qui nous apprend à relativiser ; le perfectionnisme de Flo, à l'attention débordante ; le côté artistique de Vivi, ma partenaire officielle de Géocaching et de Mario Party ! et la persévérance de Mary, la « A l'aise Breizh » du club... Vivre en tribu

apprends la vie de groupe mais aussi à chercher le détail pour se distinguer des autres. Les filles, votre présence m'est précieuse tant elle m'est nécessaire. Alors, à chacune, un infini Merci d'être là... tout simplement. C'est une grande fierté pour moi que l'édition 2012 de la Fête des Sœurs ait eu lieu à Roscoff...

Parce que l'innocence d'un enfant est l'une des plus belles choses, j'ai une tendre pensée pour mes sept (bientôt huit ?) neveux et nièces avec qui je partage des instants magiques à chaque fois. Alors (par ordre d'arrivée !) Merci à Yann, Mel, Dorian, Lola, Lillo, Pablo et Corentin de me permettre d'être une maman par procuration !

Un grand merci également à mes quatre beaux-frères, Pascal, Laurent, Cyril et Anthony pour les nombreux échanges que nous avons, et les conseils sur la gent masculine... !

Je tiens à remercier chaleureusement Sandra, « mon amie de la danse », qui m'a poussée à réaliser cette thèse. Sans aucun doute, tu es mon modèle de thésarde ! Merci pour toutes les « leçons » que tu me donnes, tant professionnelles que personnelles... Et bien sûr, merci de m'apprendre à sourire quand je danse... !

Sans oublier un énorme Merci à ma meilleure amie Marie. Pour nos vacances au soleil, les plages, les cocktails, les soirées, les randos, les balades, les restos... bref tout ce que l'on fait toutes les deux ! Même le pire ! Pas de doute, c'est avec toi que je fais les plus grosses bêtises mais que de souvenirs !!! Grâce à toi, je sais que l'on peut faire de la piste avec une Fiat Panda, et que l'on peut prendre l'avion après une soirée arrosée... ! Merci de me changer autant les idées !

Enfin, je voudrais remercier tous les autres, famille, amis, (les citer tous serait trop long...), qui ont été là pour m'encourager, me soutenir, ou dont la présence m'a simplement été précieuse...

Merci à tous...

AVANT-PROPOS

Une goutte d'eau dans l'océan...

De tous temps, les hommes se sont intéressés à la mer et à la vie des océans. Fascinés par la *Grande Bleue*, ils y ont découvert des trésors inestimables...

Riche d'une exceptionnelle diversité, la mer constitue l'une des principales sources de substances naturelles bioactives. En effet, l'océan est un formidable réservoir propice à fournir durablement à l'homme de multiples composants à vocations médicales, cosmétiques, nutritionnelles, voire énergétiques. La recherche portée sur ces biotechnologies bleues présente effectivement la capacité de déboucher sur des applications connexes telles que les nanotechnologies, les biomatériaux, la capture du CO₂ ou encore les biocarburants. Ainsi la valorisation de la biomasse marine offre un réel potentiel de recherche pour l'avenir.

A l'aube du troisième millénaire, les algues ne suscitent pas l'intérêt qu'elles méritent dans la société occidentale. En effet, parmi les 25 000 espèces d'algues répertoriées à ce jour, une vingtaine seulement (environ 1/4 d'origine d'eau douce et 3/4 d'origine marine) sont couramment utilisées à travers le monde dans les domaines agroalimentaires, diététiques, thérapeutiques ou cosmétiques. Pourtant les propriétés bénéfiques des algues ne sont plus à prouver. C'est pourquoi, qu'elles soient vertes, brunes, rouges, ou bleues, l'intérêt porté aux algues doit persister pour qu'elles puissent trouver enfin la place essentielle qui leur revient dans notre vie quotidienne. Et puis il y a les algues microscopiques, en suspension dans l'eau, dont on découvre à peine l'énorme potentiel aujourd'hui. Il faut savoir que dans le monde marin, 99 % des organismes sont microscopiques et nous n'en connaissons encore qu'une toute petite partie. Un travail gigantesque attend donc les chercheurs !

La Bretagne dispose de ressources naturelles importantes mais la culture d'algues y reste limitée en tonnage et les quelques 70 PME qui transforment cette biomasse à des fins cosmétiques, alimentaires ou agricoles n'utilisent encore que très peu les outils

biotechnologiques. Seuls un développement de la recherche et la naissance perpétuelle d'innovations dans le domaine des ressources marines peuvent assurer l'avenir industriel de cette filière, qui doit aussi intégrer dans son développement d'importants enjeux environnementaux. Avec la mer d'Iroise comme laboratoire, la Bretagne est à la pointe dans le domaine de la recherche sur les molécules d'origine marine. C'est en effet sur les côtes nord-finistériennes que l'on trouve la plus grande biodiversité marine en Europe. Roscoff se présente donc comme le lieu optimal pour étudier les ressources offertes par les océans.

Ainsi, si ce travail de thèse permet d'apporter une petite contribution à la recherche marine, par quelques nouveautés ou compréhensions (comme l'étude de carraghénane-sulfatases par exemple... !), je serais, dès lors, heureuse et fière de l'avoir réalisée. Ainsi, elle sera MA goutte d'eau dans l'océan...

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

| | |
|--|-----------|
| I - CONTEXTE BIOLOGIQUE : | 11 |
| A. Les algues rouges | 11 |
| <i>A.1 Description des algues rouges</i> | 11 |
| <i>A.2 Diversité des algues rouges carraghénophytes</i> | 13 |
| <i>A.3 Le cycle de reproduction des algues rouges</i> | 15 |
| <i>A.4 Organisation de la paroi des algues rouges</i> | 19 |
| B. Les interactions entre les algues et les bactéries marines | 25 |
| <i>B.1 Interactions algues / bactéries à distance</i> | 25 |
| <i>B.2 Interactions algues / bactéries marines par contact direct</i> | 27 |
| <i>B.3 Bactéries pathogènes</i> | 31 |
| <i>B.4 Rôle des bactéries marines dans le cycle du carbone</i> | 33 |
| II – LES CARRAGHENANES | 35 |
| A. Structures chimiques, classifications et nomenclatures des carraghénanes | 35 |
| <i>A.1 Structure chimique des carraghénanes</i> | 35 |
| <i>A.2 Classifications et nomenclatures</i> | 37 |
| B. Diversité structurale des carraghénanes | 51 |
| <i>B.1 Origines biologiques de la diversité des carraghénanes</i> | 53 |
| <i>B.2 Diversité des espèces d'algues carraghénophytes et cycle de vie</i> | 53 |
| <i>B.3 Localisation des différents carraghénanes dans le thalle</i> | 53 |
| <i>B.4 Influence des conditions environnementales</i> | 55 |
| <i>B.5 Influence des procédés d'extraction des carraghénanes sur leur structure chimique</i> | 55 |
| C. Gélification des carraghénanes | 59 |
| <i>C.1 Conformation des polysaccharides en solution et en gel</i> | 59 |
| <i>C.2 Facteurs d'influence sur la gélification des carraghénanes</i> | 61 |
| <i>C.3 Mécanisme de gélification des carraghénanes</i> | 67 |
| <i>C.4 Propriétés physico-chimiques des carraghénanes</i> | 69 |
| D. Propriétés biologiques et applications industrielles des carraghénanes | 77 |
| <i>D.1 Propriétés biologiques</i> | 77 |

| | |
|--|------------|
| D.2 Signaux de défense et de virulence dans les interactions | 83 |
| <i>plantes / pathogènes</i> | 83 |
| D.3 Applications industrielles des carraghénanes | 87 |
| D.4 Législation et mise en garde | 97 |
| II – LES ENZYMES DE MODIFICATION DES CARRAGHENANES | 101 |
| A. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse | 103 |
| A.1 Les galactosyl-transférases..... | 103 |
| A.2 Les sulfotransférases..... | 105 |
| A.3 Les sulfurylases | 107 |
| B. Les enzymes impliquées dans la biodégradation | 111 |
| B.1 Les carraghénases | 113 |
| B.2 Les sulfatases | 129 |
| IV – LES SULFATASES | 131 |
| A. Importance des molécules sulfatées... .. | 131 |
| B. ...et des sulfatases dans les bactéries marines..... | 133 |
| C. Les enzymes de désulfatation : les Sulfatases..... | 133 |
| D. Classification des sulfatases | 137 |
| D.1 Classifications des sulfatases humaines | 137 |
| D.2 Classification de l'ensemble des sulfatases par famille | 137 |
| E. Les carraghénane-sulfatases..... | 153 |
| E.1 Les carbohydrate-sulfatases | 153 |
| E.2 4S-oligo- <i>K</i> -carraghénane-sulfatase de <i>P. carrageenovora</i> | 155 |
| E.3 4S- <i>I</i> -carraghénane-sulfatase de <i>P. carrageenovora</i> | 155 |
| PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE | 159 |
| RESULTATS..... | 159 |
| CHAPITRE I : RECHERCHE D'ACTIVITÉS CARRAGHÉNANE-SULFATASES | 169 |
| INTRODUCTION..... | 169 |
| RESULTATS | 173 |
| A. Choix des conditions du crible..... | 173 |
| A.1 Choix des différentes bactéries marines | 173 |
| A.2 Inductions de culture des bactéries..... | 173 |
| A.3 Stratégie du criblage..... | 175 |

| | |
|---|------------|
| A.4 Choix des différents carraghénanes..... | 177 |
| B. Mise en évidence des activités sulfatases | 177 |
| B.1 Mesure du sulfate libéré par HPAEC | 177 |
| B.2 Analyses RMN ¹ H du criblage..... | 181 |
| C. Analyse des extraits bactériens de <i>P. atlantica</i>..... | 183 |
| C.1 Activités de désulfatation | 183 |
| C.2 Activités carraghénolytiques..... | 189 |
| DISCUSSION..... | 193 |
| A. Criblage d'activités carraghénane-sulfatases | 193 |
| B. Analyses des extraits bactériens de <i>P. atlantica</i> | 195 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 199 |
| • Support d'étude : <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> | 199 |
| CHAPITRE II : IDENTIFICATION D'UNE 4S-ι-CARRAGHÉNANE-SULFATASE, LA Q15XH3 DE <i>P. ATLANTICA</i>..... | 205 |
| INTRODUCTION..... | 205 |
| RESULTATS | 207 |
| A. Purification et identification d'une 4S-ι-carraghénane-sulfatase issue de <i>P. atlantica</i> ... | 207 |
| B. Etude enzymologique de la sulfatase Q15XH3 native | 209 |
| C. Surexpression de la sulfatase Q15XH3 de <i>P. atlantica</i> | 215 |
| C.1 Expression de la sulfatase Q15XH3 dans <i>E. coli</i> | 215 |
| C.2 Co-expression de la sulfatase Q15XH3 en présence d'enzymes de maturation | 217 |
| D. Détermination du mode d'action de la sulfatase Q15XH3 | 221 |
| D.1 Production des hybrides ι - α -carraghénane | 221 |
| D.2 Dépolymérisation des hybrides ι - α -carraghénanes | 223 |
| D.3 Purification des oligosaccharides hybrides ι - α -carraghénane..... | 225 |
| D.4 Analyses RMN ¹ H des oligosaccharides hybrides ι - α -carraghénane | 227 |
| DISCUSSION..... | 229 |
| A. Identification de la sulfatase Q15XH3 de <i>P. atlantica</i> | 229 |
| B. Mode d'action de la sulfatase Q15XH3 de <i>P. atlantica</i> | 230 |
| C. Intérêt de la sulfatase Q15XH3 de <i>P. atlantica</i> | 235 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 237 |
| ANNEXE CHAPITRE II : PRODUCTION ET CARACTÉRISATION D'OLIGO-α- CARRAGHÉNANES | 239 |

| | |
|--|------------|
| INTRODUCTION | 239 |
| RESULTATS | 240 |
| A. Production des oligo-α-carraghénanes | 241 |
| B. Analyses RMN des oligo-α-carraghénanes | 241 |
| <i>B.1 Analyses par RMN 1D du proton (1H)</i> | 241 |
| <i>B.2 Analyses par RMN 2D</i> | 245 |
| CHAPITRE III : IDENTIFICATION D'UNE 4S-κ-CARRAGHÉNANE-SULFATASE, LA Q15XH1 DE <i>P. ATLANTICA</i> | 251 |
| INTRODUCTION | 251 |
| RESULTATS | 255 |
| A. Purification partielle d'une 4S-κ-carraghénane-sulfatase issue de <i>P. atlantica</i> | 255 |
| B. Etude enzymologique de la sulfatase Q15XH1 native | 259 |
| C. Surexpression de la sulfatase Q15XH1 de <i>P. atlantica</i> | 261 |
| <i>C.1 Expression de la sulfatase Q15XH1 dans <i>E. coli</i></i> | 261 |
| <i>C.2 Optimisations des conditions de cultures dans <i>E. coli</i></i> | 261 |
| <i>C.3 Caractérisation biochimique de la sulfatase Q15XH1 surexprimée</i> | 265 |
| D. Détermination du mode d'action de la sulfatase Q15XH1 | 267 |
| DISCUSSION | 269 |
| <i>A. Identification de la sulfatase Q15XH1 de <i>P. atlantica</i></i> | 269 |
| <i>B. Mode d'action de la sulfatase Q15XH1 de <i>P. atlantica</i></i> | 271 |
| <i>C. Surexpression de la sulfatase Q15XH1 de <i>P. atlantica</i></i> | 273 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 277 |
| CHAPITRE IV : SUREXPRESSION DES SULFATASES Q15XH4 ET Q15XG7 ISSUES DU CLUSTER IMPLIQUÉ DANS LA BIODÉGRADATION DES CARRAGHÉNANES | 283 |
| INTRODUCTION | 283 |
| RESULTATS | 287 |
| A. Surexpression des sulfatases Q15XH4 et Q15XG7 | 287 |
| B. Test d'activité de la sulfatase Q15XH4 | 287 |
| <i>B.1 Recherche des conditions optimales d'expression de Q15XH4</i> | 287 |
| <i>B.2 Caractérisation fonctionnelle de Q15XH4</i> | 291 |
| C. Test d'activité de la sulfatase Q15XG7 | 293 |
| <i>C.1 Recherche des conditions optimales d'expression de Q15XG7</i> | 293 |

| | |
|---|------------|
| C.2 Caractérisation fonctionnelle de Q15XG7 : Une nouvelle 4S-K-carraghénane-sulfatase... | 295 |
| DISCUSSION | 299 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 301 |
| CHAPITRE V : IDENTIFICATION D'UNE ι-CARRAGHÉNASE ET DE SON CLUSTER CHEZ <i>P. ATLANTICA</i> | 305 |
| INTRODUCTION | 305 |
| RESULTATS | 309 |
| A. Mise en évidence d'une ι-carraghénase chez <i>P. atlantica</i> | 309 |
| A.1 Découverte d'une ι -carraghénase chez <i>P. atlantica</i> | 309 |
| A.2 Purification partielle de la ι -carraghénase | 311 |
| A.3 Hypothèses d'identification de la protéine de la ι -carraghénase par analyses en spectrométrie de masse | 313 |
| A.4 Caractérisation biochimique de la ι -carraghénase..... | 313 |
| A.5 Produits de dégradation de la ι -carraghénase..... | 315 |
| B. Identification de la ι-carraghénase de <i>P. atlantica</i> | 317 |
| B.1 Analyse croisée des résultats de spectrométrie de masse avec la base de données CAZY en 2011 | 317 |
| B.2 Alignement des séquences de la ι -carraghénase de <i>P. atlantica</i> avec les autres ι -carraghénases caractérisées | 319 |
| B.3 Cluster de la ι -carraghénase de <i>P. atlantica</i> | 321 |
| C. Surexpression de la sulfatase du cluster de la ι-carraghénase | 321 |
| C.1 Surexpression de la sulfatase Q15XII | 321 |
| C.2 Test d'activité de la sulfatase Q15XII | 323 |
| DISCUSSION | 325 |
| A. Découverte d'une ι -carraghénase chez <i>P. atlantica</i> | 325 |
| B. La sulfatase Q15XII impliquée dans la biodégradation des carraghénanes ? | 331 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 333 |
| CHAPITRE VI : MISE EN ÉVIDENCE D'ENZYMES ORIGINALES CHEZ <i>P. ATLANTICA</i> : UNE α-CARRAGHÉNANE-SULFATASE ET UNE β-CARRAGHÉNASE | 337 |
| INTRODUCTION | 337 |
| RESULTATS | 341 |
| A. Identification d'une 2S-α-carraghénane-sulfatase | 341 |

| | |
|---|------------|
| A.1 Mise en évidence d'une 2S- α -carraghénane-sulfatase | 341 |
| A.2 Purification partielle d'une 2S- α -carraghénane-sulfatase | 341 |
| A.3 Identification probable de la 2S- α -carraghénane-sulfatase..... | 343 |
| A.4 Caractérisation biochimique de la 2S- α -carraghénane-sulfatase | 345 |
| B. Mise en évidence d'une β-carraghénase | 347 |
| B.1 Dégradation de l' α -carraghénane par <i>P. atlantica</i> | 347 |
| B.2 Corrélation des activités de désulfatation et de dégradation de l' α -carraghénane | 349 |
| B.3 Dégradation du polymère de β -carraghénane chimique par le lysat de <i>P. atlantica</i> | 349 |
| DISCUSSION..... | 351 |
| A. Existence d'une 2S- α -carraghénane-sulfatase dans <i>P. atlantica</i> | 351 |
| B. Mise en évidence d'une β -carraghénase dans <i>P. atlantica</i> | 353 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 355 |
| DISCUSSION GENERALE..... | 359 |
| A. Les bactéries marines : une source de sulfatases | 359 |
| B. Les sulfatases à formylglycine :..... | 360 |
| Des enzymes difficiles à surexprimer..... | 360 |
| C. La biodégradation des carraghénanes par la bactérie <i>P. atlantica</i> | 363 |
| D. Une organisation en cluster des enzymes actives sur les carraghénanes | 366 |
| E. <i>P. atlantica</i> : un nouveau modèle de « dégradeur » des carraghénanes ?..... | 367 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 371 |
| A. De la fonction au gène, du gène à la fonction : deux stratégies complémentaires | 371 |
| B. Des sulfatases pour modifier les carraghénanes | 374 |
| C. Encore des structures à modifier... .. | 377 |
| CONDITIONS EXPERIMENTALES..... | 381 |
| A. Sources des carraghénanes | 381 |
| B. Criblage d'activités carraghénane-sulfatases | 382 |
| B.1 Cultures de bactéries marines..... | 382 |
| B.2 Préparation des extraits bactériens | 383 |
| B.3 Mesure de l'activité sulfatase | 383 |
| B.4 Identification de l'activité sulfatase par $^1\text{H-RMN}$ | 384 |
| C. Protocoles de purification des sulfatases de <i>P. atlantica</i> | 385 |

| | |
|---|------------|
| C.1 Purification et caractérisation de la 4S- <i>l</i> -carraghénane-sulfatase | 385 |
| C.2 Purification partielle de la 4S- <i>K</i> -carraghénane-sulfatase | 388 |
| C.3 Purification partielle de la 2S- α -carraghénane-sulfatase | 389 |
| D. Purification partielle de la <i>l</i>-carraghénase de <i>P. atlantica</i> | 390 |
| D.1 Fractionnement de l'enzyme par chromatographie | 390 |
| D.2. Mesure de l'activité <i>l</i> -carraghénase | 391 |
| E. Détermination du mode d'action de la 4S-<i>l</i>-carraghénane-sulfatase Q15XH3 de <i>P. atlantica</i> | 392 |
| E.1. Production des hybrides <i>l</i> -/ α -carraghénanes | 392 |
| E.2. Hydrolyse enzymatique des hybrides | 393 |
| E.3. Analyse des hydrolysats par chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC)..... | 393 |
| E.4. Purification des oligo-carraghénanes par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) .. | 394 |
| E.5. Analyse des oligo-carraghénanes par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC) .. | 394 |
| E.6. Analyse des oligo-carraghénanes par ¹ H-RMN 1D..... | 395 |
| F. Surexpression des sulfatases du cluster de gènes..... | 395 |
| F.1. Surexpression et clonage des gènes (<i>réalisé par S. Genicot-Joncour</i>) | 395 |
| F.2. Co-expression des sulfatases avec les enzymes de maturation | 396 |
| F.3. Cultures bactériennes de <i>E. coli</i> | 396 |
| F.4. Préparations des extraits bactériens..... | 398 |
| F.5. Test d'activité sulfatase sur substrat synthétique (MUF-S)..... | 398 |
| F.6. Test d'activité sulfatase sur carraghénane par chromatographie | 399 |
| F.7. Purification des enzymes recombinantes | 399 |
| G. Caractérisation des oligo-α-carraghénanes purs | 401 |
| G.1. Production des oligo- α -carraghénanes | 401 |
| G.2. Analyses RMN 1D et 2D des oligo- α -carraghénanes | 401 |
| ANNEXE CONDITIONS EXPÉRIMENTALES..... | 403 |
| La RMN des carraghénanes | 403 |
| 1. Importance des carbones/protons anomériques dans les structures de carraghénanes | 405 |
| 2. Cas des oligo-carraghénanes | 407 |
| 3. Identification et positionnement des substituants..... | 407 |
| 4. Détermination du type de liaison..... | 409 |

PUBLICATIONS ET BREVETS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

INTRODUCTION GÉNÉRALE

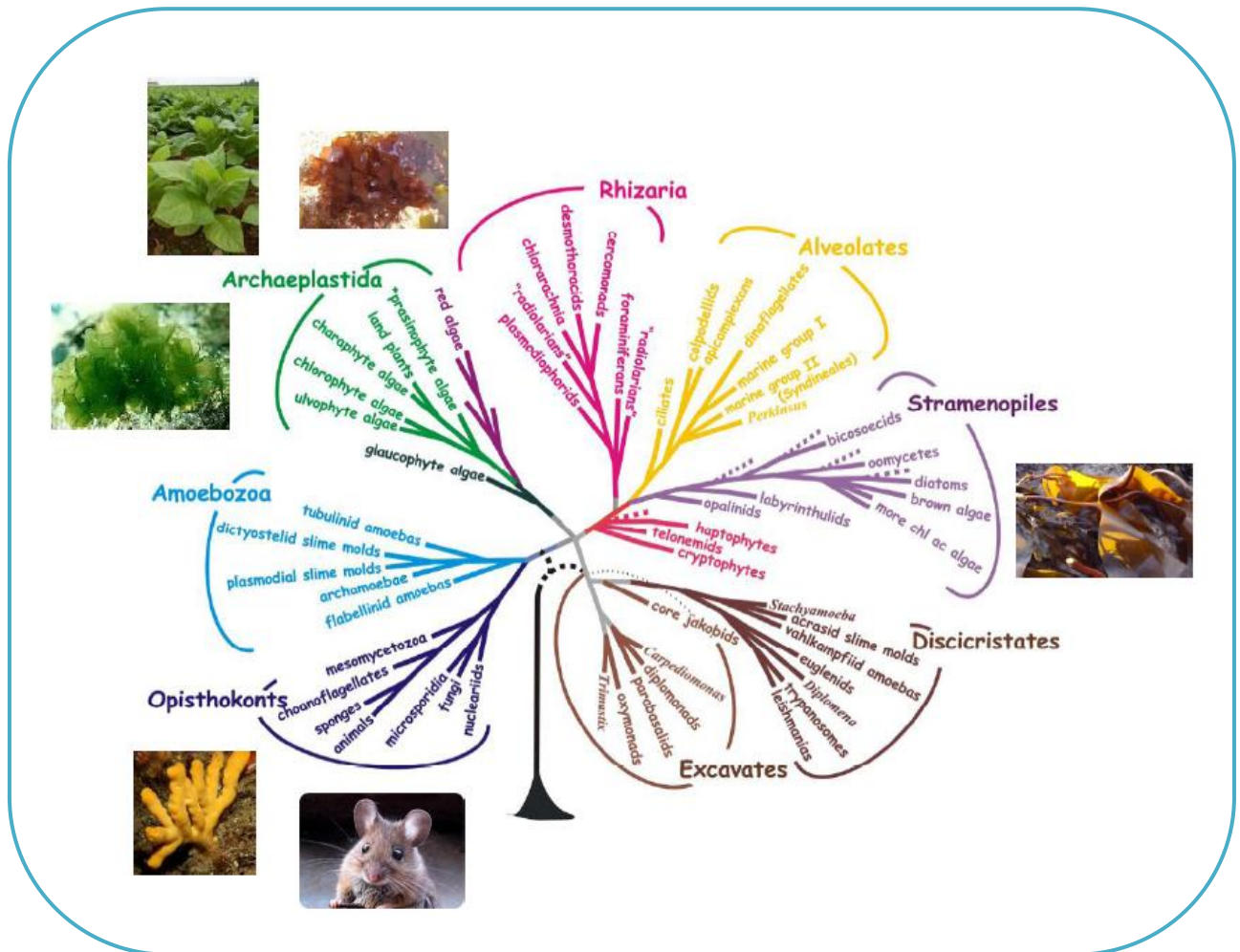


Figure IG-1 : Position des macro-algues et des plantes supérieures dans l’arbre phylogénétique des eucaryotes (d’après Baldauf, 2008).

I - CONTEXTE BIOLOGIQUE :

LES ALGUES ROUGES DANS LE MILIEU MARIN

Les algues sont généralement définies comme des organismes aquatiques photosynthétiques producteurs d'oxygène. Cependant, il existe de nombreuses exceptions complexifiant cette terminologie. En effet, les algues bleues par exemple, aujourd'hui appelées cyanobactéries, sont des organismes procaryotes. Les macro-algues présentent une grande diversité morphologique allant de la simple cellule isolée microscopique à l'algue macroscopique. Elles sont constituées d'un appareil végétatif non différencié appelé thalle, qui ne possède jamais la différenciation en tiges, feuilles et racines telle que chez les végétaux supérieurs. Toutes les macro-algues présentent une organisation multicellulaire, alors qu'elles appartiennent à des lignées phylogénétiques très différentes. Les algues rouges (*Rhodophyta*) font partie, comme les algues vertes (*Chlorophyta*) du phylum des Archaeplastida qui contient également les plantes supérieures (*Streptophyta*) (Figure IG-1). Les algues brunes (*Phaeophyta*) appartiennent quant à elles au phylum des Straménophiles, qui du point de vue de l'évolution est aussi distant des Archaeplastida que des animaux (Baldauf, 2008). Les études portées sur la composition des parois d'algues, leur synthèse et leur recyclage par les bactéries marines, offrent de nouvelles données permettant d'aider à comprendre l'adaptation de la paroi végétale au cours de l'évolution.

A. Les algues rouges

Les algues rouges feront ici l'objet d'une attention particulière puisque notre étude a porté sur les carraghénanes, des polysaccharides issus d'algues rouges marines.

A.1 Description des algues rouges

Les algues rouges, ou Rhodophytes, proviennent le plus souvent de la mer, bien que certaines espèces se soient adaptées à la vie en eau douce. La majorité des algues marines sont

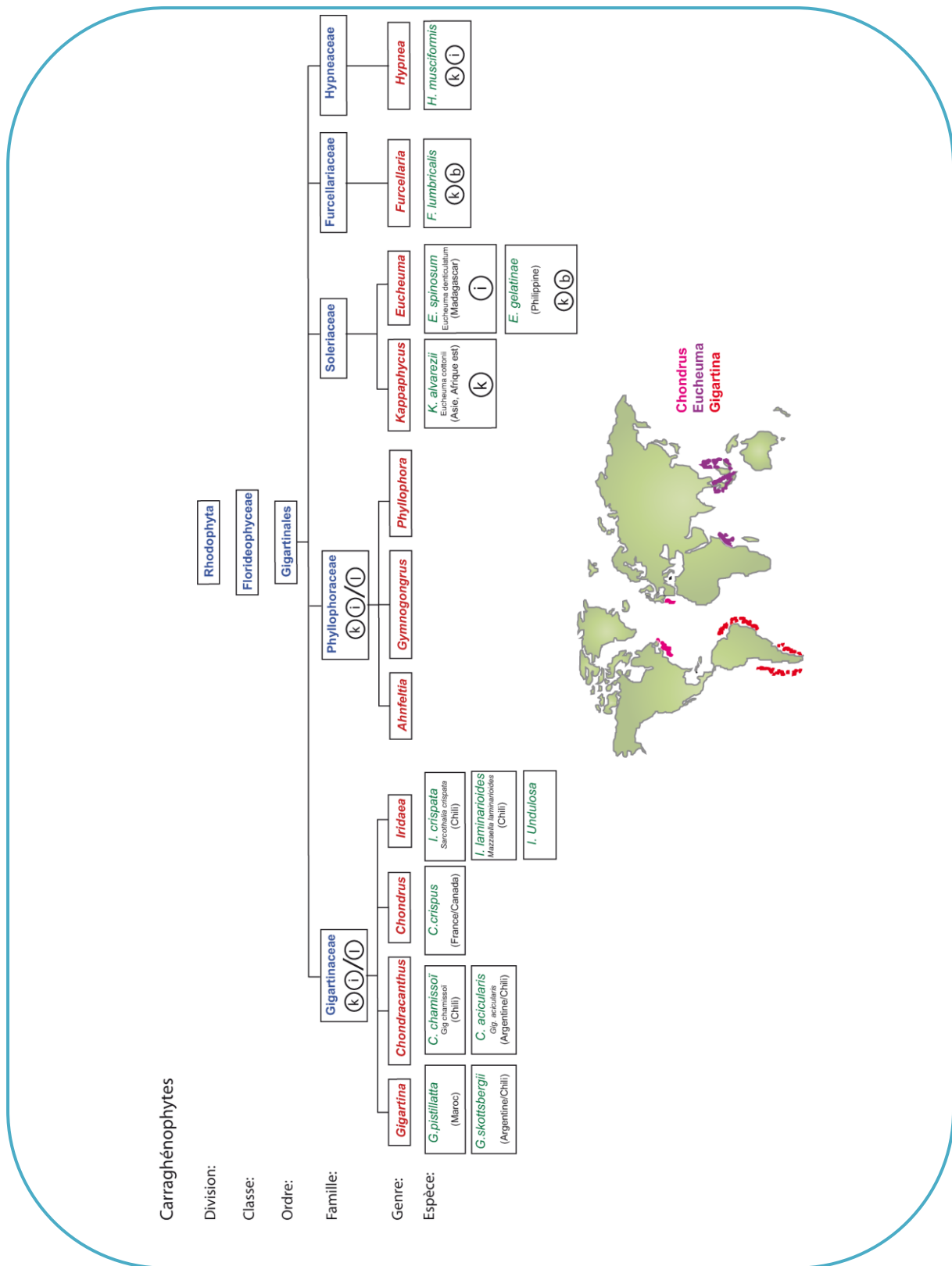


Figure IG-2 : Exemples d'espèces d'algues carraghénophytes (Adapté de [Therkelsen, 1993](#))

La composition des carraghénanes extraits de ces algues est indiquée ainsi que les lieux de culture de certaines espèces. La composition des carraghénanes extraits des algues des familles Gigartinaceae et Phylloporaceae varie suivant les formes gamétophytes / tétrasporophytes (κ-/ι- ou λ-).

des algues rouges : il y a plus de Rhodophycées, environ 4000 espèces (Woelkerling, 1990), que tous les autres groupes d'algues marines combinés. Même si on les trouve sous toutes les latitudes, les algues rouges sont plus abondantes entre l'équateur et les mers froides. Leur taille diffère d'ailleurs en fonction de la zone géographique (Lee, 2009). Les espèces les plus grandes ou les plus charnues, sont trouvées dans les régions tempérées, tandis que dans les mers tropicales, les Rhodophycées sont généralement petites et filamenteuses. Il existe des micro-algues rouges, néanmoins elles sont rarement unicellulaires. Les algues rouges sont aussi capables de vivre à de plus grandes profondeurs dans l'océan (jusqu'à 200 m) que les membres des autres classes d'algues (Lee, 2009). Cette capacité est due à la fonction de certains pigments au cours de la photosynthèse. Les algues rouges contiennent en effet de la chlorophylle *a*, et des caroténoïdes rencontrés fréquemment chez d'autres végétaux, mais leur originalité consiste dans la présence de phycobilisomes comprenant les phycobiliprotéines : allophycocyanine (bleu), phycocyanine (bleu) et phycoérythrine responsable de la couleur rouge. Ce sont ces phycobilisomes qui permettent aux algues rouges de vivre à de grandes profondeurs (Lee, 2009).

A.2 Diversité des algues rouges carraghénophytes

Les carraghénanes, qui font l'objet de cette étude, sont des polysaccharides synthétisés par les algues rouges appartenant à l'ordre des Gigartinales, issu de la classe des Florideophyceae. Parmi ces dernières, les algues des familles Gigartinaceae et Solieriaceae demeurent les plus exploitées pour l'extraction des carraghénanes (description et définition développées au § II). De manière plus anecdotique, des Furcellariaceae, des Phylloporaceae ou des Hypneaceae sont également exploitées industriellement (Figure IG-2).

Les espèces carraghénophytes sauvages sont très diverses, et nombre d'entre elles sont récoltées pour l'extraction des carraghénanes. Ces espèces font essentiellement partie de la famille des Gigartinaceae, des genres *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea* et *Chondracanthus*. L'algue *Chondrus crispus* par exemple, provenant des côtes de l'Atlantique Nord (Canada et France), était la principale espèce exploitée jusque dans les années 1970. Elle l'est encore aujourd'hui, mais n'est plus l'espèce prédominante ; elle produit un carraghénane hybride avec des motifs κ - et ι -carrabioses. D'autres espèces de l'ordre des Gigartinales telles que

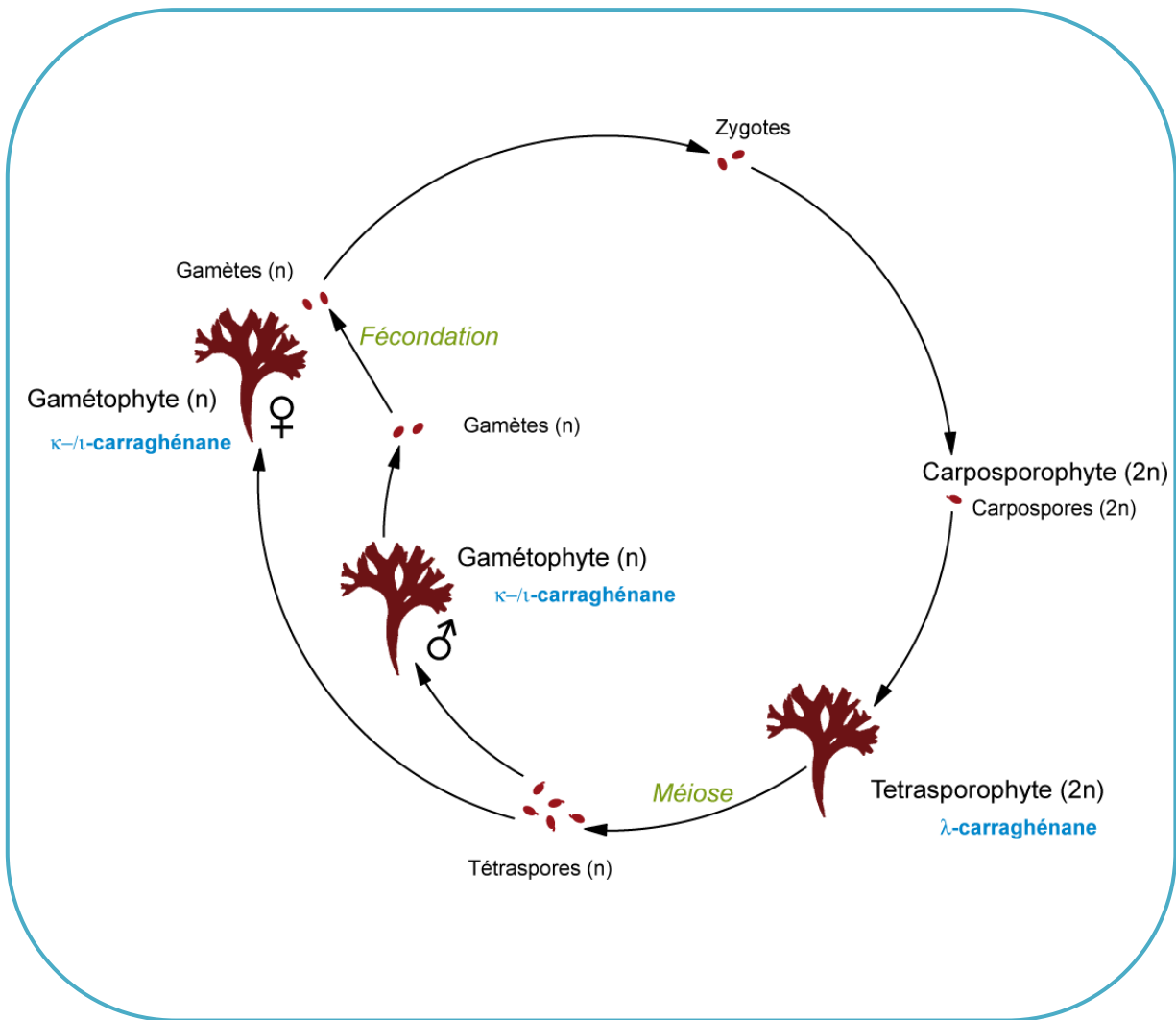


Figure IG-3 : Cycle de reproduction de l'algue rouge *Chondrus crispus* (Gigartinaceae) et structures des carraghénanes correspondants (Adapté de [Chen et al., 1972](#))

Gigartina skottsbergii, *Sarcothalia radula* ou *crispata*, *Mazaella laminarioides* ou encore *Chondracanthus chamissoi*, sont de plus en plus utilisées par les industriels. Ces algues produisent elles-aussi des carraghénanes hybrides κ - ι - mais sont récoltées dans les eaux tempérées d'Amérique du Sud (Chili, Argentine) parmi des populations sauvages. Le β -carraghénane et sa forme hybride κ - β -carraghénane sont obtenus à partir d'une Soleriaceae, *Betaphycus gelatinum* (Chine), d'une Furcellariaceae, *Furcellaria lumbricalis* (Mer Baltique), ou d'une Tichocarpaceae, *Tichocarpus crinitus* (Pacifique Nord-Ouest).

Cependant, il est important de souligner qu'à l'heure actuelle, la production des carraghénanes est dominée par la culture d'espèces tropicales de la famille des Soleriaceae telles que *Kappaphycus alvarezii* ou *Eucheuma denticulatum*. Ces deux espèces, produisant respectivement du κ - et du ι -carraghénane, sont principalement cultivées dans les eaux chaudes des Philippines, d'Indonésie ou de Tanzanie.

Des tentatives de classification des algues rouges basées sur la composition de leur paroi ont été effectuées (Fredericq *et al.*, 1996 ; Chopin *et al.*, 1999). Cependant, il s'est avéré difficile de dégager des caractéristiques communes aux polysaccharides pariétaux des algues d'une même famille. En effet, on ne constate pas systématiquement de corrélation entre les structures et les sources d'algues, car d'autres facteurs rentrent aussi en ligne de compte, qui seront détaillés et expliqués ci-après.

A.3 Le cycle de reproduction des algues rouges

Les algues rouges ont un cycle de reproduction complexe, de type haplodiplophasique trigénétiq (Chen *et al.*, 1972). Les gamètes (n) libérés par les algues gamétophytes haploïdes mâles et femelles fusionnent lors de la fécondation pour former des carposporophytes diploïdes (2n). Ces derniers vont se développer sur les individus femelles et libérer des carpospores (2n), évoluant en algues tétrasporophytes diploïdes (2n). Via le phénomène de méiose, les tétrasporophytes vont ensuite libérer des tétraspores (n) qui fermeront le cycle en évoluant en algues gamétophytes (n) mâles ou femelles (Figure IG-3).

Bien que les générations (gamétophytes ou tétrasporophytes) soient similaires d'un point de vue morphologique, différentes structures de carraghénanes ont pu être observées aux divers stades du cycle de reproduction, chez certaines espèces de Gigartinaceae et de Phylloporaceae. Ainsi, chez les genres *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*, et *Sarcothalia*, il a été constaté que la forme gamétophyte synthétise des carraghénanes de la famille kappa (κ -, ι -, μ -, ν -), alors que les tétrasporophytes produisent des carraghénanes de la famille lambda (λ -, θ -, π -, ξ -) (McCandless *et al.*, 1973 ; Craigie, 1990 ; Stortz & Cerezo, 1993 ; Falshaw & Furneaux, 1994 ; Stortz *et al.*, 1994). Les algues récoltées par les industriels sont souvent un mélange d'individus, tétrasporophytes et gamétophytes, conduisant de ce fait, à l'extraction d'un mélange de carraghénanes des familles kappa et lambda, dont les proportions relatives varient avec les fluctuations de la biomasse.

Chez les algues de la famille des Soleriaceae, qui sont les plus utilisées par l'industrie, la variabilité des structures de carraghénanes en fonction du cycle biologique n'a pas été observée. Certaines espèces d'*Eucheuma* possèdent des parois constituées majoritairement d'un seul type de carraghénanes (Dawes *et al.*, 1977 ; Doty *et al.*, 1978). C'est le cas de l'espèce *Kappahycus alvarezii* (*Eucheuma cottonii* pour le commerce) dont les carraghénanes extraits ont une structure quasi-exclusivement composée de motifs κ -carrabioses (Bellion *et al.*, 1981). De même, l'algue *Eucheuma denticulatum* (*spinosum* dans le commerce) contient quant à elle essentiellement des motifs ι -carrabioses (Bellion *et al.*, 1981). Les carraghénanes extraits des espèces *Eucheuma gelatinae* (Greer *et al.*, 1984a) ou de *Furcellaria lumbricalis* (Knutsen *et al.*, 1987) ont montré des structures composées à la fois de motifs κ - et β -carrabioses, quelle que soit la génération des algues récoltées.

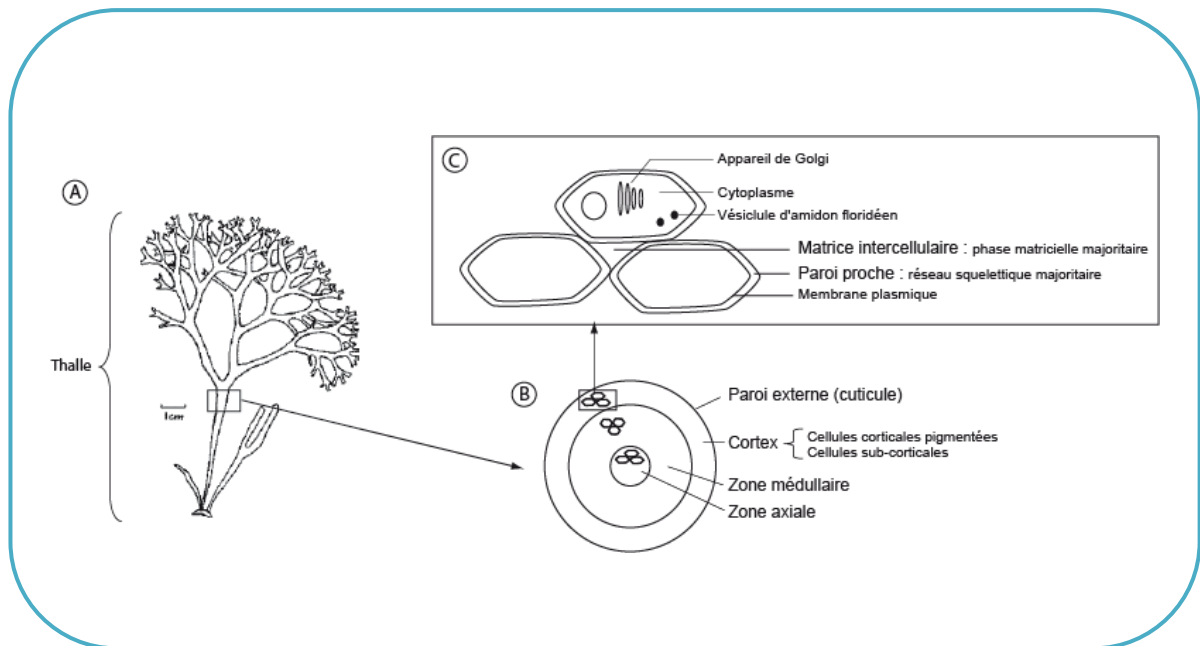


Figure IG-4 : Organisation de la paroi des algues rouges (Reproduit de la Thèse [Guibet, 2007](#))

(A) Thalle de l'algue rouge *Chondrus crispus*

(B) Coupe transversale de thalle

(C) Organisation des cellules dans la paroi des algues

A.4 Organisation de la paroi des algues rouges

A.4.1 Les parois algales

La paroi des végétaux, terrestres comme aquatiques, est une structure qui évolue en fonction de l'âge des tissus. Le rôle de cette paroi est à la fois structural et protecteur. En effet, sa structure semi-rigide forme une armature résistante qui permet de soutenir l'organisme, de résister à la pression osmotique, et qui constitue en même temps une barrière contre les agressions extérieures. Toujours en contact avec le milieu extérieur, la paroi sert d'interface entre le végétal et son environnement. L'organisation générale de la paroi des algues rouges est similaire à celle des autres algues (brunes et vertes) et des plantes supérieures. Les cellules végétales possèdent, en plus de leur membrane plasmique, une paroi polysaccharidique interprétée comme une structure biphasique, composée d'une phase cristalline et d'une phase matricielle (Figure IG-4). Les parois des algues marines diffèrent de celles des plantes supérieures par l'abondance des polysaccharides matriciels par rapport aux composés squelettiques et la présence de polysaccharides sulfatés (Kloareg & Quatrano, 1988).

✓ Les polysaccharides squelettiques

Le squelette cristallin des algues rouges, et des végétaux en général, est constitué de polysaccharides linéaires neutres et insolubles. Le composé majoritaire, et le plus commun, est la cellulose, présente sous forme de microfibrilles cristallines, mais on trouve également du xylane ou du mannane (Tableau IG-1). La cellulose est une chaîne de (1→4)β-D-glucose en conformation chaise 4C_1 qui donne à la cellulose une disposition en ruban. Des liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires stabilisent la cellulose sous forme de fibres constituées par l'assemblage des chaînes du polymère. La cellulose ne représente que 1 à 8% du poids sec de l'algue chez les Rhodophycées (Ross, 1953) ou les Phéophycées (Black, 1950), alors que le taux est d'environ 30 % chez les végétaux supérieurs (Preston, 1974). Néanmoins, les parois de certaines Chlorophycées présentent une exception remarquable avec 70 % de cellulose cristalline (Frei *et al.*, 1961). La cellulose extraite des parois algales est toutefois

| | | Plantes supérieures | Algues vertes (Chlorophycées) | Algues rouges (Rhodophycées) | Algues brunes (Phéophycées) |
|--------------------|---------|---------------------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Phase squelettique | | Cellulose | Cellulose | Cellulose Xylane Mannane | Cellulose |
| Phase matricielle | Neutre | Hémicelluloses | Hémicelluloses | Hémicelluloses | Hémicelluloses |
| | Acide | Pectines | Ulvanes | | Alginates |
| | Sulfaté | - | Ulvanes | Agars Carraghénanes Porphyranes | Fucanes |

Tableau IG-1 : Principaux polysaccharides rencontrés dans la paroi des macro-algues et des plantes supérieures (d'après Popper, 2010)

rarement un polymère pur de $\beta(1-4)$ -glucose. Ainsi, la cellulose extraite de l'espèce *Palmaria palmata* contient plus de 50 % de xylose (Cronshaw *et al.*, 1958 ; Turvey & Williams, 1970).

✓ Les polysaccharides matriciels

Appelés communément mucilages, les polysaccharides matriciels, sont isolés plus aisément que les composants de la phase squelettique. En effet, dans la majorité des cas, ils sont solubles dans l'eau en présence de sels, d'acides ou de bases, et peuvent donc être extraits par trempage d'extraits bruts d'algues à haute ou basse température. La diversité structurale de ces polysaccharides, aussi bien entre les différentes espèces d'algues qu'au sein d'une même espèce, est extrêmement importante. Chez les algues marines comme chez les plantes supérieures, la matrice est composée de plusieurs familles de polysaccharides (Tableau IG-1), dont les proportions varient selon de nombreux facteurs tels que la génération (gamétophyte ou tétrasporophyte), les tissus considérés (zone axiale, médullaire, etc), l'âge ou encore divers paramètres environnementaux. Bien que les principales structures des polysaccharides matriciels algaux soient connues, on est bien loin du niveau de connaissances acquis sur les parois des plantes supérieures.

La phase matricielle des algues marines est composée essentiellement d'un réseau de polysaccharides anioniques appelés phycocolloïdes, avec une contribution mineure des polysaccharides neutres (Tableau IG-1). Ces polymères sont souvent sulfatés comme les carraghénanes et les agars chez les algues rouges, ou les fucanes chez les algues brunes ; carboxylés tels les alginates présents dans les algues brunes ; ou encore les deux à la fois comme c'est le cas des ulvanes chez les algues vertes. On souligne l'absence de polysaccharides sulfatés chez les plantes terrestres. En effet, la biosynthèse de polysaccharides sulfatés semble être une adaptation au milieu marin, dont la concentration en sulfate est de 28 mM alors qu'elle est de l'ordre de 10 μ M à 1 mM dans l'eau douce et dans l'eau interstitielle des sols. Au niveau évolutif, il a été proposé que la capacité de synthèse de polysaccharides sulfatés ait été perdue par les plantes lors de la colonisation du milieu terrestre (Michel *et al.*, 2010).

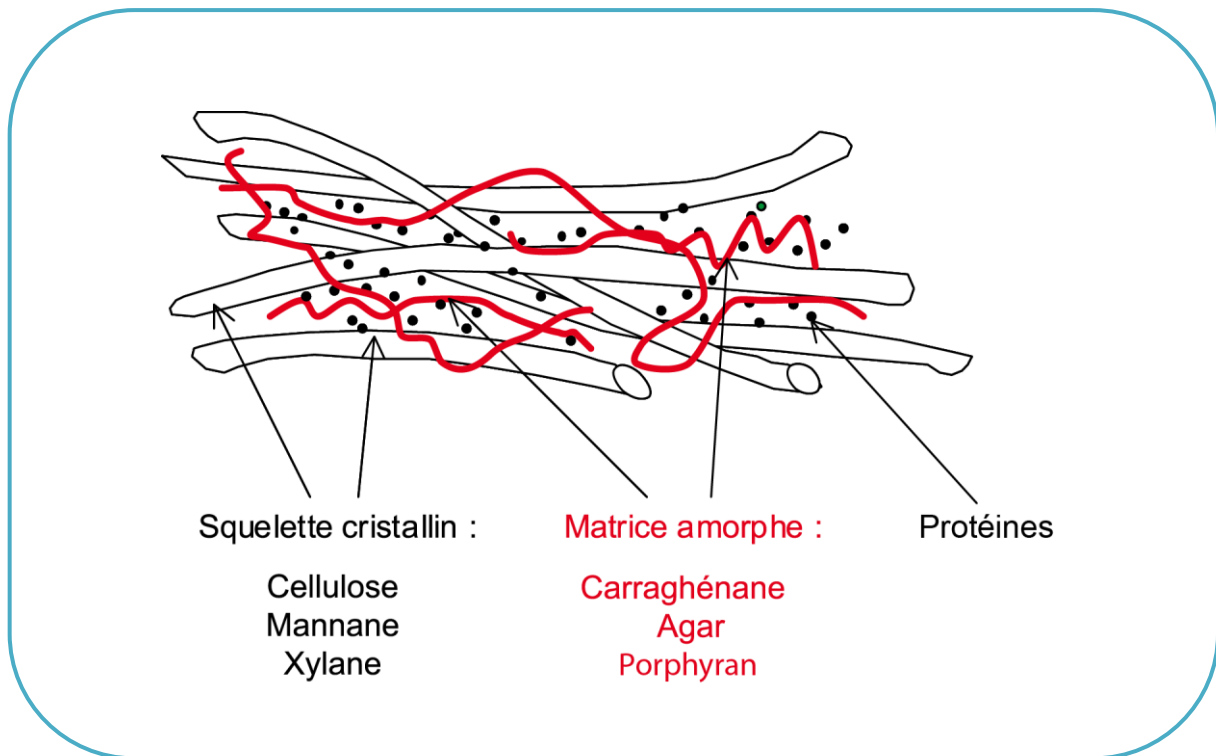


Figure IG-5 : Représentation schématique de la paroi des algues rouges

A.4.2 Architecture de la paroi des algues rouges

La phase squelettique des algues rouges est principalement constituée de cellulose, mais on y trouve également du xylane et du mannane (Figure IG-5). Bien qu'en faible quantité chez les algues rouges (1 à 8% du poids sec de l'algue), la cellulose joue un rôle structural important en permettant à l'algue de résister à l'hydrodynamisme du milieu.

Les polysaccharides matriciels représentent la majeure partie du poids sec chez les algues rouges et brunes. Les Rhodophycées synthétisent principalement des galactanes linéaires et sulfatés, de haute masse moléculaire (400 à 600 kDa) : les carraghénanes et les agars (Tong *et al.*, 1980) (Figure IG-5). Ces polymères sont composés d'un enchaînement d'unités galactopyranoses alternativement liées en $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$. Les unités liées en β sont toujours de configuration D, tandis que les unités liées en α sont de configuration D dans le cas des carraghénanes et L dans le cas des agars. Les carraghénanes sont des molécules beaucoup plus sulfatées (17 à 53 % de sulfate), que les agarocolloïdes (0 à 8 %) (Armisen, 2000). On trouve également dans les algues rouges du porphyrane, un copolymère complexe d'agarose et d'unités composées d' α -L-galactopyranose-6-sulfate et de β -D-galactopyranose (Morrice *et al.*, 1983 et 1984). Des structures branchées (xylose, acide glucuronique) plus complexes ont aussi été observées comme des xylomannanes sulfatés (Usov, 1984 ; Kolender *et al.*, 1997), des xylogalactanes sulfatés branchés (Usov *et al.*, 1997 ; Duarte *et al.*, 2002) et des galactoglucuronoxylanes non sulfatés (Watt *et al.*, 2002).

L'importance de la phase matricielle dans la paroi des algues rouges ainsi que sa composition polyanionique particulière, reflètent des propriétés spécifiques adaptées au milieu marin (Kloareg & Quatrano, 1988). La paroi des Rhodophycées présente une souplesse et une élasticité qui lui confèrent une résistance face aux courants marins. Il est également supposé que le caractère fortement hydrosoluble de ses constituants permettrait une rétention de l'eau ralentissant la dessiccation de l'algue à marée basse. Enfin, sa concentration en sulfate permettrait à la paroi d'intervenir dans des phénomènes de régulation ionique et osmotique.

La différenciation entre la paroi et la matrice intercellulaire est peu distincte et se base essentiellement sur des différences de distribution des polysaccharides squelettiques et matriciels. Les polysaccharides squelettiques sont abondants dans la paroi proche de la cellule

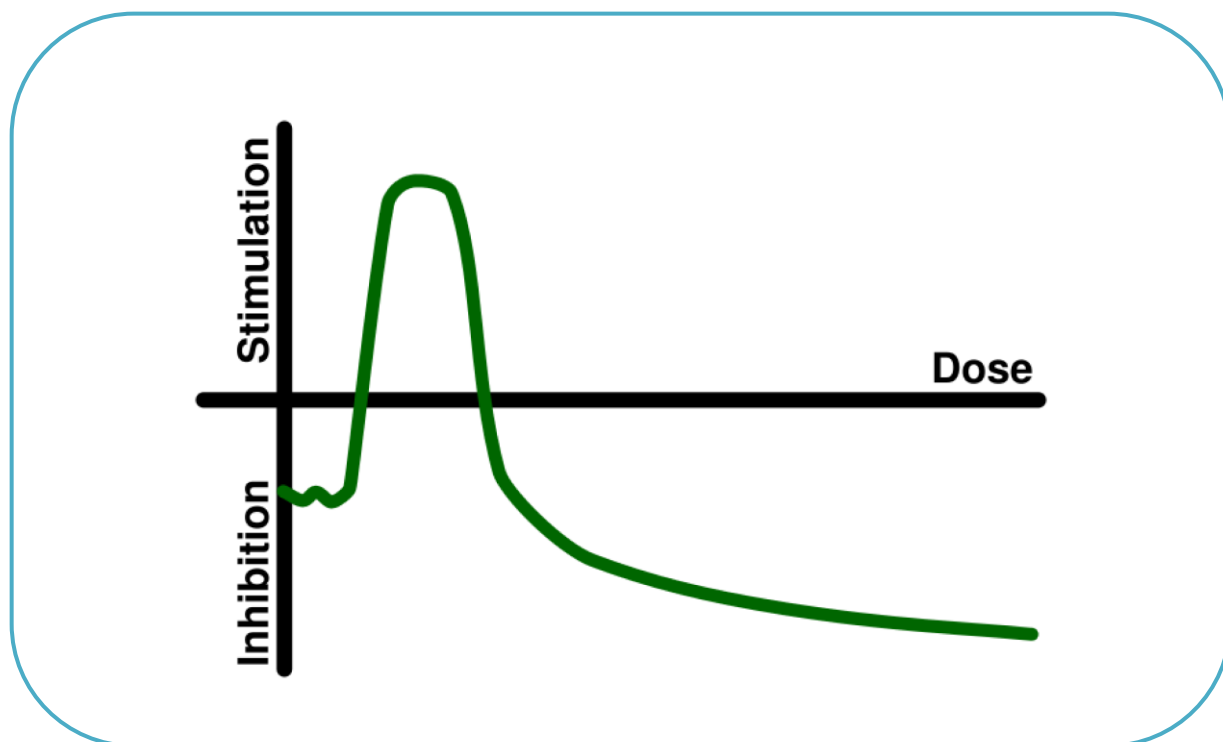


Figure IG-6 : Phénomène d'hormésis

Un organisme soumis à une dose très faible d'un agent chimique peut manifester une réponse opposée à celle observée pour une forte dose.

mais presque absents de la matrice intercellulaire. La paroi des algues rouges contient également des protéines qui, bien que présentes en faible quantité, jouent un rôle important pour la biosynthèse (en particulier pour la maturation des carraghénanes) et le maintien de la structure de la paroi (Vreeland & Kloareg, 2000).

B. Les interactions entre les algues et les bactéries marines

Les macro-algues marines ont été défiées tout au long de leur évolution par les micro-organismes. De ce fait, il n'est pas surprenant qu'une relation complexe se soit développée entre les algues et les bactéries. Bien que tous les mécanismes n'aient pas été pleinement élucidés, de nombreuses fonctions écologiques ont été démontrées par des associations algues/micro-organismes, permettant ainsi d'élucider en partie les interactions entre ces êtres vivants (Goecke *et al.*, 2010).

B.1 Interactions algues / bactéries à distance

Il est admis depuis longtemps, qu'au cours de leur croissance, la plupart des êtres vivants excrètent des substances dans le milieu extérieur qui influencent à distance la croissance d'autres organismes (Lucas, 1947). Les effets de telles substances sont évalués en terme d'activité stimulatrice ou inhibitrice vis-à-vis de l'organisme cible, cependant l'effet résultant est souvent dépendant de la concentration. C'est le phénomène de l'hormésis (Figure IG-6) décrit en bactériologie (Chabbert, 1963) et qui a été également observé chez les algues phytoplanctoniques (Bonin, 1969).

Les interactions entre les algues et les bactéries reposent sur des phénomènes d'antibiose. Cela a été démontré par l'isolation de deux substances inhibant la croissance bactérienne à partir d'un filtrat de culture de la diatomée *Fragilaria pinnata* (Berland *et al.*, 1972b). Beaucoup d'organismes peuvent produire des antibiotiques dont des bactéries. Celles-ci sont phylogénétiquement assignées aux genres *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Streptomyces* et *Bacillus* (Wiese *et al.*,

2009b). On considère également que 25 % des espèces d'algues connues possèdent cette faculté (Aubert, 1971). L'activité anti-bactérienne d'extraits de macroalgues a été décrite dans diverses études (Yan *et al.*, 2003 ; Bhakuni & Rawat, 2005 ; Puglisi *et al.*, 2007 ; Dubber & Harder, 2008). De nombreux composés différents produits par les macro-algues exposent cette activité, tels des acides gras, des phénols, des acétylènes, divers terpènes, coumarines, carbonyles et polysaccharides (Ballantine *et al.*, 1987 ; Lustigman *et al.*, 1992 ; Potin *et al.*, 1999 ; Sandsdalen *et al.*, 2003). Les phénomènes d'antibiose sont fortement dépendants de la concentration en molécules actives.

B.2 Interactions algues / bactéries marines par contact direct

Des contacts plus directs existent entre les algues et les bactéries. Parmi les études existantes sur les interactions entre les micro-organismes et les eucaryotes sessiles marins, celles concernant la diversité microbienne associée aux coraux et aux éponges sont les plus importantes (Hentschel *et al.*, 2002 ; Longford *et al.*, 2007 ; Santiago-Vazquez *et al.*, 2007 ; Taylor *et al.*, 2007). En comparaison, les autres surfaces comme celles des macro-algues n'ont pas reçu autant d'attention, et de nombreux systèmes d'interaction restent encore à explorer. Pourtant, la paroi des algues est un lieu d'échanges intercellulaires et d'échanges avec le milieu extérieur. Les algues hébergent à leur surface, comme l'épiderme des animaux, une multitude de bactéries qui peuvent être commensales saprophytes, symbiotiques ou pathogènes. La bactérie marine *Pseudoalteromonas atlantica* a d'ailleurs été isolée à la surface d'une algue rouge échantillonnée à Inubousaki au Japon, tout comme *Pseudoalteromonas carrageenovora* isolée d'une algue rouge également sur les côtes du Canada (Yaphe & Baxter, 1955 ; Akagawa-Matsushita *et al.*, 1992). La microflore épiphyte est dépendante de la biologie et du cycle de vie de l'algue (Corre & Prieur, 1990).

En effet, la forte proximité spatiale des micro-organismes aux surfaces conduit à des interactions intercellulaires spécifiques et crée des communautés complexes et hautement différenciées. La flore bactérienne associée aux algues est relativement spécifique des trois phyla algaux et différente de celle présente dans l'eau de mer environnante (Kong & Chan, 1979). La limitation nutritive et spatiale, ainsi qu'un environnement fortement compétitif, ont conduit la surface colonisée par les micro-organismes à développer des réponses adaptatives

particulières, telles que des stratégies antagonistes pour empêcher la colonisation ou la croissance de compétiteurs potentiels (Egan *et al.*, 2008). Les interactions contrôlées chimiquement, et la communication entre les micro-organismes et leurs hôtes eucaryotes, ont également un impact significatif sur la composition et la fonction de la surface. En effet, le contrôle des populations bactériennes par les surfaces est souvent caractérisé par une défense de l'hôte, comme chez les algues, contre d'éventuels organismes pathogènes, ou un contrôle des bactéries colonisatrices pour réduire leur prolifération (Kubanek *et al.*, 2003 ; Amsler *et al.*, 2005 ; Paul *et al.*, 2007 ; Potin, 2008).

En revanche, très peu d'études montrent le rôle parfois bénéfique des bactéries associées aux algues, comme leur impact sur leur morphologie (Provasoli & Pintner, 1980 ; Tatewaki *et al.*, 1983). En plus de la fixation de l'azote, nutriment essentiel aux algues, les micro-organismes jouent un rôle de protection contre des composés toxiques tels que les métaux lourds (Riquelme *et al.*, 1997 ; Dimitrieva *et al.*, 2006) ou le pétrole (Semenova *et al.*, 2009).

La majorité des organismes marins reste relativement dépourvue de microsalissures, bien que la plupart d'entre eux soient recouverts d'un fin film de bactéries épiphytes (Clare, 1996). Par conséquent, ces bactéries épiphytes ont tout intérêt à maintenir la santé de l'hôte qui les porte. Les bactéries présentes à la surface des macro-algues marines semblent donc jouer un rôle protecteur en émettant dans l'eau des composés qui aident à la prévention des salissures extensives des surfaces. Ces composés peuvent d'ailleurs avoir des applications industrielles et médicales (Armstrong *et al.*, 2001). Les bactéries, en absence de facteur de croissance dans le milieu de culture, utilisent comme substrat plutôt les acides aminés et les acides organiques que les glucides (Berland *et al.*, 1970). Certains de ces substrats sont connus pour être excrétés par des algues phytoplanctoniques. En dehors des simples relations de commensalisme et de saprophytisme, il a été rapporté de rares cas de symbiose entre les bactéries et les algues hôtes, comme avec *Pylaiella littoralis* (Loiseaux & Rozier, 1978), ou *Porphyridium cruentum* (Iqbal, 1993).

B-3 Bactéries pathogènes

Comme dans toutes les interactions entre organismes vivants, et notamment dans celles impliquant des bactéries marines, la santé de l'hôte peut toutefois être endommagée. Les bactéries épiphytes peuvent causer des maladies, des nécroses des tissus, diminuer la croissance et/ou la photosynthèse, inhiber les échanges gazeux, interférer dans les processus de reproduction, et peuvent conduire à la mort de l'individu hôte (Andrews, 1976 ; Correa & Sanchez, 1996 ; Steinberg *et al.*, 1997 ; Armstrong *et al.*, 200b). Les études effectuées sur des bactéries épiphytes pathogènes sont peu nombreuses et concernent majoritairement des algues marines cultivées. L'exemple type est celui de la laminaire *Saccharina japonica*, dont le thalle peut se couvrir de nécroses rouges (Uchida *et al.*, 1995 ; Sawabe *et al.*, 1998 ; Sawabe *et al.*, 2000 ; Uchida *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2008).

En plus de la production de composés antibiotiques, les macro-algues sont capables d'utiliser le burst oxydatif comme mécanisme de défense, comme chez les plantes supérieures (Weinberger *et al.*, 1999, 200 ; Dring, 2005 ; Ar Gall *et al.*, 2008). Ce processus est une réponse de défense non-spécifique contre la colonisation de la surface, typiquement caractérisée par une activation rapide des espèces réactives de l'oxygène et engendrant la mort du pathogène (Bouarab *et al.*, 1999 ; Weinberger & Friedlander 2000a,b ; Steinberg & de Nys 2002 ; Potin, 2008).

On note, ces dernières années, un intérêt croissant pour les associations algues/micro-organismes (Egan *et al.*, 2008). En effet, ces associations présentent un potentiel important de nouvelles substances naturelles, et ont été identifiées comme une source prometteuse de nouveaux métabolites bioactifs et anti-microbiens (Yan *et al.*, 2002 ; Penesyan *et al.*, 2009).

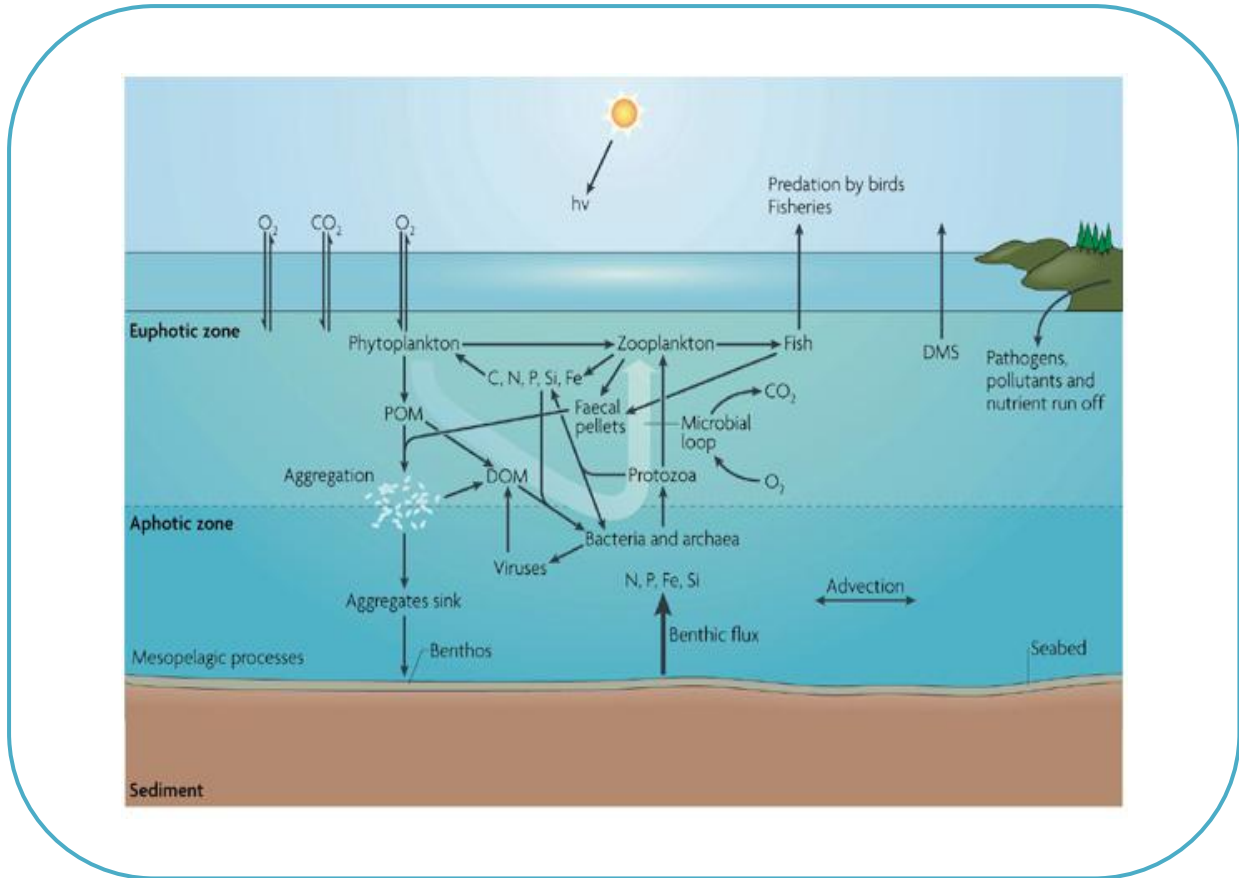


Figure IG-7 : Le rôle des bactéries dans le cycle du carbone océanique (Azam & Malfatti, 2007)

Structure schématique d'un écosystème océanique ouvert, qui met en évidence le rôle de la boucle microbienne (flèche blanche épaisse) dans le recyclage de la matière organique. POM : *Particulate Organic Matter*. DOM : *Dissolved Organic Matter*. DMS : *Dimethylsulphide*.

B-4 Rôle des bactéries marines dans le cycle du carbone

La surface des océans est d'une importance primordiale pour toute la chaîne alimentaire marine et le cycle du carbone. Jusqu'à 200 m de profondeur, des organismes photosynthétiques utilisent la lumière du soleil et le CO₂ capté par l'océan pour produire la nourriture consommée par le reste de la chaîne alimentaire. Cette « productivité primaire » est utilisée par tous les organismes aussi bien ceux de la surface que ceux des profondeurs.

Les bactéries marines contribuent de façon significative aux flux de carbone dans l'océan (Mc Graw, 2006). Dans les zones côtières notamment, les algues représentent une source de carbone importante. Pour cette raison, les bactéries ont développé au cours de l'évolution toute la « machinerie » permettant de dégrader complètement les polysaccharides des algues. Elles ont acquis les différentes enzymes mises en jeu, en fonction des algues dont elles se nourrissent. L'Homme cherche aujourd'hui à utiliser ces « outils » enzymatiques pour reproduire des réactions naturelles à des fins biotechnologiques.

II – LES CARRAGHENANES

Les carraghénanes sont les polysaccharides d'origine marine les plus exploités industriellement (Seisun, 2012). Extraits des algues rouges, dont ils sont le principal polysaccharide matriciel, ces gélifiants demeurent une source d'intérêt inépuisable pour des perspectives biotechnologiques. Objet de notre étude, les carraghénanes et leurs applications actuelles seront ici décrits dans le détail.

A. Structures chimiques, classifications et nomenclatures des carraghénanes

A.1 Structure chimique des carraghénanes

Les carraghénanes constituent une large famille de polysaccharides linéaires sulfatés, de poids moléculaire compris entre 10^5 et 10^6 Da environ (Viebke *et al.*, 1995). Ces polymères sont constitués d'un enchaînement d'unités D-galactopyranoses, reliées alternativement par des liaisons α -1,3 et β -1,4. Les unités de répétition sont des disaccharides, basées sur l'alternance des liaisons dans la chaîne, et sont appelées carrabioses. Ces unités se distinguent généralement par leur degré de sulfatation et par la présence ou non d'un pont 3,6-anhydro sur l'unité galactose liée en β -1,4. Il existe également d'autres substitutions telles que des groupements méthyles ou pyruvates. Moins fréquemment, les chaînes de carraghénanes peuvent être ramifiées par des groupements glycosidiques, tels que des unités galactose (Allsobrook *et al.*, 1974), ou encore des unités β -D-xylopyranose (Craigie, 1990). Cependant, les carraghénanes naturels sont des polysaccharides complexes qui diffèrent par leur composition et par la distribution des différents motifs au sein de la chaîne. Ainsi, il faut comprendre que le terme de disaccharide de répétition se réfère en fait à des structures idéales (van de Velde *et al.*, 2002).

| | |
|--------------------|---|
| structure chimique | |
| nom systématique | (1→3)-b-D-galactopyranose (1→4)-a-D-galactopyranose (1→3)-b-D-galactopyranose (1→4)-a-D-anhydro-galactopyranose |
| conformation | ⁴ C ₁ ⁴ C ₁ ⁴ C ₁ ¹ C ₄ |
| schématisation | |

Tableau IG-2 : Unités de répétition des structures chimiques des γ - et β -carraghénane présentées pour illustrer les configurations des unités galactoses des carraghénanes (Knutsen *et al.*, 1994)

En dessous de chacune des unités galactose en représentation schématique, est indiqué le code correspondant dans la nomenclature de Knutsen *et al.*

D'un point de vue conformationnel, les unités β -D-galactopyranoses et α -D-galactopyranoses adoptent la conformation chaise 4C_1 permettant de placer en position équatoriale les groupements les plus volumineux, comme le groupement CH_2OH , ainsi que la plupart des autres groupements hydroxyles potentiellement substituables. Pour les unités 3,6-anhydro-D-galactopyranoses, la conformation chaise 1C_4 est imposée par la présence du pont 3,6-anhydro. (Tableau IG-2).

A.2 Classifications et nomenclatures

La nomenclature des carraghénanes a beaucoup évolué au fil des avancées dans la caractérisation de ces polysaccharides. Bien que la présence d'unités D-galactose dans ces polymères soit connue depuis plus d'un siècle, l'identification des autres constituants principaux fut progressive, et consécutive à la découverte de nouvelles structures chimiques. Ainsi, les différentes classifications et nomenclatures des carraghénanes seront ici présentées dans leur ordre chronologique, en précisant leurs limites et leurs domaines d'utilisation.

A.2.1 Classification historique : critère de solubilité en chlorure de potassium (Smith & Cook, 1953)

Les études pionnières sur la caractérisation des carraghénanes ont porté sur l'étude de deux genres d'algues rouges, *Chondrus* et *Gigartina*. Les analyses par méthylation ont démontré la présence de résidus D-galactose substitués au carbone C4 par un groupement ester sulfate et formant des liaisons glycosidiques *via* les carbones 1 et 3 (Dewar & Percival, 1947 ; Buchannan *et al.*, 1943). Néanmoins, ce monosaccharide ne représentant que 65% du polysaccharide matriciel dans ces deux espèces, la présence d'un autre ose a été rapidement suspectée, monosaccharide identifié par la suite comme un 3,6-anhydro-D-galactose lié en β -1,4 (O'Neil, 1955a). Il fut mis en évidence que le carraghénane de ces deux algues peut être fractionné en deux composants majeurs, selon leur solubilité en présence de chlorure de potassium. Ainsi la fraction soluble en KCl, ne donnant jamais de gel, fut nommée λ (lambda)-carraghénane, tandis que la fraction insoluble à froid en présence de KCl, mais soluble à chaud, formant en refroidissant un gel doux et agréable au palais, fut nommée κ (kappa)-

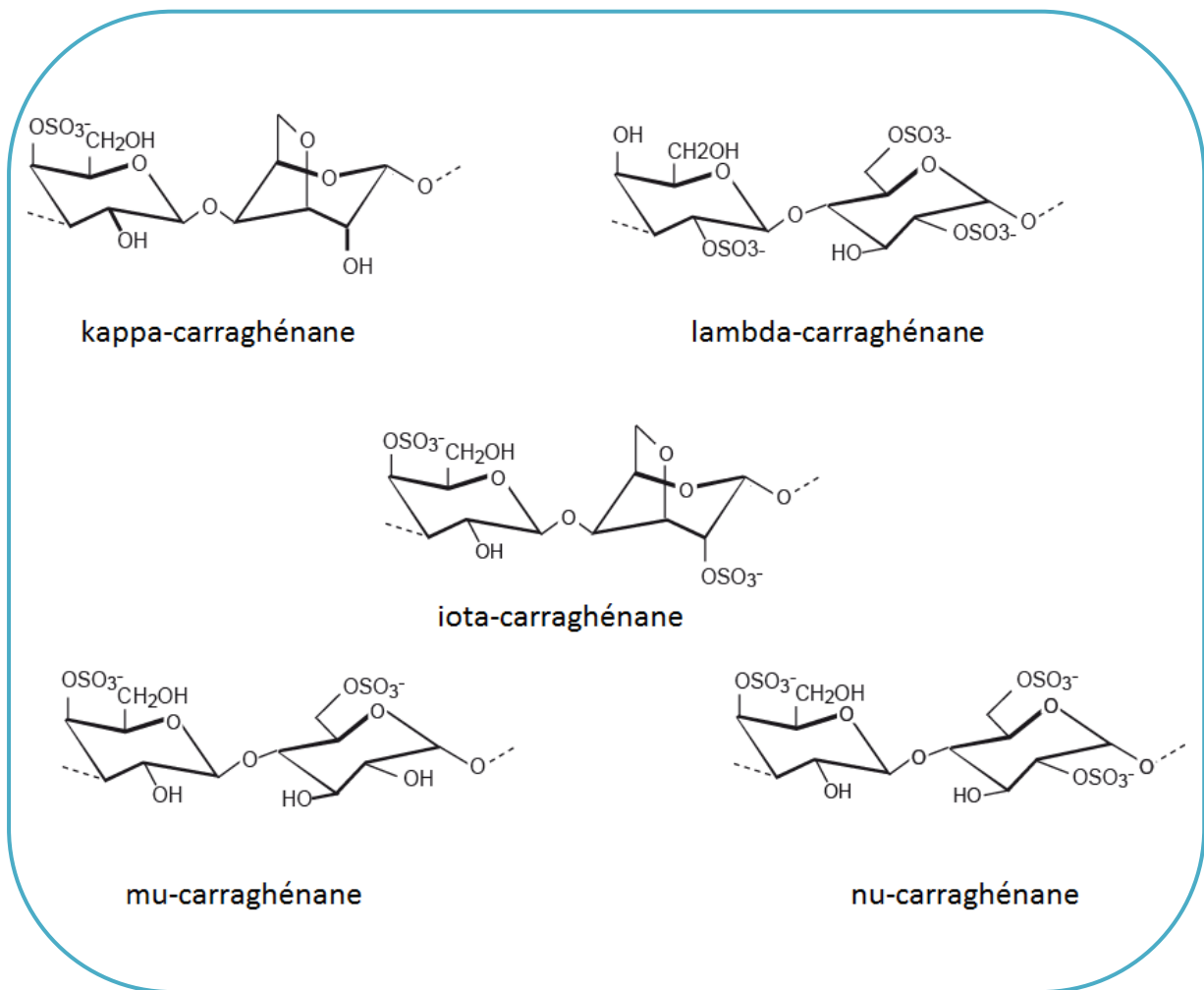


Figure IG-8 : Structures chimiques des unités disaccharidiques des principaux carragénanes

carraghénane. Ainsi, ces appellations donnèrent lieu à la première classification des carraghénanes (Smith & Cook, 1953).

Le polymère précipité au KCl ayant la composition décrite ci-dessus, O'Neill proposa que le disaccharide de répétition du κ -carraghénane soit un β -(1,3)-D-galactopyranosyl-4-sulfate- α -(1,4)-3,6-anhydro-D-galactopyranose (Figure IG-8) (O'Neil, 1955b). La fraction soluble en KCl contient en égale proportion des résidus α -(1,4)-D-galactose-2,6-disulfate (Rees, 1963) et du β -(1,3)-D-galactose, majoritairement sulfaté au carbone 2 et très rarement au carbone 4 ou non sulfaté (Dolan & Rees, 1965). Les auteurs proposèrent de réserver le terme λ -carraghénane aux polymères ne présentant ni β -(1,3)-D-galactose sulfaté en C4, ni 3,6-anhydrogalactose, le monomère idéal étant un β -(1,3)-D-galactopyranosyl-2-sulfate- α -(1,4)-D-galactopyranose-2,6-disulfate (Figure IG-8).

La classification selon la solubilité en KCl trouva rapidement ses limites, notamment avec la découverte du ι (iota)-carraghénane (Rees, 1969) qui, même s'il précipite comme le κ -carraghénane en présence de KCl, se distingue nettement de celui-ci par son spectre infrarouge (Stancioff & Stanley, 1969) et sa structure chimique (Figure IG-8) (Mueller & Rees, 1968). A nouveau, de nouvelles structures de carraghénanes conduirent à des incohérences dans cette classification, avec la découverte des précurseurs biologiques μ (mu)- et ν (nu)-carraghénanes (Figure IG-8), confirmée par la mise en évidence des enzymes catalysant ces réactions *in vitro* chez *Chondrus crispus* (Craigie & Wong, 1978). La classification des carraghénanes basée sur leur solubilité en présence de chlorure de potassium fut donc progressivement abandonnée.

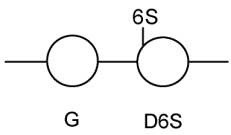
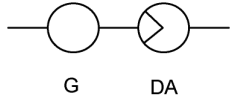
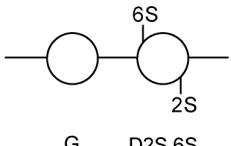
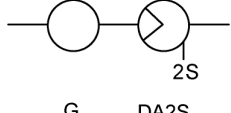
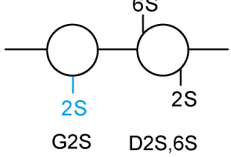
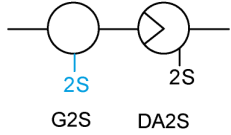
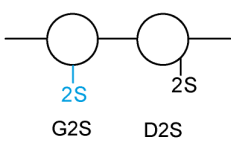
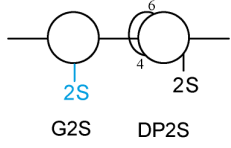
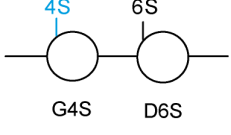
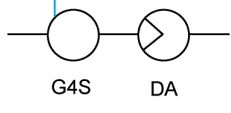
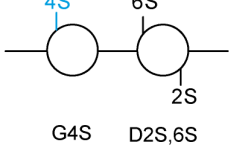

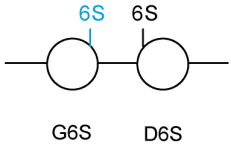
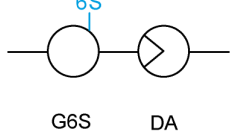
| | |
|---|---|
| <p>Beta</p> <p>Unité G non sulfatée</p> | <p>Gamma : γ  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Beta : β </p> <p>Delta : δ  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Alpha : α </p> |
| <p>Lambda</p> <p>Sulfatation de l'unité G en 2</p> | <p>Lambda : λ  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Theta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

Tableau IG-3 : Classification des carraghénanes en famille (d'après Rees, 1969)

A.2.2 Nomenclature traditionnelle basée sur la classification par familles (Rees, 1969)

Après la mise en évidence de l'existence de plusieurs structures de carraghénanes, un nouveau système de classification fut instauré, basé sur un code de lettres grecques (Rees, 1969). A chaque nouvelle unité disaccharidique découverte était attribuée une nouvelle lettre. Cependant, ces attributions n'ont pas été faites de façon logique ou systématique rendant complexe cette classification et sa mémorisation.

Les disaccharides de répétition ont été répartis en quatre familles en fonction de la position des groupements sulfates sur l'unité D-galactose liée en β -1,4 (Tableau IG-3). En effet, cette classification a d'abord été réalisée en fonction de la similarité des structures avec celle du κ - et du λ -carraghénane (McCandless & Craigie, 1979) ; créant ainsi la famille kappa, dont l'unité D-galactose liée en β -1,4 est sulfatée en position 4, et la famille lambda, dont cette même unité est sulfatée en position 2. Grâce aux avancées des analyses structurales, à ces deux familles, se sont ensuite ajoutées la famille beta, dépourvue de groupement sulfate sur l'unité D-galactose liée en β -1,4 (Greer & Yaphe, 1984a) et la famille oméga dont l'unité galactose liée en β -1,4 est sulfatée en position 6 (Mollion *et al.*, 1986).

✓ La famille beta

La famille beta regroupe les carraghénanes qui ne possèdent pas de sulfatation sur l'unité D-galactose liée en β -1,4. On y trouve le β (beta)-carraghénane, similaire à un κ -carraghénane non-sulfaté et anciennement appelé κ -fucellaran (Painter, 1960 ; Lawson *et al.*, 1973 ; Penman & Rees, 1973) ainsi que son précurseur biologique, le γ (gamma)-carraghénane (Penman and Rees, 1973). Tous deux ont été isolés chez *Euchema gelatinae* (Greer & Yaphe, 1984a), *Furcellaria lumbricalis* (Knutsen & Grasdalen, 1987) et plus récemment chez *Tichocarpus crinitus* (Yermak *et al.*, 1999). L' α (alpha)-carraghénane, sulfaté en position 2 de l'unité 3,6-anhydro-D-galactose liée en α -1,3, et son précurseur biologique le δ (delta)-carraghénane, sont aussi recensés dans cette famille, et ont été isolés chez *Catenella nipea* (Zablakis *et al.*, 1986 ; Falshaw *et al.*, 1996).

✓ La famille lambda

La famille lambda se caractérise par une sulfatation en position 2 de l'unité D-galactose liée en β -1,4. Ces carraghénanes se rencontrent dans les parois des tétrasporophytes de certaines espèces de Gigartinaceae et Phylloporaceae (McCandless *et al.*, 1982 et 1983). La structure majoritairement rencontrée est celle du λ -carraghénane, sulfatée sur les positions 2 et 6 de l'unité D-galactose liée en α -1,3 (Matulewicz *et al.*, 1990 ; Nosedá *et al.*, 1993 ; Falshaw *et al.*, 1994 ; Stortz *et al.*, 1994 ; Falshaw *et al.*, 1998). La structure θ (theta)-carraghénane, caractérisée par un pont 3,6-anhydro sur l'unité D-galactose liée en α -1,3, est présente chez certaines algues comme *Callophyllis hombroniana* (Miller, 2003 ; Falshaw *et al.*, 1998), mais peut également être obtenue par lente transformation alcaline du λ -carraghénane (Ciancia *et al.*, 1993b). La structure ξ (ksi)-carraghénane, dépourvue de sulfatation sur le carbone 6 de l'unité D-galactose liée en α -1,3 (Penman & Rees, 1973) et celle du π (pi)-carraghénane, pyruvaté sur l'unité D-galactose liée en α -1,3 (DiNinno *et al.*, 1979) ont été observées en proportion plus ou moins importante chez les formes tétrasporophytes de différentes espèces de Gigartinaceae (McCandless *et al.*, 1983 ; Falshaw *et al.*, 1995 ; Falshaw *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été mis en évidence une structure de type λ -carraghénane mais avec une sulfatation supplémentaire sur la position 4 de l'unité D-galactose liée en β -1,4 (Guibet, 2006).

✓ La famille kappa

La famille kappa regroupe tous les carraghénanes portant une sulfatation en position 4 de l'unité D-galactose liée en β -1,4. Outre le κ -carraghénane, on y trouve le ι -carraghénane, sulfaté en position 2 de l'unité 3,6-anhydro-D-galactose liée en α -1,3, et leurs précurseurs biosynthétiques respectifs, le μ - et le ν -carraghénanes (Anderson *et al.*, 1973). Les motifs précurseurs μ - et ν - peuvent être convertis *in vivo* en motifs κ - et ι -carraghénanes, lors de la biosynthèse par l'action de galactose-6-sulfurylases (Craigie & Wong, 1978), mais également *in vitro* par un traitement alcalin à chaud, comme c'est le cas au cours du procédé industriel (Bellion *et al.*, 1983). La présence de carraghénanes de la famille kappa est récurrente dans de nombreuses espèces d'algues rouges, soit avec une structure très proche d'une structure homopolymérique ($\geq 95\%$) comme c'est le cas du motif κ - chez *Kappaphycus alvarezii*, ou du motif ι - chez *Euchema denticulatum*, soit sous forme d'hétéropolymères associant divers

motifs dans la même structure, comme chez *Chondracanthus chamissoi* (59% de κ -, 10% de μ -, 24% de ι - et 7% de ν -) ou *Mazaella laminarioides* (46% de κ -, 12% de μ -, 20% de ι - et 22% de ν -), avec 4 motifs différents dans la même structure (Jouanneau *et al.*, 2011). De manière générale, on trouve dans une même chaîne de carraghénane, un motif et son précurseur. Ainsi, on voit quasi-systématiquement du μ -carrabiose dans une structure présentant des motifs κ -carrabioses, et du ν -carrabiose quand il y a des unités ι -carrabioses. D'autre part, on note fréquemment des substitutions méthylées chez les carraghénanes de la famille kappa, sur les structures κ - et ι -carraghénanes, en position 6 de l'unité D-galactose liée en β -1,4 comme observée chez *Kappaphycus alvarezii* (Chiovitti *et al.*, 1998) et *Claviconium ovatum* (Chiovitti *et al.*, 2004) respectivement.

✓ La famille oméga

La famille oméga rassemble les carraghénanes portant une sulfatation sur le carbone 6 de l'unité D-galactose lié en β -1,4. L' ω (oméga)-carraghénane et son présumé précurseur, le ψ (psi)-carraghénane ont été découverts chez une espèce de Gigartinales, *Rissoella verruculosa* (Mollion *et al.*, 1986). Des motifs ω -carraghénanes avaient déjà été identifiés au sein de structures κ chez les espèces *Furcellaria lumbricalis* et *Phyllophora nervosa* (Usov & Arkhipova, 1981).

A.2.3 Nomenclature actuelle pour les carraghénanes complexes (Knutsen *et al.*, 1994)

La nomenclature basée sur les lettres grecques (Rees, 1969) demeure la plus répandue encore aujourd'hui et est suffisante pour la description de structures simples de carraghénanes. Cependant, elle tend à oblitérer la nature hybride de ces polysaccharides et à généraliser abusivement une structure idéale à l'ensemble du polymère. Pour pallier les limites rencontrées avec le code des lettres grecques, un système plus détaillé a été élaboré, décrivant les différentes unités par un code alphanumérique (Knutsen *et al.*, 1994). Ce nouveau code permet de décrire n'importe quel motif et devient très utile dans la description de chaînes complexes de carraghénanes contenant plusieurs motifs disaccharidiques différents.

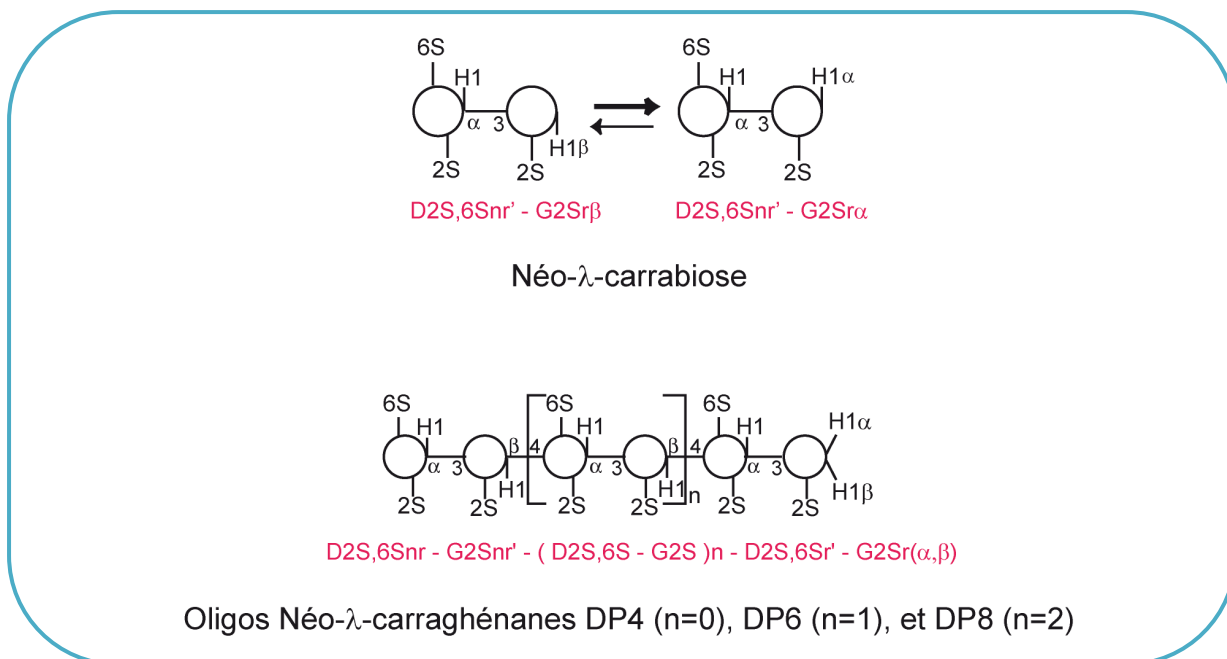


Figure IG-9 : Exemple d'annotation d'oligo-λ-carraghénanes selon la nomenclature de Knutsen *et al.*

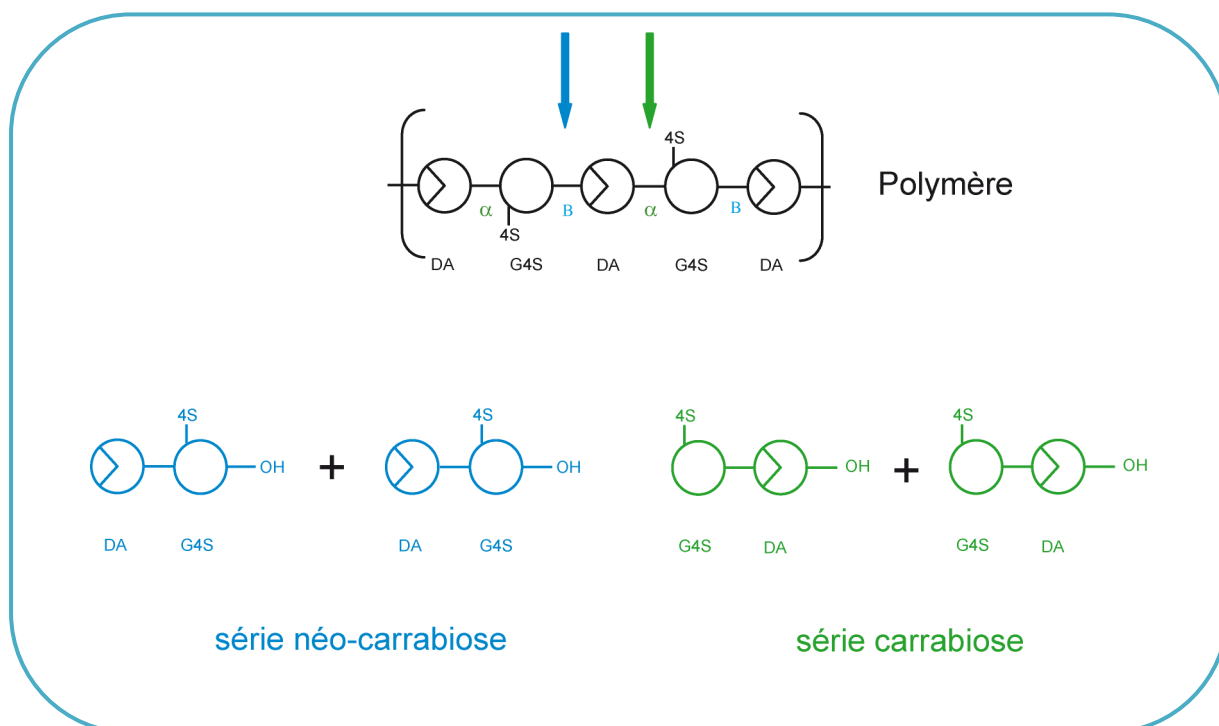


Figure IG-10 : Illustration des 2 séries d'oligosaccharides potentielles chez les carraghénanes

La coupure des liaisons α produit des oligosaccharides de la série carrabiose tandis que la coupure des liaisons β produit des oligosaccharides de la série néo-carrabiose.

La nouvelle nomenclature proposée par [Knutsen et al.](#) a été pensée tant pour les agarocolloïdes que pour les carraghénanes. Les unités galactoses, toutes de configuration **D** dans les carraghénanes, sont notées **G** lorsqu'elles sont liées en β -1,4 et **D** lorsqu'elles sont liées en α -1,3. Ces dernières peuvent également exister sous la forme 3,6-anhydrogalactopyranoses et sont alors notées **DA**. De même, les unités galactoses liées en α -1,3, qui sont de configuration **L** dans les agars, sont désignées par la lettre **L**, et **LA** lorsqu'elles sont porteuses d'un pont 3,6-anhydro. Lorsqu'il y a une substitution, celle-ci est notée **S** pour les groupements sulfate et **M** pour les groupements méthyles, précédée par le numéro du carbone porteur de la substitution sur le cycle du galactose. Dans le cas de l'addition d'un groupement pyruvate sous la forme de cétal cyclique, noté **P**, la position n'est pas précisée puisqu'il est toujours lié aux carbones 4 et 6 de l'unité **D**. Les différentes substitutions sont séparées par des virgules et classées selon un ordre alphabétique et numérique croissant. Ainsi, les principaux carraghénanes commerciaux, à savoir le κ -, le ι - et le λ -carraghénanes sont décrits respectivement par les codes **G4S-DA**, **G4S-DA2S**, et **G2S-D2S,6S** (Tableau IG-9). Les unités glycosidiques, plus exotiques dans les chaînes de carraghénanes, sont aussi codifiées dans cette nomenclature, tel le xylose noté **X**.

Dans le cas des oligosaccharides, la position des différentes unités au sein de la molécule est indiquée par les suffixes suivants : **nr** pour l'unité située en extrémité non réductrice et **nr'** pour l'unité directement adjacente. Pour l'unité située en extrémité réductrice, on utilisera le suffixe **r** et l'on précisera l'anométrie **r α** ou **r β** ; pour l'unité directement adjacente le suffixe sera donc **r' α** ou **r' β** . Ainsi, un DP2 λ -carrabiose sera noté **D2S,6Snr'-G2Sr β** ou **D2S,6Snr'-G2Sr α** suivant l'anométrie (Figure IG-9). Un exemple pour les oligosaccharides de plus grande taille est illustré sur cette même figure. Les oligosaccharides issus de l'hydrolyse des liaisons α -1,3 forment la série des oligo-carrabioses, et ceux issus de l'hydrolyse des liaisons β -1,4 appartiennent à la série des oligo-néo-carrabioses (Figure IG-10). On peut souligner que toutes les carraghénases connues à ce jour clivent les liaisons β -1,4 de ces polymères, et produisent de ce fait des oligosaccharides des séries néo-carrabioses.

La nomenclature de Knutsen *et al.* est celle reconnue par l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry* – McNaught, 1997) et permet une description systématique des molécules polymériques complexes. Elle prend donc de l'importance dans les publications scientifiques traitant des agars ou des carraghénanes. Cependant, il est important de souligner qu'à l'heure actuelle les deux nomenclatures coexistent, les lettres grecques étant toujours communément utilisées pour désigner et classer les différents carraghénanes commerciaux.

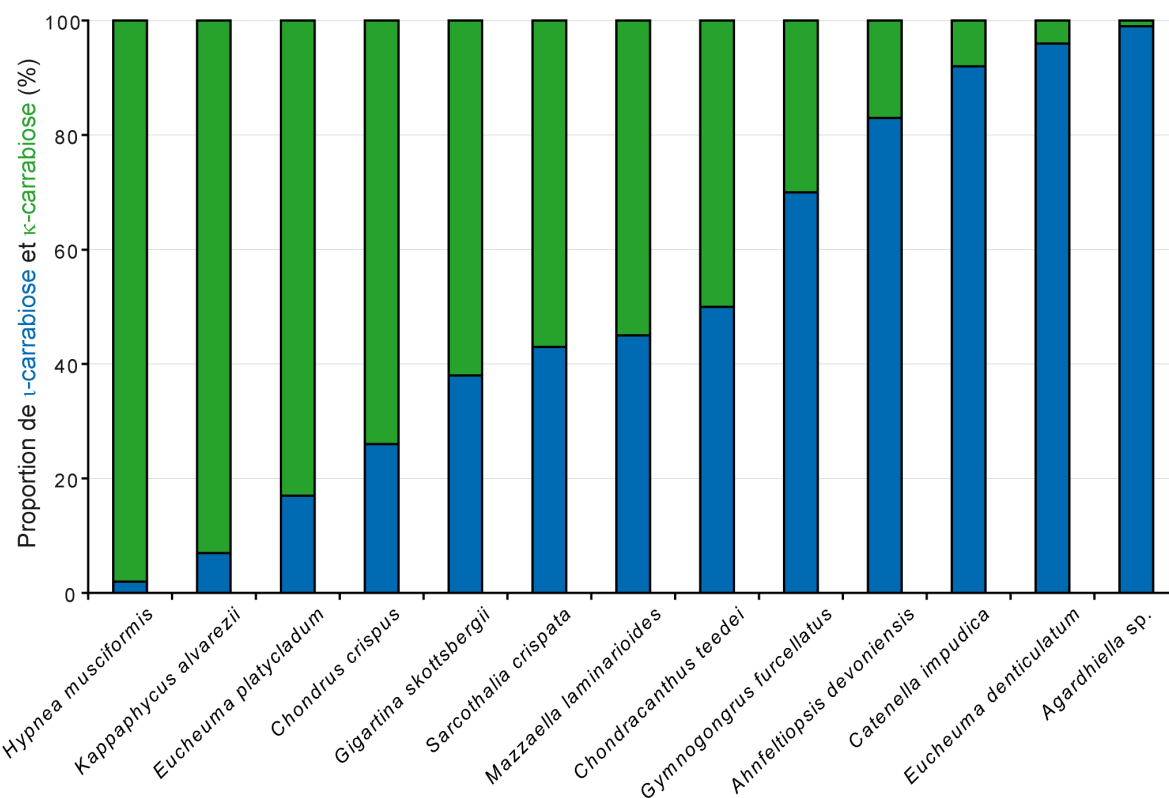


Figure IG-11 : Diagramme de Stancioff (Stancioff, 1981)

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

B. Diversité structurale des carraghénanes

Les carraghénanes présentent une très grande variété de structures chimiques résultant de facteurs biologiques, chimiques et environnementaux. La richesse structurale de cette famille de polysaccharides s'explique par leur nature hétéropolymérique. En effet, il est généralement admis à présent que les carraghénanes ne sont pas des homopolymères se réduisant à la répétition d'un seul motif disaccharidique. La même molécule est au contraire composée de plusieurs motifs, dont l'organisation dans la chaîne polymérique varie elle aussi. Les unités peuvent en effet présenter une distribution en bloc ou être alternées de manière aléatoire. L'étude des propriétés physico-chimiques des carraghénanes a permis de mettre en évidence l'hybridité de ces polymères, dont les propriétés rhéologiques diffèrent en fonction de leur structure chimique. Par exemple, il a été démontré qu'un hybride de κ -/ ι -carraghénane possédait des propriétés fonctionnelles différentes aux carraghénanes purs de structure κ - ou ι -, mais également d'un mélange synthétique de même ratio de ces deux polymères (van de Velde *et al.*, 2001). Ce résultat montre l'importance de la distribution des différents motifs au sein de la chaîne de carraghénane sur les propriétés rhéologiques.

La nature hybride des carraghénanes a été démontrée il y a déjà bien longtemps chez certaines espèces : *Betaphycus gelatinum* présentant des motifs κ -, β - et γ -carrabioses (Greer & Yaphe, 1984a ; Knutsen *et al.*, 1990 ; Knutsen, 1992), *Kappaphycus alvarezii* et *Eucheuma denticulatum* avec des motifs κ - et ι -carrabioses (Bellion *et al.*, 1981) ou *Eucheuma nudum* composés des motifs κ -, ι -, et ν -carrabioses (Greer & Yaphe, 1984a et 1984b). Cependant, l'importance de l'hybridité des carraghénanes a été révélée par l'exploration de leur structure fine grâce à l'analyse des produits d'hydrolyse enzymatique (Bellion *et al.*, 1981 ; Guibet *et al.*, 2009 ; Jouanneau *et al.*, 2011). L'hétérogénéité des carraghénanes est communément illustrée par le diagramme de Stancioff (Stancioff, 1981) qui présente les variations du ratio en unités κ - et ι -carrabioses en fonction de l'espèce de l'algue (Figure IG-11) (Bixler, 1996).

Rajoutant à la diversité structurale, on souligne aussi, chez certaines algues rouges, la présence d'hybrides agar-carraghénanes, appelés carragars. Ces galactanes peuvent ne représenter qu'une très petite fraction de la phase matricielle, quand pour d'autres ils sont les polysaccharides matriciels majoritaires de l'algue (Estevez *et al.*, 2004).

B.1 Origines biologiques de la diversité des carraghénanes :

Diversité des espèces d'algues carraghénophytes et cycle de vie

Plusieurs raisons biologiques sont à l'origine de la diversité structurale des carraghénanes. Comme nous l'avons décrit précédemment, il existe de nombreuses espèces d'algues carraghénophytes (§I-A2) produisant chacune un type de carraghénane. Par exemple, les algues *Kappaphycus alvarezii* et *Eucheuma denticulatum* produisent respectivement du κ - et du ι -carraghénane. D'autres espèces engendrent des structures hybrides comme *Chondrus crispus* produisant du κ -/ ι -carraghénane ou *Furcellaria lumbricalis* produisant du κ -/ β -carraghénane. Suivant les espèces, on trouve également des variations entre les structures de carraghénanes suivant la génération considérée (§I-A3). En effet, chez les genres *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*, et *Sarcothalia*, il a été constaté que la forme gamétophyte synthétise des carraghénanes de la famille kappa (κ -, ι -, μ -, ν -), alors que les tétrasporophytes produisent des carraghénanes de la famille lambda (λ -, θ -, π -, ξ -) (McCandless *et al.*, 1973 ; Craigie, 1990 ; Stortz & Cerezo, 1993 ; Falshaw & Furneaux, 1994 ; Stortz *et al.*, 1994).

B.2 Localisation des différents carraghénanes dans le thalle

Les premières expériences démontrant la diversité des carraghénanes *in situ* remontent à une vingtaine d'années. La localisation des carraghénanes dans la paroi d'une algue a été réalisée par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux, couplés à des fluorochromes, reconnaissant spécifiquement les κ -, ι - et λ -carraghénanes (Vreeland *et al.*, 1992). Des sondes d'hybridation spécifique constituées d'oligo- κ -carraghénanes et d'oligo- ι -carraghénanes fluorescents ont aussi été utilisées (Zablackis *et al.*, 1991). Ces expériences ont montré que la composition en carraghénanes variait suivant leur localisation dans la paroi de l'algue. La sulfatation des carraghénanes augmenterait de la zone axiale du thalle vers sa surface et de la paroi de la cellule vers la matrice intercellulaire (Kloareg *et al.*, 1988) (Figure IG-4). Le κ -carraghénane a été détecté chez *K. alvarezii* dans toutes les cellules exceptées celles de la paroi externe, alors que les ι - et λ -carraghénanes, minoritaires chez cette espèce, ont été détectés dans le cortex de la paroi externe (Zablackis *et al.*, 1991 ; Vreeland *et al.*,

| Espèces | Saison de récolte | Origine | Carraghénanes | | | |
|------------------------------|-------------------|-------------|---------------|---------------------|------------------|--------------------|
| | | | Rendement * | Extraction alcaline | Ratio iota/kappa | Extraction native |
| <i>Kappaphycus alvarezii</i> | octobre-février | Indonésie | 20,0 | kappa/iota | 0,64 | kappa/iota (mu) |
| | octobre-février | Philippines | 30,4 | kappa/iota | 0,72 | kappa/iota (mu) |
| | juin-octobre | Philippines | 68,0 | kappa/iota | 0,7 | kappa/iota (mu) |
| | hiver | Tanzanie | 18,7 | kappa/iota | 0,69 | kappa/iota (mu) |
| | 2 semaines ** | Mexico | 58,1 | kappa/iota | 0,8 | kappa/iota (mu/nu) |
| | 3 semaines ** | Panama | - | - | 0,59 | kappa/iota (mu) |
| <i>Eucheuma denticulatum</i> | octobre-février | Philippines | 39,7 | iota | 0,92 | iota (nu) |
| | fin du printemps | Madagascar | 35,3 | iota | 0,93 | iota (nu) |
| | printemps | Tanzanie | 31,5 | iota/kappa | 0,88 | iota/kappa (nu) |
| <i>Sarcothalia crispata</i> | fin du printemps | Chili | 14,6 | kappa/iota | 0,81 | kappa/iota (mu/nu) |
| | printemps | Chili | 16,7 | kappa/iota | 0,79 | kappa/iota (mu/nu) |

Tableau IG-4 : Composition en carraghénanes de diverses algues
(Adapté de Peirera *et al.*, 2009)

* Rendement exprimé en pourcentage de masse sèche

**Espèces soumise à grandir durant la culture

Au sein des parois médullaires de *K. alvarezii*, le κ -carraghénane a été détecté en plus grande quantité dans la paroi proche de la cellule que dans les matrices intercellulaires, où le ι -carraghénane a été détecté (La Claire *et al.*, 1976 ; Zablackis *et al.*, 1991 ; Vreeland *et al.*, 1992).

B.3 Influence des conditions environnementales

Les conditions environnementales que subissent les algues ont une réelle incidence sur les structures des carraghénanes qui en sont extraits. L'espèce *Kappaphycus alvarezii* par exemple, ne va pas présenter le même ratio en motifs κ - et ι -carrabioses, suivant qu'elle a été récoltée dans les Philippines, en Indonésie, ou en Tanzanie (Tableau IG-4) (Pereira *et al.*, 2009). C'est vrai aussi pour l'espèce *Eucheuma denticulatum*, qui produit un carraghénane hybride avec uniquement des motifs ι - et ν -carrabioses lorsqu'elle est récoltée à Madagascar, alors que des motifs κ -carrabioses sont également présents dans le polymère lorsque l'algue est récoltée en Tanzanie à la même saison (Tableau IG-4) (Pereira *et al.*, 2009). La saison à laquelle l'algue est récoltée est aussi un facteur de variation des structures de carraghénanes. La même espèce récoltée en hiver ou au printemps, ne présentera pas forcément la même structure de carraghénane, cependant il faut souligner que la saison joue essentiellement sur la quantité de carraghénane qui sera extrait de l'algue, qui est bien plus importante en été (Pereira *et al.*, 2009).

B.4 Influence des procédés d'extraction des carraghénanes sur leur structure chimique

Après leur récolte, les algues sont nettoyées à l'eau avec soin afin d'éliminer toutes les impuretés possibles comme le sable, le sel, ou les coquillages. Elles sont ensuite séchées au soleil dans les pays tropicaux, tels que les Philippines ou l'Indonésie, sinon à l'étuve. Les algues sont ensuite souvent broyées en poudre fine afin d'optimiser le contact avec les solvants et d'augmenter ainsi les rendements d'extraction, mais il est également possible de réaliser l'extraction des carraghénanes à partir d'algues entières. Avant l'extraction, il est

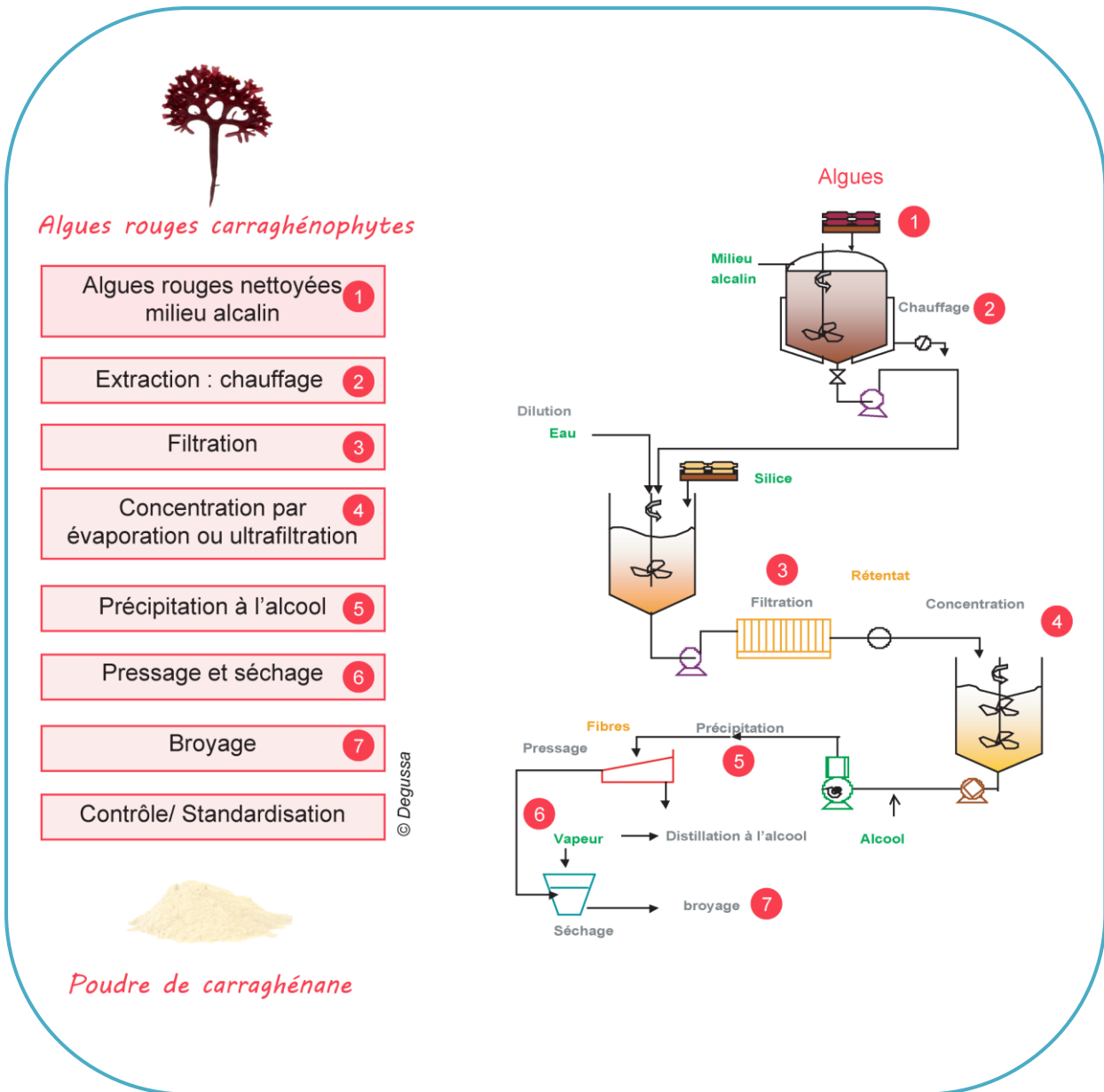


Figure IG-12 : Procédé d'extraction industriel des carraghénanes à partir des algues rouges (d'après la Société Degussa)

important que les algues subissent un traitement préalable au méthanol et à l'acétone afin d'éliminer toute fraction organique soluble (Zinoun & Cosson, 1996). Cette étape permet également la dépigmentation des algues.

Au laboratoire comme dans l'industrie, l'extraction des carraghénanes « natifs », c'est-à-dire qui ne subissent aucune modification chimique, est réalisée en plongeant simplement les algues dans de l'eau distillée chaude (85°C environ) à pH 7 pendant 3h environ (Peirera *et al.*, 2009).

L'extraction des carraghénanes par les industriels est généralement effectuée en milieu alcalin (Figure IG-12) car elle favorise la gélification des polymères par des modifications chimiques. En effet, il a été mis en évidence que les carraghénanes provenant de l'extraction alcaline présentaient des teneurs inférieures en sulfate et une diminution des unités galactose au bénéfice d'unités anhydrogalactose. Cela correspond en fait à la conversion de l'unité galactose-6-sulfate liée en $\beta(1-4)$, unité D6S, des carraghénanes natifs en unité 3,6-anhydrogalactose lors de la conversion alcaline. Ainsi, les précurseurs μ - et ν -carraghénanes sont convertis en κ - et ι -carraghénanes respectivement (Pereira & Mesquita, 2009). Pour ce procédé, le solvant communément utilisé est l'hydroxyde de sodium (NaOH), mais d'autres composés tels que l'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou encore le carbonate de sodium (Na_2CO_3) peuvent aussi être utilisés comme agents alcalins. Les échantillons sont mis dans la solution alcaline, à chaud (85°C environ), avec une agitation vigoureuse durant 3 à 4h, parfois sous pression. Ces conditions permettent d'éviter que l'auto-hydrolyse acide ne diminue le poids moléculaire des carraghénanes, et donc leurs propriétés gélifiantes. Lors de cette étape, les carraghénanes passent en solution. Ils sont soit directement filtrés à chaud pour éliminer tous les résidus insolubles, et notamment la cellulose de la phase squelettique, soit centrifugés puis filtrés sur gel de silice. La solution clarifiée ainsi obtenue peut-être concentrée par évaporation ou ultrafiltration. Le carraghénane peut ensuite être récupéré sous forme solide ou gélifiée par une précipitation à l'alcool, le plus souvent de l'isopropanol. Dans certains cas, le chlorure de potassium est utilisé en remplacement de l'alcool, mais il présente l'inconvénient d'apporter beaucoup d'ions potassium au produit final. Le coagulum obtenu est ensuite pressé pour éliminer un maximum de liquide, puis de nouveau lavé à l'alcool pour éliminer toute trace d'eau. Le matériel obtenu est alors séché puis broyé pour former une

poudre de carraghénane. Le rendement final est relativement faible : 25% (p/p) de poudre de carraghénane par rapport à la masse initiale d'algues sèches (Bixler, 1996).

C. Gélification des carraghénanes

C.1 Conformation des polysaccharides en solution et en gel

Comme pour toutes les macromolécules organiques, on définit trois niveaux d'organisation pour les polysaccharides. La structure primaire correspond à l'ordre séquentiel des résidus dans les chaînes polymériques, en prenant en compte la nature des oses, les conformations anomériques et les ramifications. La structure secondaire définit la forme qu'adopte la chaîne polysaccharidique dans l'espace (pelote, hélice). Enfin, la structure tertiaire décrit la manière dont différentes chaînes s'assemblent pour former des édifices plus complexes.

Lors de la mise en solution des hydrocolloïdes, ces macromolécules s'hydratent, s'éloignent les unes des autres, et s'individualisent. La chaîne du polymère se déplie progressivement grâce à la fixation de molécules d'eau. En solution dans l'eau, les polysaccharides tendent donc à adopter des structures plus ou moins pelotonnées. Ils sont capables de prendre une énorme variété de formes tridimensionnelles, du fait d'un haut degré de liberté conformationnelle autour de chaque liaison glycosidique. En effet, un polysaccharide possède un grand nombre de liaisons qui permettent des mouvements de rotation de la chaîne avec des changements faibles de l'énergie interne. La pelote statistique définit cet état, dans lequel la chaîne fluctue continuellement entre diverses conformations d'énergie voisine. En solution, généralement les forces d'attraction qui favorisent une conformation unique ne sont pas suffisantes pour surmonter la flexibilité de la chaîne (Rees, 1975). Pour vaincre l'entropie conformationnelle, plusieurs interactions non-covalentes doivent être établies, telles que les liaisons hydrogènes, des interactions entre les ions du polymère et du solvant, ou dipolaires. Compte tenu de la faiblesse individuelle de ces

| | |
|---------------------------|---|
| <u>Solution visqueuse</u> | Solution qui possède des propriétés de résistance à la déformation (cisaillement, écoulement,...) supérieure à celle du solvant pur. |
| <u>Gel</u> | Solution dans laquelle le solvant est emprisonné dans un réseau tridimensionnel et ne peut se déplacer librement. Les propriétés mécaniques du gel (dureté, élasticité...) dépendent de la structure de ce réseau macromoléculaire. |
| <u>Hystérésis</u> | Lors d'un changement d'état, le seuil énergétique est différent selon le sens de la transition (sol-gel ou gel-sol par exemple). |
| <u>Synérèse</u> | Phénomène observé lorsque le solvant présent entre les chaînes polysaccharidiques est expulsé et que le gel devient alors de plus en plus rigide. |
| <u>Thixotropie</u> | Sous action mécanique, le gel se désorganise, sa viscosité diminue au cours du temps. Au repos, le gel se réorganise et la viscosité retrouve sa valeur initiale. |

Figure IG-13 : Quelques définitions de rhéologie

différentes interactions, une conformation stable ne peut être atteinte que lorsqu'un grand nombre d'entre elles s'établissent de manière coopérative (Rees & Welsh, 1977).

En contraste avec la multitude de conformations possibles en solution dans l'eau, les polysaccharides cristallisent en adoptant un nombre limité de structures. Celles-ci sont généralement des hélices simples, doubles co-axiales parallèles ou anti-parallèles, voire des hélices triples. On retrouve ces structures notamment dans l'architecture des parois cellulaires. Cependant, dans les polysaccharides, il est rare qu'une conformation stable soit atteinte au sein d'une seule chaîne. En général, elle requiert l'association d'au moins deux segments de séquence régulière. Ces régions sont souvent terminées par des changements de séquence qui empêchent la propagation de la conformation ordonnée et provoquent un changement de direction de la chaîne polysaccharidique. Ces interruptions, appelées *kinks* en anglais, peuvent être dues à la présence d'une ou de plusieurs unités glucidiques différentes, à une ramification du polysaccharide ou à une substitution non régulière. Ces « ruptures » limitent donc la longueur des hélices, cependant elles permettent une réticulation des hélices entre elles, aboutissant à la formation d'un réseau tridimensionnel, donc d'un gel (Rees, 1969). En trop grand nombre, les *kinks* bloquent la mise en place du réseau, mais leur absence limite la réticulation inter-chaîne, empêchant également la gélification (van de Velde *et al.*, 2002). De ce fait, ces interruptions jouent également un rôle important dans la porosité et le taux d'hydratation du gel (Rees & Welsh, 1977). On peut souligner le fait qu'au fur et à mesure que les chaînes s'organisent entre elles, le gel devient de plus en plus rigide conduisant au phénomène de synérèse (Figure IG-13) : le gel se contracte et exsude une partie de la phase liquide.

C.2 Facteurs d'influence sur la gélification des carraghénanes

La viscosité des carraghénanes dépend de nombreux facteurs en lien avec le substrat, comme le degré de polymérisation de la molécule, sa structure chimique, ou sa concentration. Les paramètres physico-chimiques du milieu tels que la température, le pH, ou encore la concentration en sels de la solution, jouent également un rôle important.

C.2.1 Influence de la structure : sulfatation et pont 3,6-anhydro

La dispersion des carraghénanes dans l'eau dépend de l'architecture de leur chaîne osidique. Les différentes structures de carraghénanes présentent des taux de sulfatation distincts, et cette variation joue sur la solubilité du polysaccharide, plus le taux étant élevé, plus la chaîne polysaccharidique ayant tendance à entrer en solution. Les groupements sulfate augmentent le caractère hydrophile du polysaccharide. En effet, les contacts entre les groupements ioniques et les molécules d'eau peuvent être maximisés et les répulsions entre substituants être minimisées par des ajustements conformationnels. De plus, les interactions entre le solvant et les contre-ions du sulfate sont entropiquement et énergétiquement favorisés (Rees, 1972). Par conséquent, les associations inter-chaînes conduisant à la gélification sont, à l'inverse, défavorisées par une sulfatation croissante. Pour que des galactanes fortement sulfatés forment des gels, des concentrations supérieures sont donc requises, afin que la Loi d'Action de Masse compense l'influence des sulfates qui favorisent la conformation en pelote statistique. On peut souligner le fait que le λ -carraghénane, qui porte trois groupements sulfate par disaccharide de répétition, ne forme pas de gel mais une solution très visqueuse. Néanmoins, cette propriété est essentiellement due à l'absence de résidus 3,6-anhydro-galactose. En effet, dès lors qu'un galactane sulfaté présente un pont-3,6-anydro sur l'unité galactose liée en $\beta(1-4)$, il est capable de former des gels à relativement faible concentration (0,5 – 4,0 % p/v). C'est le cas de multiples carraghénanes, comme ceux de structures β - (**G-DA**), κ - (**G4S-DA**), ou ι -carraghénane (**G4S-DA2S**), mais également celui des agars (**G-LA**).

C.2.2 Sélectivité et force ionique

Les carraghénanes sont des polyélectrolytes. La force ionique et la nature des ions modulent leur solubilité et l'élasticité des gels qu'ils forment. Pour cette raison, les gels de carraghénanes sont dits iono-réversibles. En effet, la gélification des carraghénanes est rendue possible par la présence de cations en excès dans la solution. Cela a été démontré par la détection de fibres orientées de κ - ou ι -carraghénane par des études de diffraction aux rayons X (Anderson *et al.*, 1969 ; Arnott *et al.*, 1974). Ainsi, les cations K^+ , NH_4^+ , Rb^+ et Ca^{2+} , de

faible diamètre ionique à l'état hydraté, peuvent s'imbriquer facilement aux hélices, neutraliser partiellement les forces électrostatiques de répulsion des groupements sulfate, et ainsi permettre le rapprochement des hélices entre elles. La présence de cations de plus gros volume à l'état hydraté, tels que le Na^+ et le Li^+ , parvient à la formation de fibres orientées pour le ι -carraghénane mais pas pour le κ -carraghénane. Cependant les fibres les plus cristallines sont obtenues en présence de cations divalents (Arnott *et al.*, 1974). Le calcium par exemple semble se fixer sur les sulfates de deux hélices différentes formant ainsi des liaisons inter-macromoléculaires faites de jonctions ioniques fortes. Une faible quantité de calcium augmente la force du gel, cependant une dose plus élevée est néfaste.

C.2.3 Influence de la température et du pH

La viscosité des solutions de carraghénanes décroît progressivement et de façon exponentielle quand la température augmente. Le phénomène est réversible si l'on opère à un pH proche de 9, et si le chauffage n'est pas prolongé jusqu'à atteindre une dégradation thermique du carraghénane (Towle, 1973). On dit donc des gels de carraghénanes qu'ils sont thermo-réversibles, les changements de température modulant le niveau d'organisation des gels. A température élevée et en solution, les chaînes de κ - et de ι -carraghénanes sont dans un état désordonné sous la forme de bâtonnets semi-rigides. Cet état désordonné est dû à l'agitation thermique. Lorsque la température est abaissée, la transition sol/gel se produit et les carraghénanes passent à un état ordonné (Figure IG-14).

A pH acide, les solutions de carraghénanes sont fragiles, c'est-à-dire que le polymère s'auto-hydrolyse. La viscosité étant proportionnelle au poids moléculaire, il est donc important de rester à un pH neutre ou alcalin pour obtenir une gélification des carraghénanes.

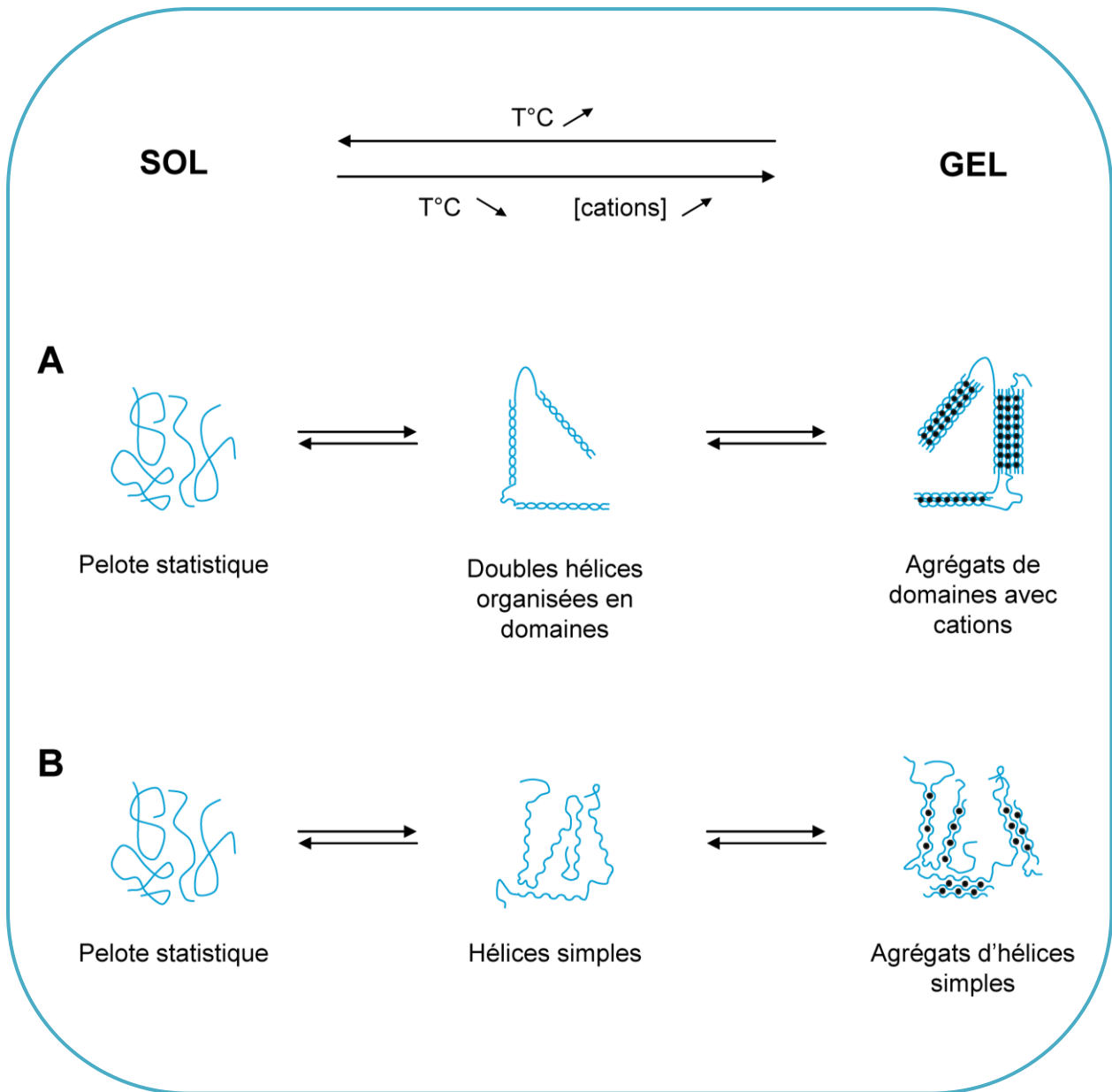


Figure IG-14 : Mécanisme de gélification du κ -carraghénane en présence d'ions K^+

(A) Théorie du « Domain model » (Morris *et al.*, 1980)

(B) Théorie « nested helices model » (Smidsrød & Grasdalen, 1982)

Les points noirs (.) représentent les ions K^+ .

C.3 Mécanisme de gélification des carraghénanes

La gélification correspond à la formation d'agrégats de polymère dans les trois dimensions, immobilisant l'eau renfermée dans les mailles du réseau ainsi formé et donnant à l'ensemble une structure rigide capable de résister à des pressions (Glicksman, 1976). Un tel gel offre à la fois les caractéristiques d'un solide et celles d'un liquide (Glicksman, 1969).

La gélification des carraghénanes se déroule en deux étapes.

La première consiste en la formation d'hélices. Les chaînes polysaccharidiques adoptent une conformation ordonnée engendrée par divers facteurs comme nous l'avons décrit précédemment (la température, les ions, ...). Cependant, le mécanisme de gélification du κ - et du ι -carraghénanes est toujours sujet à débat (Piculell *et al.*, 1998 ; Bongaerts *et al.*, 1999) et oppose deux théories quant aux nombres de chaînes impliquées dans la formation des hélices (Figure IG-14). La première théorie supporte la formation de doubles hélices (Anderson *et al.*, 1969). La seconde théorie suggère, quant à elle, la formation d'hélices simples (Smidsrød & Grasdalen, 1982). La plupart des méthodes de caractérisation utilisées, telles la détermination du poids moléculaire, de l'activité optique, la RMN, la modélisation moléculaire ou encore la calorimétrie (Viebke *et al.*, 1998), ne permettent pas de lever l'ambiguïté entre une double hélice et un dimère d'hélices simples. L'analyse de la dépolymérisation, par voie chimique ou enzymatique, reposant sur l'étude de la réactivité des hélices de carraghénanes, semble plus prometteuse (Hjerde *et al.*, 1998 ; Nyvall-Collen *et al.*, 2009). Toutefois les conclusions de ces études sont pour le moment contradictoires et ne permettent pas de trancher. Néanmoins, dans le cas de la formation de double hélice, celle-ci nécessiterait une structure régulière de chaînes, impliquant une alternance des unités G4S et DA ou DA2S, de conformation 4C_1 et 1C_4 respectivement. La présence dans les chaînes de κ - et de ι -carraghénanes de motifs μ - et ν -carrabioses de conformation 4C_1 et une sulfatation supplémentaire en C6, à l'origine de *kinks* dans la chaîne, limite la formation d'hélices et empêche donc la gélification (Anderson *et al.*, 1969 ; Van de Velde *et al.*, 2002).

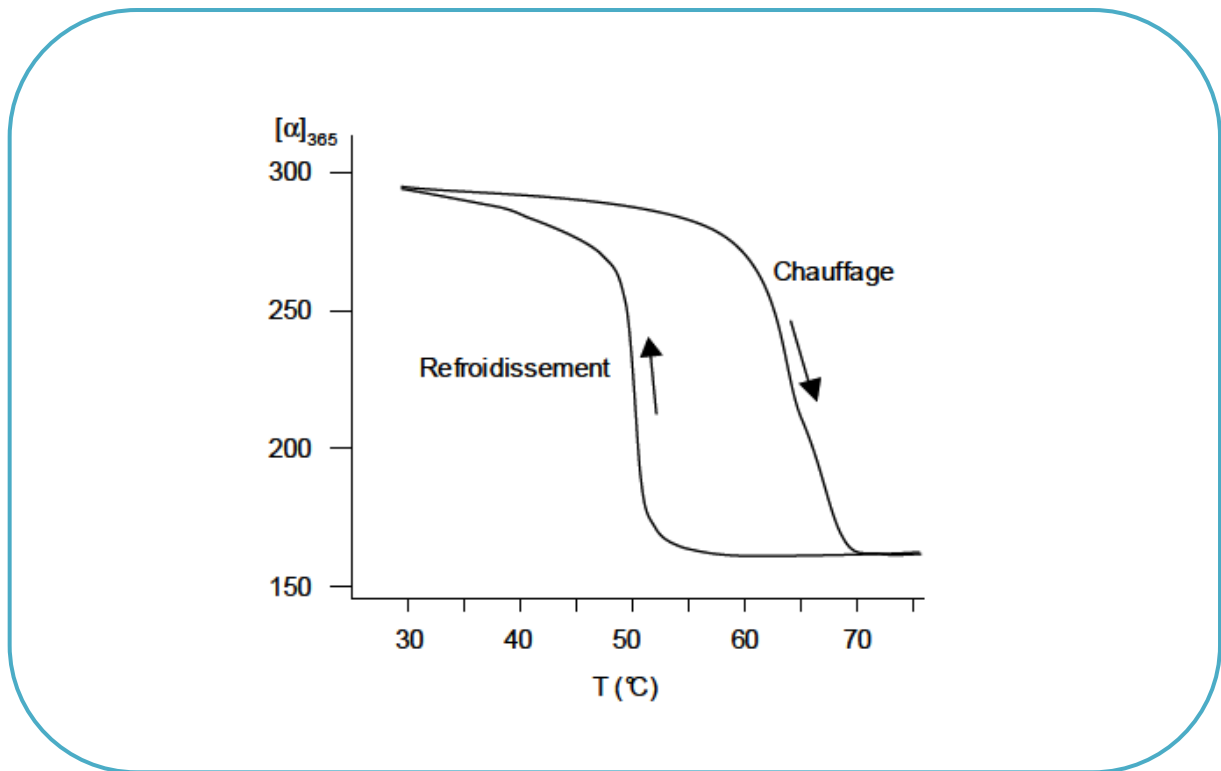


Figure IG-15 : Variation de la rotation optique du κ -carraghénane (0,1%) en solution en KCl (0,1M) en fonction de la température, formant une boucle d'hystérésis (Landry, 1987)

La seconde étape conduisant à la gélification des carraghénanes est l'association des hélices, simples ou doubles, en agrégats (Figure IG-14). La présence de cations, dits "gel-promoteur", permet de neutraliser les charges négatives des groupements sulfates sur l'hélice et engendre ainsi la formation d'un réseau tridimensionnel (Morris *et al.*, 1980 ; Rees *et al.*, 1982). Dans la théorie reposant sur la formation de doubles hélices, celles-ci s'associeraient en domaines de doubles hélices en présence de cations (Anderson *et al.*, 1969 ; Morris *et al.*, 1980 ; Rees *et al.*, 1982 ; Viebke *et al.*, 1994). Dans le cas d'hélices simples, leur association serait induite en présence de cations, en agrégats d'hélices simples (Smidsrød & Grasdalen, 1982 ; Paoletti *et al.*, 1984 ; Rochas *et al.*, 1984 ; Bongaerts *et al.*, 1999 ; Cuppo *et al.*, 2002).

C.4 Propriétés physico-chimiques des carraghénanes

C.4.1 Propriétés des structures idéales

Les carraghénanes présentent dans la nature des structures hybrides. Par conséquent, pour étudier les propriétés physico-chimiques d'une structure de carraghénane en particulier, il est nécessaire de préparer des molécules modèles de manière à se rapprocher au maximum d'une structure homopolymérique.

✓ Le κ -carraghénane

Le κ -carraghénane (Tableau IG-5) est insoluble dans l'eau froide, excepté sous sa forme sodique. En présence des ions K^+ et Ca^{2+} , un chauffage à $60^\circ C$ est nécessaire pour obtenir sa solubilisation. Le κ -carraghénane gélifie fortement. L'absence de la sulfatation en position 2 de l'unité DA permet aux doubles hélices de s'agréger entre elles. Les gels obtenus en présence d'ions K^+ sont rigides, cassants et donnent lieu au phénomène de synérèse (Figure IG-13). On souligne également dans le cas du κ -carraghénane, que la fusion du gel ne suit pas le chemin inverse de la solidification et forme une boucle d'hystérésis (Figures IG-13 et IG-15). Cela a été démontré en mesurant les changements de rotation optique qui sont corrélés aux changements de conformation des polysaccharides (Lawson & Rees, 1970).

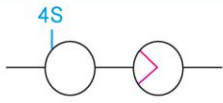
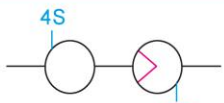
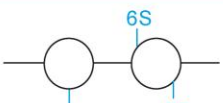



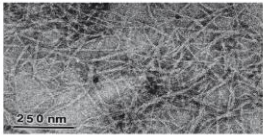
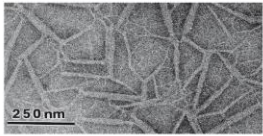
| | κ -carraghénane | ι -carraghénane | λ -carraghénane |
|--|---|--|---|
| Structure |  |  |  |
| Préparations à 1% |  |  |  |
| Image de microscopie électronique du gel |  |  | |
| Solubilité dans l'eau | A chaud (60°C) | | A froid |
| Stabilité à pH neutre ou alcalin | Stable | | |
| Stabilité à pH acide (3,5) | Stable à l'état gélifié | Hydrolyse accélérée par la chaleur | Hydrolyse |
| Gélfication | Oui | | Non |
| Induction des gels | Diminution T°C Augmentation [cations] | | - |
| Propriétés des gels | Thermoréversible Ionoréversible | | - |
| Cations promoteurs de gel | K ⁺ Gel cassant | Ca ²⁺ Gel élastique | - |
| Synérèse | Oui | Non | - |
| Thixotropie | Non | Oui | - |

Tableau IG-5 : Propriétés des gels et solutions des 3 principaux carraghénanes (Adapté de la thèse [Guibet, 2007](#))

✓ Le ι -carraghénane

Le ι -carraghénane (Tableau IG-5) est partiellement soluble à froid et totalement à chaud. Les groupements sulfates situés sur la face extérieure de la double hélice empêchent, par répulsion électrostatique, l'association des hélices entre elles : le gel formé est élastique et ne se rétracte pas. Ce gel peut se liquéfier par action mécanique mais retrouve sa viscosité une fois laissé au repos : il est dit thixotrope (Figure IG-13).

✓ Le λ -carraghénane

Contrairement au κ - et au ι -carraghénanes, le λ -carraghénane (Tableau IG-5) ne forme pas de gel en solution, mais il possède des propriétés viscosifiantes et épaississantes élevées. La viscosité des solutions augmente avec la concentration en λ -carraghénane, et décroît en présence de sels et par élévation de la température. Ces différences de propriétés rhéologiques s'expliquent par des structures tridimensionnelles différentes, conséquence d'un taux de sulfatation élevé des chaînes de λ -carraghénane et de la conformation 4C_1 des unités D2S,6S des motifs λ -. La structure du λ -carraghénane a été peu étudiée mais représenterait un long ruban plat avec un motif G2S-D2S,6S par tour (Rees, 1969).

✓ Le β -carraghénane

Le β -carraghénane pur semble avoir des propriétés semblables à celles de l'agarose. Ce carraghénane est capable de former des gels durs, qui ne sont pas affectés par la présence de sels (Renn *et al.*, 1993). Cependant un tel carraghénane n'est présent qu'en très faibles quantités dans des algues produisant du κ -/ β -carraghénane, ce qui limite son utilisation. Un procédé chimique drastique permet cependant de désulfater du κ -carraghénane pour obtenir du β -carraghénane pur (Kolender & Matulewicz, 2004).

✓ L' α -carraghénane

L' α -carraghénane, relativement peu étudié à ce jour, ne forme pas de gel sous sa forme sodique mais une importante viscosité (Zablackis & Santos, 1986). En présence de

NaCl, la conformation moléculaire de l' α -carraghénane est plus dense que celle du κ -carraghénane (Bourgoin *et al.*, 2008).

✓ Le θ -carraghénane

Suite à la découverte de la très forte abondance de θ -carraghénane dans l'algue *Callophyllis hombroniana* (Falshaw *et al.*, 2005), une espèce indigène de Nouvelle-Zélande, la rhéologie de ce polymère a été abordée récemment (Thanh *et al.*, 2002 ; Doyle *et al.*, 2010). Les études conduites sur du θ -carraghénane pur, obtenu à partir de λ -carraghénane ayant subi un traitement alcalin au NaBH_4 , ont montré qu'il présentait une très faible viscosité par rapport à son précurseur. L'absence de formation de double hélice associée à la gélification, s'expliquerait par la sulfatation de l'unité G (Doyle *et al.*, 2010). Par conséquent, ce carraghénane a peu de potentiel pour une exploitation commerciale comme agent de texture.

C.4.2 Propriétés des structures hybrides

L'intérêt porté aux propriétés rhéologiques des structures hybrides des carraghénanes est beaucoup plus récent, mais gagne de plus en plus l'attention du monde scientifique comme celle des industriels (de Vries, 2002 ; van de Velde *et al.*, 2005 ; van de Velde, 2007). L'hybridité permet en effet de multiplier les propriétés physico-chimiques des substrats. Les relations entre la structure moléculaire et les propriétés fonctionnelles sont devenues un thème de recherche majeur dans le domaine des carraghénanes. Il a été démontré qu'une structure hybride de κ -/ ι -carraghénane présentait des propriétés rhéologiques différentes à un mélange de κ - et de ι -carraghénanes purs (van de Velde *et al.*, 2001). En effet, la composition mais aussi la distribution des différents motifs au sein d'une chaîne de polysaccharide, influence directement les propriétés rhéologiques.

✓ Les hybrides κ -/ ι -carraghénane

Les hybrides κ -/ ι -carraghénanes forment un gel en refroidissant quel que soit le ratio en motifs κ - et ι -carrabioses. L'élasticité du gel diminue avec la teneur en motifs ι -carrabioses

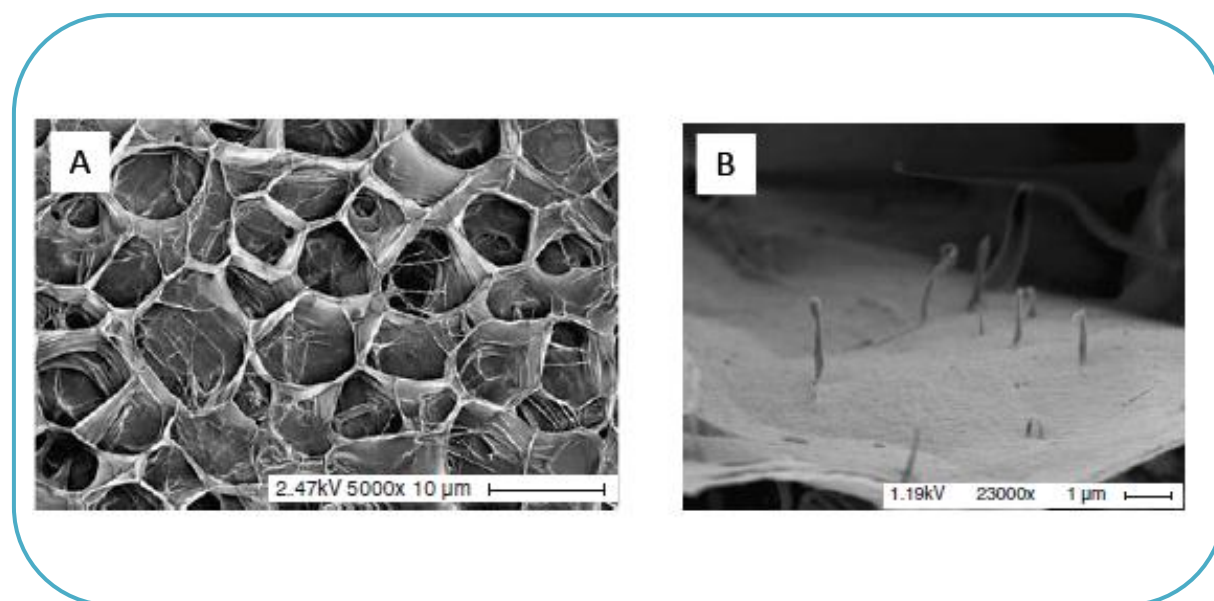


Figure IG-16 : Gels de furcellaran (Tuvikene *et al.*, 2010)

Structure nid d'abeille (A) et unités tentaculaires de structure gélifiée (B)

démontrant qu'elle n'est pas une valeur additive par simple ajout de motifs (Souza *et al.*, 2011). Les hybrides κ - ι -carraghénanes qui ont montré la plus grande élasticité sont ceux de masse moléculaire la plus faible.

✓ Les hybrides κ - μ -carraghénane et ι - ν -carraghénane

Lorsque les précurseurs μ - et ν -carraghénanes sont présents en faible quantité dans les chaînes de κ - et ι -carraghénanes respectivement, les propriétés rhéologiques s'avoisinent de celles décrites pour des κ - et ι -carraghénanes purs respectivement. Cependant à partir de 20% de motifs précurseurs dans la chaîne, les carraghénanes hybrides κ - μ -carraghénane et ι - ν -carraghénane ne peuvent plus former d'hélices (van de Velde, 2007) et sont souvent décrits comme ayant des propriétés rhéologiques similaires au λ -carraghénane.

✓ Les hybrides κ - β -carraghénane

Les κ - β -carraghénanes ont des propriétés rhéologiques proches du κ -carraghénane, mais les gels formés sont moins durs et la présence de sels peut empêcher la gélification (Yermak *et al.*, 1999). Le furcellaran, un hybride naturel de κ - β -carraghénane, est caractérisé par une synérèse faible (Figure IG-13). Les gels les plus forts sont obtenus en présence d'ions Rb^+ , et le procédé de gélification est favorisée en présence de chlorure de K^+ , Rb^+ ou Cs^+ à des concentrations inférieures à 0.1 mol. L-1 (Tuvikène *et al.*, 2010). La caractéristique « nid d'abeille » observée dans les gels de furcellaran (Figure IG-16A) présente une tendance de serrage en présence de chlorures de métaux alcalins. Dans le même temps, la formation d'unités tentaculaires de structure gélifiée a été observée (Figure IG-16B).

D. Propriétés biologiques et applications industrielles des carraghénanes

Les carraghénanes sont des molécules complexes impliquées dans de nombreux processus biologiques, où ils présentent des rôles de signalisation, de reconnaissance et de structure. De ces propriétés naturelles découlent de multiples applications. Les carraghénanes présentent en effet diverses propriétés biologiques en raison de leur ressemblance avec les glycoaminoglycanes (GAGs), de même qu'ils sont devenus un des principaux ingrédients de l'industrie des texturants pour leur capacité gélifiante.

D.1 Propriétés biologiques

Les activités biologiques des polysaccharides comme celles des oligosaccharides sulfatés dépendent de diverses caractéristiques structurales, telles que le degré de sulfatation et la position de ces groupements, le poids moléculaire, le type de sucre ou encore les liaisons glycosidiques (Huamao *et al.*, 2011). On note par ailleurs que la plupart des activités biologiques connues des carraghénanes sont liées à leur sulfatation et à leur ressemblance structurale avec les glycoaminoglycanes (GAGs). Cette famille de polysaccharides sulfatés extraits de la matrice extra-cellulaire animale, dont les principaux représentants sont l'héparine, la chondroïtine, ou le dermatane, est impliquée dans des mécanismes cruciaux pour les animaux.

D.1.1 Propriétés anti-coagulantes et anti-thrombiques

Les propriétés anti-coagulantes des carraghénanes sont bien connues (Carlucci *et al.*, 1997 ; Yamada *et al.*, 2000). Ils agissent de façon similaire à l'héparine, qui est à l'heure actuelle l'anticoagulant le plus utilisé dans la prophylaxie et le traitement de la thrombose (formation de caillots dans le sang) (Kakkar & Hedges, 1989). La densité en charge des carraghénanes n'est pas seule responsable de leur activité anticoagulante, comme le montre l'étude portant sur un carraghénane extrait de l'algue rouge *Botryocladia occidentalis* qui interagit avec les facteurs de coagulation de façon régiospécifique (Farias *et al.*, 2000). Compte tenu des effets secondaires associés à l'utilisation thérapeutique de l'héparine, la

recherche de nouveaux agents anti-coagulants est toujours active, et les carraghénanes comme les oligocarraghénanes, seraient des candidats naturels pour le traitement clinique de la thrombose. Néanmoins, malgré la multitude de polysaccharides sulfatés présentant des activités anti-coagulantes, l'héparine n'en demeure pas moins l'anticoagulant le plus efficace encore à ce jour.

D.1.2 Propriétés anti-tumorales

La littérature scientifique fournit des informations contradictoires sur les effets anti-tumoraux des carraghénanes, qui ont été résumés récemment dans une revue pharmacologique portant sur les propriétés anti-tumorales de polysaccharides non amidonnés (Khotimchenko, 2010).

A la fin des années 80, des études présentaient déjà le caractère anti-tumoral des carraghénanes. Des tests cliniques réalisés sur des rats montraient que des métastases du poumon étaient significativement réduites par l'utilisation de divers polysaccharides sulfatés, dont les plus efficaces sont l'héparine, le fucoïdane et le λ -carraghénane (Coombe *et al.*, 1987). Le κ -carraghénane n'a par contre que peu d'effets dans ce système (Parish *et al.*, 1987). Les propriétés anti-tumorales du λ -carraghénane sont dues à l'inhibition d'héparanases exprimées par les cellules cancéreuses et impliquées dans la pénétration de l'endothélium vasculaire et de sa membrane basale par ces cellules tumorales (Parish *et al.*, 1987). Les carraghénanes inhibent également la fixation de certains facteurs de croissance à leur récepteur membranaire (Faham *et al.* 1998). La production aberrante de facteurs de croissance étant associée à de nombreux désordres comme la prolifération et la néovascularisation des tumeurs (Baird & Bohlen, 1991), les carraghénanes seraient potentiellement des agents anti-cancéreux sélectifs (Hoffman, 1993 ; Hoffman *et al.*, 1995). La recherche d'activités anti-tumorales suscite toujours un fort intérêt, et encore récemment, des études ont montré le potentiel des oligo- λ -carraghénanes pour leur propriétés anti-tumorales et d'immunomodulation chez des souris (Zhou *et al.*, 2004 et 2005). L'importance de modifications chimiques (et notamment de sulfatation) pouvant améliorer ces effets et booster l'immunité anti-tumorale, vient d'être mise en évidence avec des oligo- κ -carraghénanes modifiés (Yuan *et al.*, 2011).

Cependant, on ne peut pas parler des activités anti-tumorales des carraghénanes sans mentionner les recherches de [Tobacman](#), même si elles ne font pas la part belle à ces polysaccharides. D'après son étude, réalisée sur différents modèles animaux, il semblerait qu'une ingestion importante de carraghénanes de faible poids moléculaire, puisse être à l'origine d'ulcères et de tumeurs intestinales ([Tobacman et al., 2001](#)). Quelques années plus tard, [Tobacman](#) et son équipe démontrent à nouveau que l'exposition de cellules intestinales épithéliales humaines cette fois avec des carraghénanes ingérés, entraînerait une mort cellulaire accrue, et réduirait la prolifération et le développement cellulaire en comparaison avec des cellules contrôles non exposées ([Tobacman et al., 2008](#)). Plus récemment, leurs études montrent que l'ingestion des carraghénanes par le biais des additifs alimentaires, réduit l'activité sulfatase dans les cellules humaines provoquant une augmentation des glycoaminoglycanes sulfatés, avec des conséquences potentielles sur la structure et les fonctions de processus cellulaires vitaux ([Yang et al., 2012](#)).

Afin de déterminer quel facteur prévaut sur l'autre entre les activités anti-tumorales et les possibles activités cancérogènes des oligo-carraghénanes, les recherches sur le sujet sont activement poursuivies.

[D.1.3 Propriétés anti-virales](#)

Les polysaccharides sulfatés sont connus pour avoir des propriétés antivirales. Les carraghénanes ne font pas exception, et il a été montré qu'ils pouvaient inhiber sélectivement la réplication de certains virus sexuellement transmissible, notamment le virus du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) communément appelé SIDA, ou encore celui de l'hépatite A ([Witvrouw & DeClercq, 1997](#)). Dans le cas de ce dernier, le κ -, le ι -, et le λ -carraghénanes présentent des indices de sélectivité nettement supérieurs à celui de la ribavirine, qui est la substance anti-virale de référence pour cette infection ([Girond et al., 1991](#)). Les carraghénanes bloqueraient en fait l'étape d'adsorption des virus à la surface des cellules épithéliales ([Pearce-Pratt & Phillips, 1996](#) ; [Carlucci et al., 1997, 2002 et 2004](#)). L'activité antivirale des carraghénanes vis-à-vis de virus opportunistes, tel que l'herpès (HSV) a également été démontrée ([Carlucci et al., 1997](#)). Cette activité augmenterait avec le poids moléculaire et la sulfatation, faisant des λ -, μ - et ν -carraghénanes de bons candidats ([Witvrouw et al., 1994](#) ; [Kolender et al., 1997](#)). Le ι -carraghénane a montré un pouvoir

inhibiteur très important vis-à-vis d'infections aux papillomavirus (Buck *et al.*, 2006 ; Roberts *et al.*, 2007). Dans de toutes récentes études, il apparait que les oligo- κ -carraghénanes présenteraient même une activité contre le virus de la grippe A (Wang *et al.*, 2012).

Les carraghénanes sont des candidats sérieux pour le traitement d'infections virales. Le ι -carraghénane est d'ailleurs passé en tests cliniques pour son aptitude à bloquer la transmission du virus du SIDA *via* les muqueuses (Elias *et al.*, 1997). Une application thérapeutique du carraghénane, le Carraguard®, a été à l'étude sur 6000 femmes en Afrique du Sud entre 2004 et 2007 pour lutter contre le VIH. Les résultats, bien que concluants lors des expérimentations animales, n'ont pas été positifs pour le cas complexe des humains, mais ont permis d'obtenir un jeu de données indispensable pour les études suivantes (Campagne Mondiale pour les Microbicides, 2009).

D.2 Signaux de défense et de virulence dans les interactions plantes / pathogènes

Les plantes supérieures utilisent la diversité structurale des oligosaccharides issus de la dégradation de leur paroi ou de celles des microorganismes qui les agressent pour déclencher des réactions de défense ou des voies de développement (Rörhig *et al.*, 1997). Les mécanismes d'activation de gènes impliqués dans la défense ont été élucidés dans leurs grandes lignes (Fritig *et al.*, 1998 ; Scheel, 1998 ; Sommsich & Halbrock, 1998) et sont initiés par la perception de signaux extracellulaires, généralement des oligosaccharides (Ebel & Mithöfer, 1998). Plusieurs études relativement récentes ont mis en évidence qu'une signalisation oligosaccharidique gouverne également les relations entre les algues marines et leurs agents pathogènes. De nombreux mécanismes de défense sont similaires à ceux identifiés chez les plantes supérieures. Comme les algues marines ont depuis longtemps divergé de la lignée des végétaux terrestres, ces mécanismes ont dû apparaître précocement au cours de l'évolution des Eucaryotes (Potin *et al.*, 1999). Néanmoins, les algues ont tiré parti des spécificités physico-chimiques de leur environnement marin pour développer des voies de défense originales, comme l'émission de composés halogénés ou d'acides aminés modifiés portant des chromophores (Potin *et al.*, 1999).

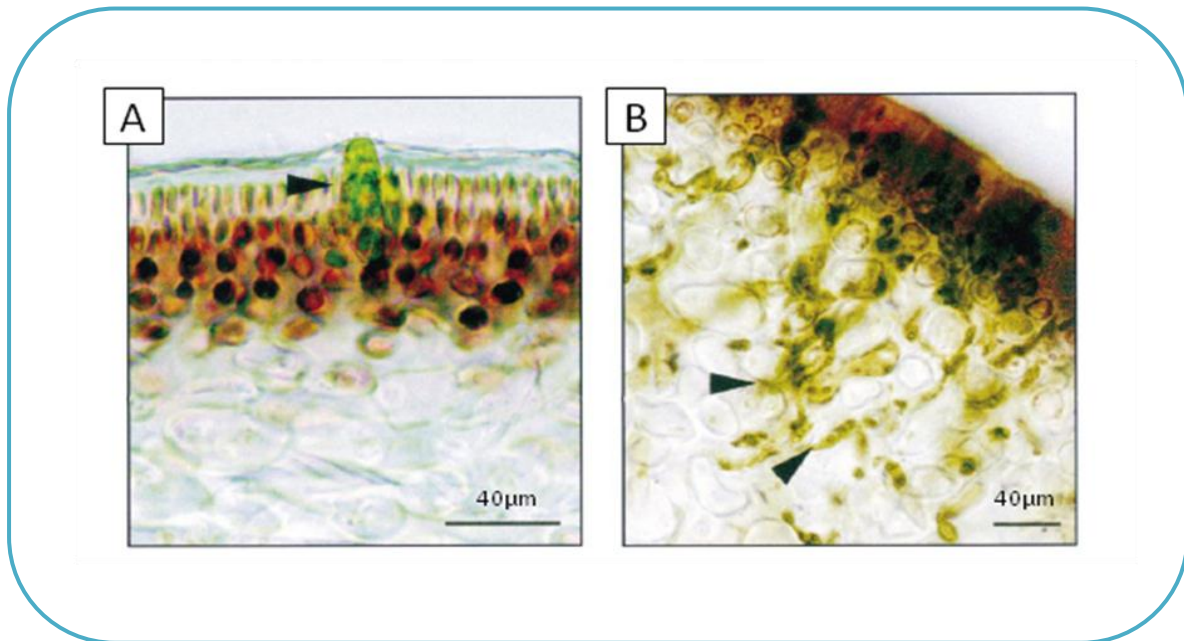


Figure IG-17 : Effet du prétraitement du pathogène *A. operculata* par les oligo-λ-carraghénanes sur l'infection du gamétophyte de *C. crispus* (Bouarab *et al.*, 1999)

- (A) Coupe transversale du gamétophyte infecté par le pathogène non prétraité.
- (B) Coupe transversale du gamétophyte infecté par l'endophyte préalablement traité par les oligo-λ-carraghénanes.

Parmi les travaux récents, on note l'étude de l'interaction entre l'algue rouge *Chondrus crispus* et son pathogène endophyte, l'algue verte filamenteuse *Achrochete operculata*, qui a permis de mettre en lumière que la virulence de ce dernier était gouvernée par la perception d'oligo-carraghénanes (Bouarab *et al.*, 1999). Dans ce cas, les oligo- λ -carraghénane augmente la virulence du pathogène (Figure IG-17) tandis que les oligo- κ -carraghénanes la réduit. Une autre étude montre que les oligo-carraghénanes présentent la capacité d'améliorer l'induction de l'embryogénèse, processus dû au stress, des microspores d'un type de brocoli : *Brassica oleracea var. italica* (Lemmonier-Le Penhuizic *et al.*, 2001).

L'intérêt de l'utilisation des oligosaccharides en agriculture a été souligné depuis plus de 25 ans (Albersheim & Darvill, 1985). Les oligo-carraghénanes apparaissent comme des molécules ayant le potentiel de déclencher préventivement des réactions de défenses chez les plantes (Potin *et al.*, 1999). L'idée de leur utilisation dans la protection raisonnée des cultures est notamment renforcée par la capacité des oligo- κ -carraghénanes à induire chez une plante supérieure (*Rubus*, la mûre) la synthèse de laminarinase, facteur de défense contre les champignons (Patier *et al.*, 1995).

| Composé | Effet | Applications |
|-------------------------|--------------|--|
| κ -carraghénane | Gélifiant | Lait chocolaté Glaces et crèmes dessert Conserve de viande Nourriture pour animaux Gels désodorisants d'atmosphère Immobilisation d'enzymes Cultures <i>in vitro</i> |
| ι -carraghénane | Gélifiant | Desserts Sauces Glaces et crèmes glacées Cosmétiques |
| λ -carraghénane | Epaississant | Desserts Sauces Dentifrice Cosmétiques |

Tableau IG-6 : Utilisation actuelle des κ -, ι - et λ -carraghénanes (Source : CEVA, Pleubian)

D.3 Applications industrielles des carraghénanes

Les propriétés physico-chimiques particulières des carraghénanes sont exploitées industriellement dans divers domaines d'application tels que l'agroalimentaire, la cosmétique ou encore la pharmacie. Chaque structure de carraghénanes a ses utilisations spécifiques en fonction de ses propriétés rhéologiques (Tableau IG-6). La plupart des algues utilisées pour la production de carraghénanes sont issues de cultures, car la demande en matières premières ne peut être satisfaite par les ressources naturelles. Les carraghénanes sont les polysaccharides marins les plus exploités (50 000 t/an) devant les alginates (26 500 t/an) et les agars (9 600 t/an). En 2010, les carraghénanes (561 millions de dollars) se situaient en quatrième position du marché des hydrocolloïdes, après l'amidon, la gélatine et les pectines (Seisun, 2012).

D.3.1 Applications en agroalimentaire

Les carraghénanes représentent un des principaux ingrédients de texture utilisés dans l'industrie alimentaire. Ce sont des ingrédients naturels utilisés depuis des décennies dans ce domaine pour leurs propriétés gélifiantes et épaississantes. Autorisés par l'Union Européenne comme additifs alimentaires depuis les années 1950, ils portent les codes **E407** pour les carraghénanes raffinés, et **E407a** pour les carraghénanes semi-raffinés. En 1996, les carraghénanes représentaient déjà 15% du marché des hydrocolloïdes alimentaires, soit 200 millions US\$ (Bixler, 1996). Suite à la crise de la vache folle cette même année, les industries agroalimentaires se sont davantage orientées vers des alternatives aux mêmes propriétés que la gélatine, tels que les phycocolloïdes. Sur la production mondiale des carraghénanes, estimée à environ 50 000 tonnes par an (Bixler & Porse, 2010), 70 à 80% sont destinés à l'industrie alimentaire, des quels 45 % environ sont utilisés dans les produits laitiers et 30 % dans les produits carnés et leurs dérivés. On estime aujourd'hui qu'un européen consomme en moyenne, sans le savoir, au moins 5 fois par jour des agents de texture issus des algues.

| Utilisation | Application | Fonctions principales | Dose habituelle d'emploi |
|------------------|------------------------------------|---|--------------------------|
| Milieux laitiers | Lait concentré | Stabilisation des matières grasses et des protéines | 0,01 à 0,02 % |
| | Lait cacaoté | Empêche la sédimentation du cacao | 0,02 à 0,03 % |
| | Flan préparé à chaud | Structure gélifiée | 0,02 à 0,03 % |
| | Flan préparé à froid | Structure semi-gélifiée | 0,5% |
| | Crèmes dessert | Epaississant | 0,2 à 0,3 % |
| | Liégeois | Gel thixotrope | 0,3 à 0,4 % |
| | Glaces | Evite la séparation du petit lait | 0,01 à 0,05 % |
| | Boissons lactiques en poudre | Donne du corps | 0,1 à 0,4 % |
| | Glaçage | Stabilisation de la mousse | 0,05 à 0,5 % |
| Milieux aqueux | Desserts à l'eau (Jellies) | Structure gélifiée | 0,8 à 1,2 % |
| | Confitures basses calories | Structure gélifiée | 0,5 à 1 % |
| | Poudre pour jus de fruits et sirop | Suspension et consistance | 0,1 à 0,5 % |
| | Gels à l'eau | Structure gélifiée | 0,8 à 1,2 % |
| | Sauces | Consistance et suspension | 0,4 à 0,6 % |

Tableau IG-7 : Utilisation des carraghénanes dans l'industrie alimentaire (d'après la Thèse Verhaeghe, 2002)

Les propriétés gélifiantes, texturantes et épaississantes des carraghénanes permettent de créer un large éventail de textures selon le type d'extrait et la manière dont ils sont utilisés. Ils fournissent à l'industrie une alternative pour obtenir des solutions visqueuses et des gels plus ou moins fermes. Les carraghénanes sont traditionnellement utilisés dans l'industrie laitière car ils interagissent avec la κ -caséine du lait pour former un gel. La κ -caséine a un point isoélectrique à un pH de 4,4. En dessous de ce pH, la protéine est chargée positivement et interagit avec les carraghénanes chargés négativement. La présence d'ions calcium Ca^{2+} favorise la gélification par formation de ponts Ca^{2+} entre les molécules (Adrian & Assoumani, 1979). En raison de ce phénomène, les carraghénanes entrent dans la composition de nombreux produits laitiers tels que les flans, les yaourts, les crèmes dessert ou encore les glaces (Tableau IG7).

Les carraghénanes servent également de liants dans les produits carnés et leur utilisation est en pleine expansion dans le marché de la viande. Leur caractère chargé stabilise les émulsions eau-graisse pendant la préparation, le stockage et la cuisson de la viande en contrôlant la rétention d'eau ; il en résulte une viande de meilleure qualité. On les trouve donc dans diverses viandes reconstituées et de nombreux plats préparés. Les carraghénanes sont aussi des agents de suspension : dans le lait cacaoté, les vinaigrettes et les jus de fruits avec pulpe par exemple. On peut noter également la présence de carraghénanes dans la fabrication d'aliments pour animaux de compagnie, ou pour le bétail.

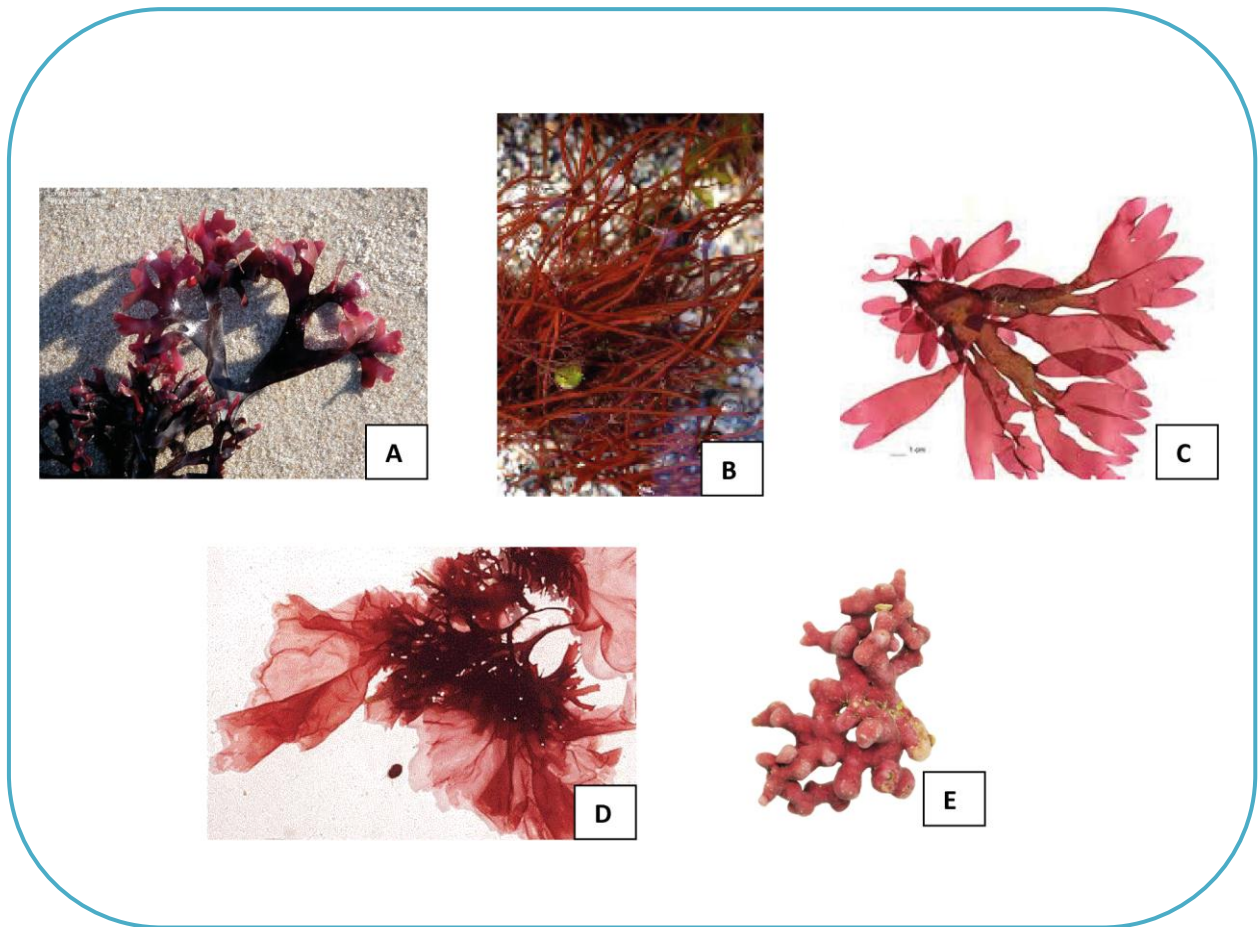


Figure IG-18 : Espèces d'algues rouges autorisées à la consommation par les autorités sanitaires françaises : *Chondrus crispus* (A), *Gracilaria verrucosa* (B) *Palmaria palmata* (C), *Porphyra* sp. (D) et *lithothamnium* sp. (E)

Dans une moindre mesure, même si cela tend à se développer sur les prochaines années grâce à la mode du « Bio », les carraghénanes peuvent aussi être directement consommés par la consommation d'algues comme légumes. Les espèces d'algues rouges autorisées à la consommation par les autorités sanitaires française sont : *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa*, *Palmaria Palmata*, *Porphyra sp.* et *lithothamnium sp.* (Figure IG-18) (Site web Idealg: www.idealg.ueb.eu/macroAlgues/utilisation).

D.3.2 Applications pharmaceutiques

Les carraghénanes entrent également dans la composition de divers produits pharmaceutiques, dont l'exemple le plus connu est le dentifrice (De Ruiter & Rudolph, 1997). Là encore utilisés comme excipients, les carraghénanes permettent ici de stabiliser l'émulsion de la pâte en bloquant l'abrasif à l'intérieur de la matrice du gel. Leur capacité à former des gels aqueux les rendent présents également dans de nombreuses crèmes solaires ou des lubrifiants. En revanche, leur application dans ce domaine ne se limite pas qu'à des actions texturantes. En effet, les carraghénanes possèdent des vertus apaisantes dans le cas d'irritations cutanées et sont présents dans diverses pommades. On retrouve également les carraghénanes dans certains régimes alimentaires comme dans les produits diététiques hypocaloriques. Toujours dans le domaine pharmaceutique, on trouve aujourd'hui des pansements gastriques à base de carraghénate de sodium qui sont commercialisés.

D.3.3 Applications cosmétiques

Les carraghénanes trouvent aussi application dans le domaine cosmétique. En plus de leurs propriétés gélifiantes, stabilisantes et épaississantes, qui permettent de jouer sur les textures et l'onctuosité des crèmes ou autre gel douche, l'intérêt majeur de l'utilisation des carraghénanes dans la cosmétologie est leur fort effet hydratant. Ces polysaccharides étant des hydrocolloïdes, ils présentent la capacité de retenir l'eau pour la délivrer à la peau. Ils favorisent ainsi la réparation cutanée par le biais de l'hydratation. Dans les soins capillaires, les carraghénanes sont très utilisés sous la forme de mucilage (une substance végétale qui devient visqueuse au contact de l'eau) qui va alors présenter des vertus apaisantes, adoucissantes, lisser la fibre capillaire et resserrer les écailles des cheveux. Les carraghénanes

| Propriétés cosmétiques des carraghénanes |
|--|
| Revitalisante |
| Tonifiante des tissus cutanés |
| Raffermissement et prévention des rides et ridules |
| Rééquilibrante sur le plan hydrique, protéinique, vitaminique et minéral |
| Régularisation des problèmes liés aux peaux grasses, sèches ou sensibles |
| Désintoxifiante |
| Amélioration du teint et de l'éclat de la peau |
| Fabrication du silicone végétal |
| Stimulation de la circulation sanguine jouant sur la vitalité de la peau |

Tableau IG-8 : Actions des carraghénanes dans le domaine cosmétique



Figure IG-19 : Shampoing douche contenant du carraghénane à la fois pour ses vertus cosmétique et texturante

interagissent aussi avec les caroténoïdes et donne ainsi une peau douce et des cheveux soyeux (Figure IG-19). Les propriétés stimulantes et hydratantes des extraits d'algues ont été démontrées scientifiquement, notamment par une étude clinique japonaise publiée en 2002 (Fujimura *et al.*, 2002). Les actions revendiquées des carraghénanes sont résumées dans le tableau IG-8. Avec la tendance des cosmétiques Bio depuis les années 2000, on trouve aujourd'hui les carraghénanes dans de nombreuses préparations cosmétiques : savon, crème, gel douche, lait démaquillant, déodorants en stick, produits capillaires ou encore rouge à lèvres. Et l'utilisation de ces extraits naturels est même revendiquée, représentant une nouvelle valeur marketing à ces produits. Le monde de la cosmétique ne cesse d'évoluer et les recherches sur les algues apportent régulièrement des nouveautés dans ce domaine.

D.3.4 Applications dans l'industrie textile, la peinture et les procédés de traitement

Même s'il est difficile de trouver des détails dans les procédés de fabrication dans ce domaine, les carraghénanes sont également impliqués dans l'industrie du textile et de la peinture. L'usage le plus connu est leur utilisation dans l'impression de la soie (Japon). Dans l'industrie textile, ils servent aussi d'agents de finition. Dans le domaine de la peinture, les carraghénanes sont utilisés comme épaississant dans la peinture à base d'eau, dans la couleur en céramique et comme agent de suspension pour le graphite. Tout comme les alginates issus des algues brunes, on retrouve aussi l'utilisation des carraghénanes dans le traitement du papier ou dans le traitement des eaux.



Figure IG-20 : Poudres de carraghénanes trouvées dans le commerce, kits et exemples d'applications de la cuisine moléculaire

D.3.5 Une nouvelle mode : la cuisine moléculaire

Dès le XVIII^{ème} siècle, beaucoup de chimistes, comme Lavoisier par exemple, ont exploré la cuisine et les transformations culinaires, sans savoir s'ils faisaient vraiment de la science des aliments ou de la cuisine à proprement parler. La cuisine moléculaire est en fait issue de la gastronomie moléculaire, une discipline inventée à la fin des années 80 par deux scientifiques passionnés de cuisine : le physico-chimiste français Hervé This (UMR 1145, INRA AgroParisTech) et le physicien anglais Nicholas Kurti (Université d'Oxford). Au départ, l'idée, d'un point de vue scientifique est simple. En prouvant scientifiquement les meilleurs moyens de se servir des aliments et les meilleures façons d'élaborer des recettes, on peut produire industriellement des produits de très haute qualité (This, 1996). Bien sûr, les grands chefs cuisiniers n'ont pas tardé à s'emparer de cette science pour la mélanger à leur art culinaire. Ainsi est née la cuisine moléculaire qui fait la gloire des chefs qui s'y sont consacrés. La cuisine moléculaire est aujourd'hui un art culinaire permettant d'explorer de nouveaux goûts et de nouvelles textures. Elle transforme de simples ingrédients tous naturels en surprenants mets créatifs, mais aussi gustatifs et visuels. Perles de jus de fruits ou de Thé vert, glace sans sorbetière à l'azote liquide, chantilly de chocolat ou émulsion de foie gras sont quelques exemples de cette cuisine créative.

L'un des principaux ingrédients dits « innovants » utilisés dans cette nouvelle cuisine est le carraghénane ! D'autres extraits d'algues sont également utilisés comme l'agar-agar ou l'alginate, de même que des extraits de plantes telles que les gommes de guar, tara, de caroube ou xanthane. Vendues sous forme de poudre, on trouve dans le commerce aujourd'hui les 3 principales structures de carraghénanes (kappa-, iota- et lambda-carraghénanes) permettant de jouer sur la gélification des préparations. Dans le domaine de la cuisine moléculaire, les carraghénanes sont décrits comme des fibres végétales solubles formant des gels transparents, neutres en goût, et n'apportant pas de calories. Bien que déjà largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, ces ingrédients sont aujourd'hui récurrents dans la cuisine à domicile et chez les restaurateurs.

Comme certains ingrédients, il est conseillé de pré-mélanger les carraghénanes avec d'autres ingrédients secs (amidon, sel, sucre, poudre de lait...) pour mieux les disperser à froid sous agitation. La solubilisation se fait à froid et sous agitation pour les carraghénanes de structure lambda. La solubilisation est obtenue au cours du chauffage (température > 70°C) et sous agitation pour les carraghénanes de type kappa et iota. Ces derniers types de carraghénanes sont employés comme « ingrédient retard » dans des plats où l'on veut un gel et peu de viscosité puisqu'ils ne se dissolvent pas en dessous d'environ 70°C, et donc ne provoque pas d'épaississement de la préparation. Le gel obtenu peut être chauffé et maintenu tiède ou sous forme de gelée (jusqu'à 50°C). Cependant ce gel est tout de même réversible à la chaleur (>50°C).

D.4 Législation et mise en garde

Bien qu'autorisés dans l'alimentation humaine comme additif alimentaire par la FAO (*Food and Agriculture Organisation* – Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture), les doutes relayés par Tobacman quant à l'innocuité des carraghénanes font l'objet de débats sur ces polymères. On note aussi que le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) répertorie les carraghénanes dégradés et natifs comme substance à risque. Parmi les effets secondaires relevés : des ulcères, des complications gastro-intestinales très diverses, l'affaiblissement du système immunitaire, des dommages hépatiques, des symptômes cutanéomuqueux ou des allergies, et la diminution de l'absorption de certains minéraux (calcium et potassium). Cependant, les effets observés ont pour le moment été réalisés dans la quasi-totalité sur des animaux et avec des ingestions de carraghénanes extrêmement importantes, bien loin des quantités qui peuvent être ingérées par le biais des additifs alimentaires. Les dernières études en date de Tobacman *et al.* relatent toutefois des carraghénanes consommés comme additifs, et fait part des risques potentiels à leur ingestion. La première étude montre que les carraghénanes altèrent la tolérance au glucose et augmente la résistance à l'insuline, et suggère de ce fait que la présence de carraghénanes dans l'alimentation humaine peut contribuer à l'apparition du diabète (Bhattacharyya *et al.*, 2011). La seconde prône la vigilance du fait de leur capacité à réduire l'activité sulfatase des cellules épithéliales humaines (Yang *et al.*, 2012).

Pour ces raisons, accusés depuis quelques temps d'être irritants pour le système digestif, la question de la sécurité d'emploi des carraghénanes a été posée récemment. Une enquête a été conduite par le JECFA, un comité joint d'experts qui rassemble la FAO et l'OMS (*Organisation Mondiale pour la Santé*), et qui a conclu en 2007 que les carraghénanes ne présentaient pas de danger pour la santé en tant qu'additifs alimentaires. Ils avaient d'ailleurs, pour cette raison, été classés dans la catégorie des additifs alimentaires à « Dose Journalière (DJA) non spécifiée ». Aujourd'hui la limite conseillée d'ingestion est de 75 mg/kg. De plus, la FDA américaine (Food and Drug Administration) classe GRAS (*Generally Recognized as Safe*_Généralement reconnu comme sûrs) de niveau 3 les carraghénanes, le niveau 3 étant : « *Bien qu'il n'existe pas de preuve, en l'information disponible sur la substance, démontrant un danger pour le consommateur lorsqu'elle est utilisée aux niveaux et de la manière actuels, des incertitudes existent requérant la conduite d'études supplémentaires* ». On note dans le Journal Officiel de l'Union Européenne en date du 22 mars 2012, le renouvellement de l'autorisation de la consommation des carraghénanes comme additif alimentaire.

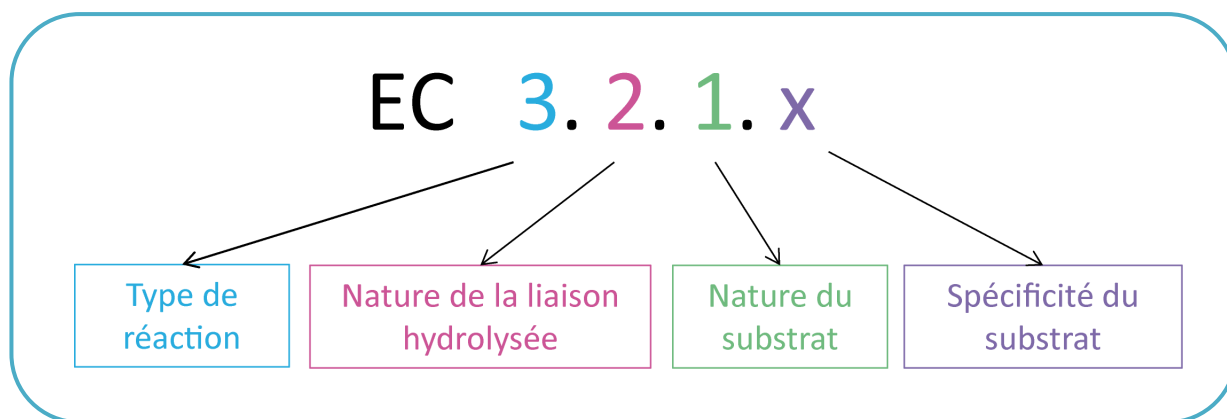


Figure IG-21 : Classification numérique des enzymes avec la nomenclature EC selon l’IUBMB

A titre d’exemple, les numéros présentés sont ceux associés au cas des glycoside-hydrolases.

Figure IG-22 : Interface du site web CAZY (<http://www.cazy.org>)

II – LES ENZYMES DE MODIFICATION DES CARRAGHENANES

Les enzymes sont les catalyseurs du monde vivant. Par conséquent, il en existe un nombre extrêmement important. Parmi elles, les enzymes actives spécifiquement sur les sucres, appelées les cazymes (*carbohydrate active enzymes*), sont très diverses reflétant la richesse structurale des carbohydrates.

L'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) classe l'ensemble des enzymes en fonction du type de réaction qu'elles catalysent selon un numéro EC (universellement utilisé). Le premier numéro correspond au type de réaction, le second numéro indique la nature de la liaison hydrolysée, et le troisième révèle la nature du substrat (Figure IG-21). Ainsi, les glycoside-hydrolases par exemple, portent le code EC 3.2.1.x : 3 pour hydrolyse, 2 pour glycosyl et 1 pour O-glycosyl. Enfin, le x est l'ordre d'apparition de la nouvelle fonction et désigne la spécificité du substrat. En effet, le site de reconnaissance de l'enzyme (constitué de quelques acides aminés) lui permet de reconnaître spécifiquement qu'un seul substrat ou groupe possédant une architecture spatiale très voisine complémentaire. Néanmoins, cette classification n'est pas suffisante car elle ne prend pas en compte les caractéristiques structurales des enzymes.

Le grand nombre et la grande diversité des cazymes rends difficile la compréhension moléculaire au niveau des séquences des spécificités de substrats. Par conséquent, pour répondre à la nécessité de mieux refléter les relations structurales et évolutives des enzymes, une nouvelle classification a été développée, basée sur les similitudes des séquences d'acides aminés (Henrissat & Davies, 1997). Cette classification a également pour finalité de prédire la spécificité de substrat d'une cazyme à partir de sa seule séquence. En s'appuyant sur les similarités de séquence d'acides aminés, cette classification corrèle davantage avec le mécanisme des enzymes et le repliement de la protéine, que sur la spécificité du substrat. A ce jour, la base de données CAZY (www.cazy.org) couvre approximativement 300 familles de protéines, répertoriées en 5 classes d'activités : 130 familles de glycoside-hydrolases, 94 glycosyl-transférases, 22 polysaccharide-lyases, 16 carbohydrate-estérases et 64 carbohydrate-binding modules (*données recensées en août 2012*). Ces familles ont été créées

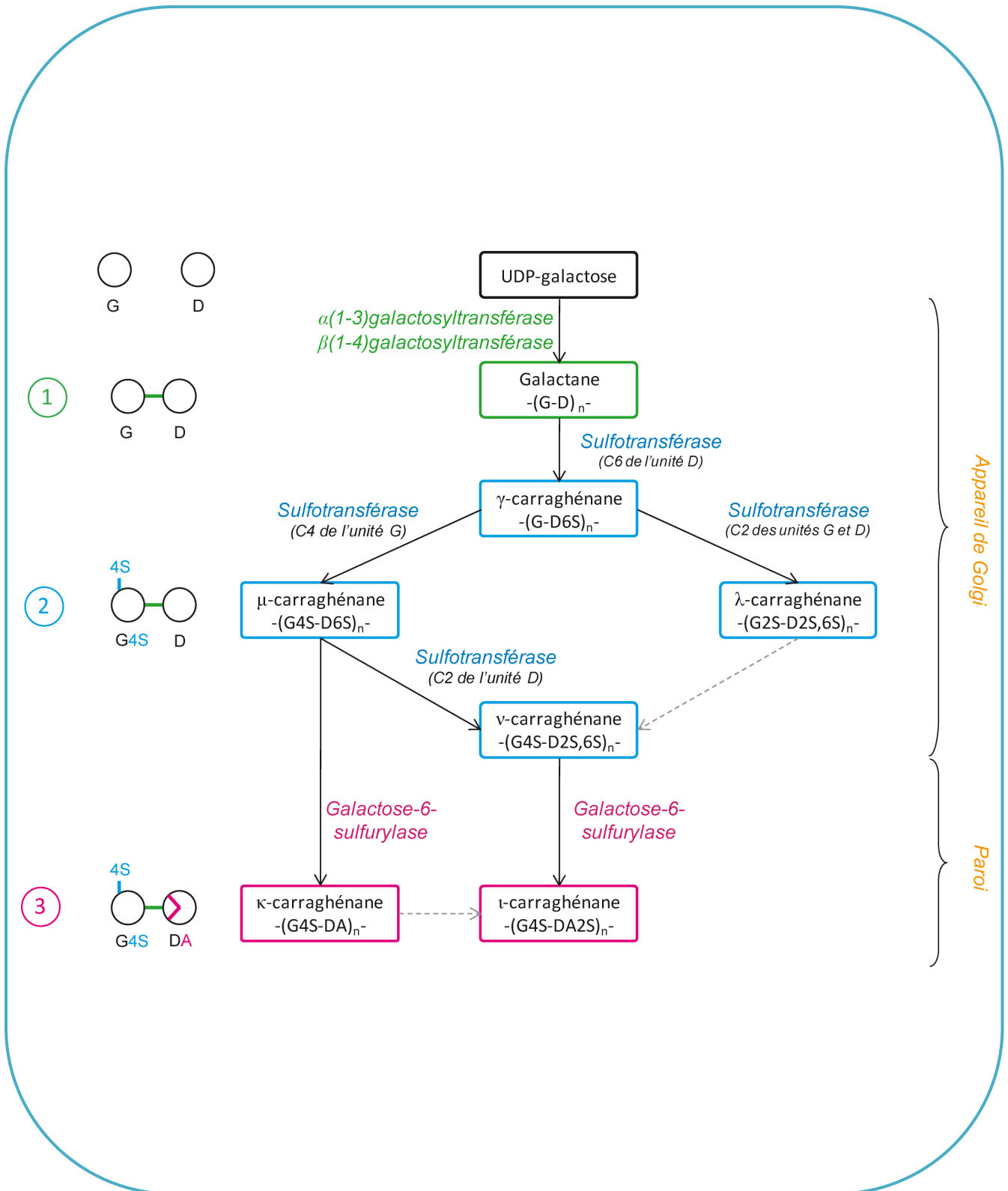


Figure IG-23 : Voie de biosynthèse hypothétique des carraghénanes (d'après Craigie & Wong, 1978)

sur la base de protéines caractérisées expérimentalement, et sont peuplées par les séquences des bases de données publiques présentant des similarités significatives. Les informations biochimiques des protéines sont continuellement actualisées grâce à la littérature et aux informations structurales (Cantarel *et al.*, 2009). Cette classification est consultable sur le site web CAZY (Carbohydrate-Active enZYmes) (Figure IG-22).

A. Les enzymes impliquées dans la biosynthèse

La biosynthèse des carraghénanes est un processus complexe et relativement mal connu. Les connaissances actuelles reposent uniquement sur un schéma de biosynthèse hypothétique (Figure IG-23) basé sur l'analyse structurale des carraghénanes et la caractérisation de certaines enzymes du processus (Craigie & Wong, 1978). Il n'y a actuellement pas de vue globale sur les mécanismes de synthèse de ces polysaccharides, mais plutôt un ensemble de données récoltées à différentes étapes. Toutefois, le schéma de biosynthèse prend en compte la coexistence de différents motifs carrabiose dans les chaînes de carraghénane. La biosynthèse des carraghénanes repose sur l'action de 2 types d'enzymes pour la formation des précurseurs, ou de 3 pour celle des carraghénanes matures. Ainsi, la constitution du squelette de galactane a lieu dans l'appareil de Golgi par une étape de polymérisation *via* des galactosyl-transférases. Ce polymère neutre est ensuite sulfaté grâce à des sulfotransférases. Enfin, les sulfurylases interviennent dans la paroi pour former le pont 3,6-anhydro sur les unités D (Figure IG-23).

A.1 Les galactosyl-transférases

Les galactosyl-transférases (EC 2.4.1.x) catalysent le transfert des unités galactose. Elles représentent une sous-famille d'enzymes de la famille des glycosyl-transférases, et sont répertoriées sous le numéro 31 (GT 31) (Henrissat *et al.*, 1997).

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, la

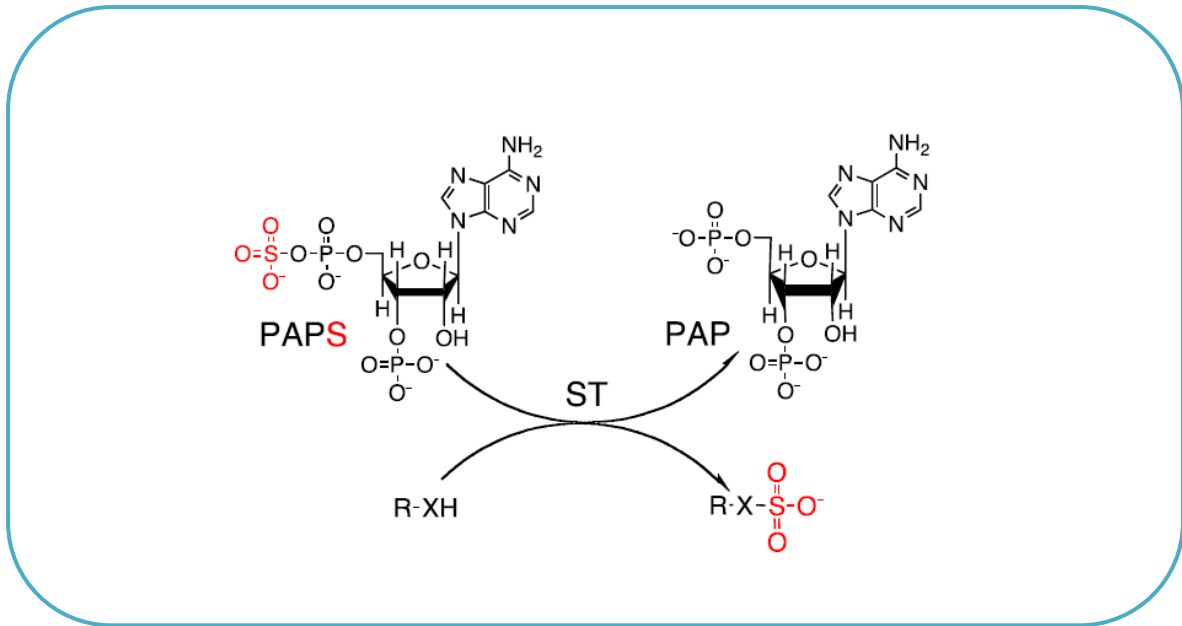


Figure IG-24 : Transfert d'un groupement sulfate sous l'action d'une sulfotransférase (ST) à partir du donneur PAPS à un accepteur R-XH (d'après Paul *et al.*, 2012)

R = sucre, peptide ou petite molécule cytosolique.

Lorsque X = O, la ST est une O-ST et lorsque X = NH/NR la ST est une N-ST.

première étape interviendrait dans l'appareil de Golgi (Mc Candless & Craigie, 1979), avec la formation d'un polysaccharide neutre, le galactane (Figure IG-23). Les galactosyl-transférases transfèreraient une unité glycosidique d'un nucléotide diphosphate-ose (NDP-ose) vers une chaîne polysaccharidique en extension (Leloir, 1964 ; Leloir, 1971). Cette polymérisation se ferait, dans le cas des carraghénanes, à partir de l'UDP-glucose produit par la photosynthèse, converti en UDP-D-galactose *via* l'action de l'UDP-glucose-4-épimérase (Manley & Burns, 1991 ; Prosselkov *et al.*, 1996 ; Goulard *et al.*, 1999). Aucune galactosyl-transférases de *Rhodophycées* n'a été isolée à ce jour. Cependant des gènes de galactosyl-transférases ont été identifiés dans le génome de l'algue rouge *Chondrus crispus* (Jonas Collen, communication personnelle, travaux en cours de publication). Compte-tenu des l'alternance des liaisons $\alpha(1-3)$ et $\beta(1-4)$ dans les carraghénanes, on peut supposer l'existence de deux galactosyl-transférases différentes, intervenant chacune pour un type de liaison. Quelque soit le mécanisme exact, le précurseur des carraghénanes est un polymère régulier de α -1,3-D-galactosyl- β -1,4-D-galactose (Craigie & Wong, 1978).

A.2 Les sulfotransférases

Les sulfotransférases portent le code EC 2.8.2.x de la classification faite par l'IUBMB. Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement sulfate entre une molécule ayant un rôle de donneur et un composé accepteur portant une fonction alcool ou amine. Le donneur le plus commun est le 3'-phosphoadénisone-5'phosphosulfate (PAPS) (Figure IG-24). Les accepteurs sont généralement des protéines, des lipides, des stéroïdes ou des carbohydrates. Le transfert de groupement sulfate est une réaction importante pour les métabolismes chimiques (Paul *et al.*, 2012). Deux classes de sulfotransférases peuvent être distinguées chez les eucaryotes : les sulfotransférases cytosoliques (appelées SULTs) qui sulfatent les petites molécules telles les hormones, les amines et les xénobiotiques incluant les drogues ; et les sulfotransférases associées à la membrane (appelées Golgi-résident) qui sulfatent de grands substrats comme les carbohydrates ou des résidus tyrosine sur une protéine (Bojarova & Williams, 2008).

La seconde étape de la biosynthèse des carraghénanes consisterait donc à la sulfatation du polymère neutre de galactane *via* l'action de sulfotransférases. Cette sulfatation serait réalisée de façon spécifique, et ferait donc intervenir plusieurs enzymes de ce type, pour

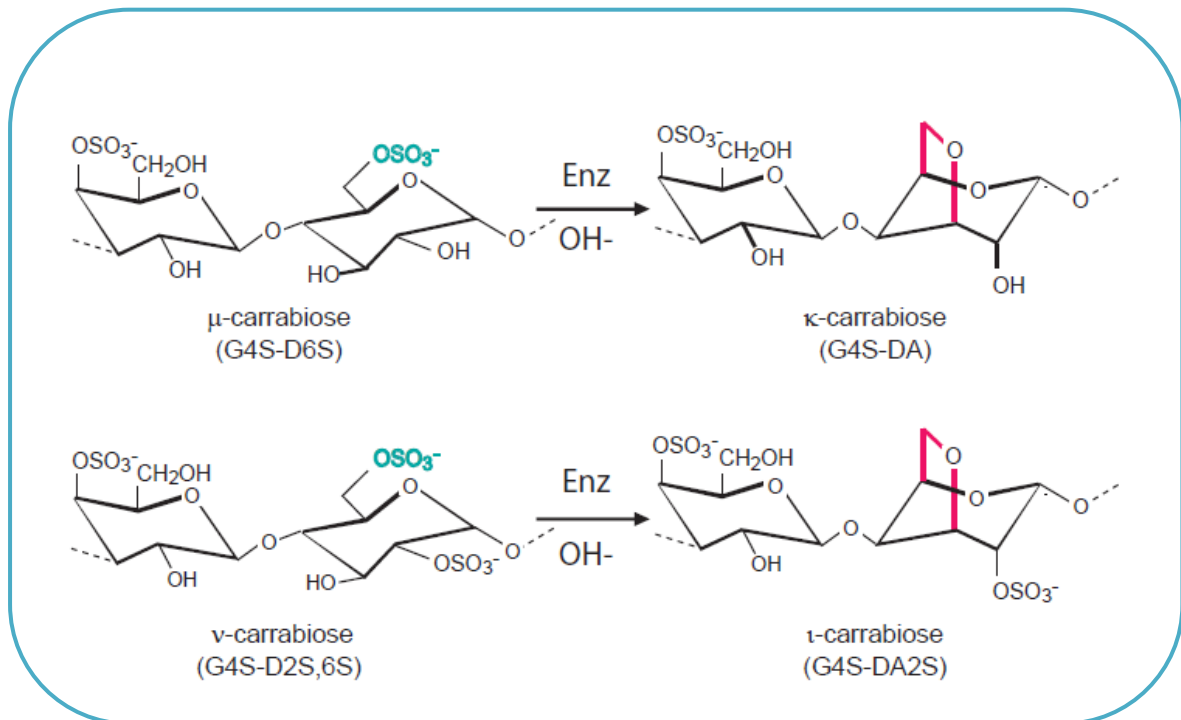


Figure IG-25 : Formation des disaccharides de répétition des κ - et τ -carraghénanes, générés enzymatiquement par leur précurseurs biosynthétiques respectifs, le μ - et le ν -carraghénanes

aboutir aux différentes structures de carraghénanes. L'incorporation du sulfate dans les carraghénanes a été démontrée en cultivant des algues rouges en présence de sulfate radiomarqué au ^{35}S (Mc Candless & Craigie, 1979 ; Millard & Evans, 1982). Cela a permis de montrer que l'étape de sulfatation par les sulfotransférases se déroulait dans l'appareil de Golgi également (Tveter-Gallagher *et al.*, 1981) et non au sein de la paroi comme précédemment supposé (La Claire & Dawes, 1976). Les autres substitutions (méthylation, pyruvation) interviendraient probablement aussi à cette étape mais aucun mécanisme n'a été caractérisé à ce jour.

A.3 Les sulfurylases

De nombreuses appellations désignent les sulfurylases, catalysant la formation du pont 3,6-anhydro, telles que les sulfoéliminases ou les sulfohydrolases. Le nom officiel de cette classe d'enzymes selon l'IUBMB est les galactose-6-sulfurylases, et sont répertoriées sous le code EC 2.5.1.5.

La formation du pont 3,6-anhydro sur les unités galactoses liées en $\beta(1-4)$ est une spécificité des carraghénanes et des agars. Cette réaction a une importance cruciale sur les propriétés physico-chimiques des polymères (§II.C.2.1) car elle permet de moduler les caractéristiques gélifiantes des galactanes sulfatés. Pour ces raisons, les sulfurylases commencent à gagner l'intérêt des industriels à des fins biotechnologiques. Ces enzymes entraînent en effet la même réaction que la soude lors de l'extraction alcaline des carraghénanes, mais avec un procédé enzymatique donc respectueux de l'environnement. Ainsi, dès 1961, Rees isolait une enzyme de l'algue rouge *Porphyra umbilicalis* qui agit sur le porphyran (agar sulfaté) en catalysant simultanément le clivage de la liaison C-O de l'ester sulfate en C6 des unités L-galactose, et la formation d'un pont anhydre entre les carbones C3 et C6 (Rees, 1961). L'existence des sulfurylases dans le cas des carraghénanes a par la suite été démontrée : des galactoses-6-sulfurylases permettant de convertir le μ - en κ -carraghénane ont été mises en évidence chez *Mastocarpus stellatus* (Lawson & Rees, 1970), puis chez les formes haploïde et diploïde de *Chondrus crispus* (Wong & Craigie, 1978). Plus récemment, deux galactose-6-sulfurylases catalysant la conversion du ν - en ι -carraghénane ont été purifiées et caractérisées chez *Chondrus crispus* (Genicot-Joncour *et al.*, 2009).

Le mécanisme enzymatique conduisant à la formation du pont 3,6-anhydro dans les agars et les carraghénanes est, à ce jour, inconnu. Néanmoins, le pont 3,6-anhydro est probablement le résultat d'une substitution nucléophile où le groupement sulfate localisé en position 6 est remplacé par le groupement hydroxyle de la position 3, de façon similaire à la réaction qui a lieu lors du traitement alcalin des carraghénanes (Ciancia *et al.*, 1997 ; Viana *et al.*, 2004). La conversion des unités μ - et ν -carrabioses en leur dérivés matures réduit considérablement la nature hydrophile des résidus galactose, inverse la configuration chaise de 1C_4 en 4C_1 , et a pour conséquence de permettre au carraghénane d'adopter la conformation en hélice requise pour la transition sol/gel (Lawson & Rees, 1970 ; van de Velde, 2002a).

Par conséquent, après l'étape de sulfatation, les polysaccharides sulfatés sont transportés par le réticulum endoplasmique et intégrés à la paroi (Figure IG-23) où s'effectue, par action des sulfurylases, la conversion des précurseurs μ - et ν -carraghénane en leur forme mature κ - et ι -carraghénane respectivement. Cette étape induisant une gélification importante des chaînes, les carraghénanes seraient transférés sous leur forme non mature, soluble, et la conversion interviendrait probablement *in situ*, dans la paroi.

On peut noter qu'aucune galactose-6-sulfurylase permettant la conversion du λ - en θ -carraghénane n'a été isolée à ce jour. Celle permettant de convertir le μ - en κ -carraghénane, isolée du tétrasporophyte de *Chondrus crispus* (Wong & Craigie, 1978), est d'ailleurs inhibée par le substrat λ -carraghénane.

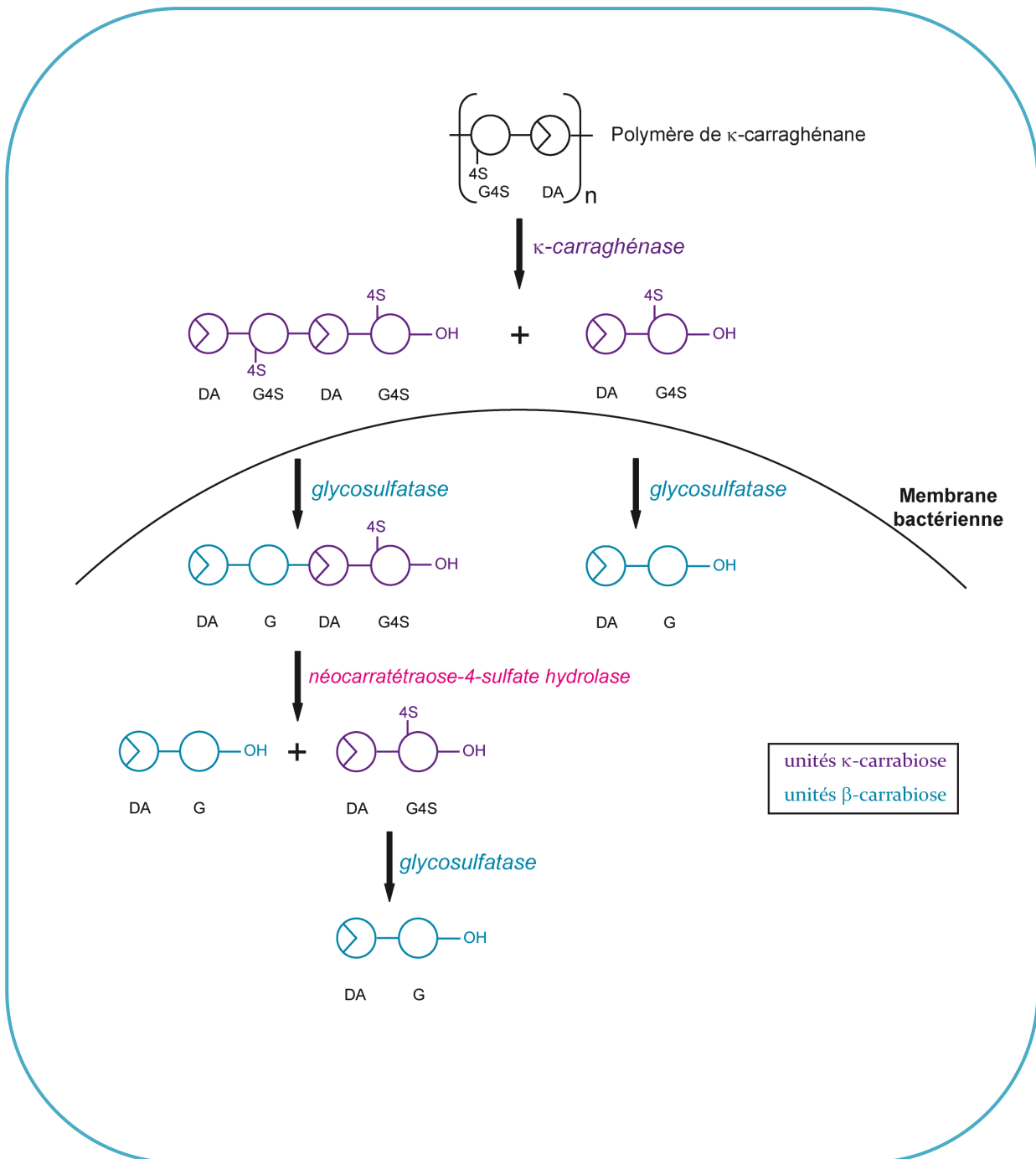


Figure IG-26 : Voie de biodégradation du κ -carraghénane par *P. carrageenovora*

(d'après McLean & Williamson, 1981)

B. Les enzymes impliquées dans la biodégradation

Les enzymes impliquées dans la biodégradation des carraghénanes sont celles sur lesquelles nous avons porté davantage d'intérêt au cours de cette thèse. Il y en a deux types : les carraghénases, responsables de la coupure des liaisons glycosidiques, et les sulfatases, permettant l'élimination des groupements sulfate. L'existence d'enzymes permettant l'ouverture du pont 3,6-anhydro n'a pour le moment pas été démontrée.

A ce jour, le seul système carraghénolytique ayant fait l'objet d'études détaillées est celui de la dégradation du κ -carraghénane par la bactérie marine *Pseudoalteromonas carrageenovora* (Figure IG-26) (McLean & Williamson, 1979a, 1979b et 1981). Cette bactérie possède une κ -carraghénase qui coupe les liaisons $\beta(1-4)$ et engendre des oligo- κ -carraghénanes de la série néo-carrabiose : le disaccharide DA-G4S et le tétrasaccharide DA-G4S-DA-G4S (McLean & Williamson, 1979b). Ces produits sont ensuite pris en charge par une glycosulfatase, localisée dans le périplasme, qui les désulfate et produit du disaccharide DA-G (*ie* un néo- β -carrabiose), et du tétrasaccharide DA-G-DA-G4S (disaccharide de β -/ κ -carraghénane) (McLean & Williamson, 1979a). Ce tétrasaccharide est ensuite hydrolysé en deux disaccharides, DA-G et DA-G4S, par une néocarratétrase-4-sulfate hydrolase (McLean & Williamson, 1981). Le DA-G4S est ensuite désulfaté par la glycosulfatase en oligosaccharide β -carrabiose, qui est le produit limite identifié de cette voie de dégradation. Les enzymes qui décomposent ensuite ce disaccharide, et notamment celle qui provoque la rupture du pont 3,6-anhydro, n'ont pas encore été identifiées. De même, les autres systèmes enzymatiques qui permettent de dégrader les carraghénanes n'ont pas été identifiés et l'on ignore s'ils sont semblables à celui présenté ici.

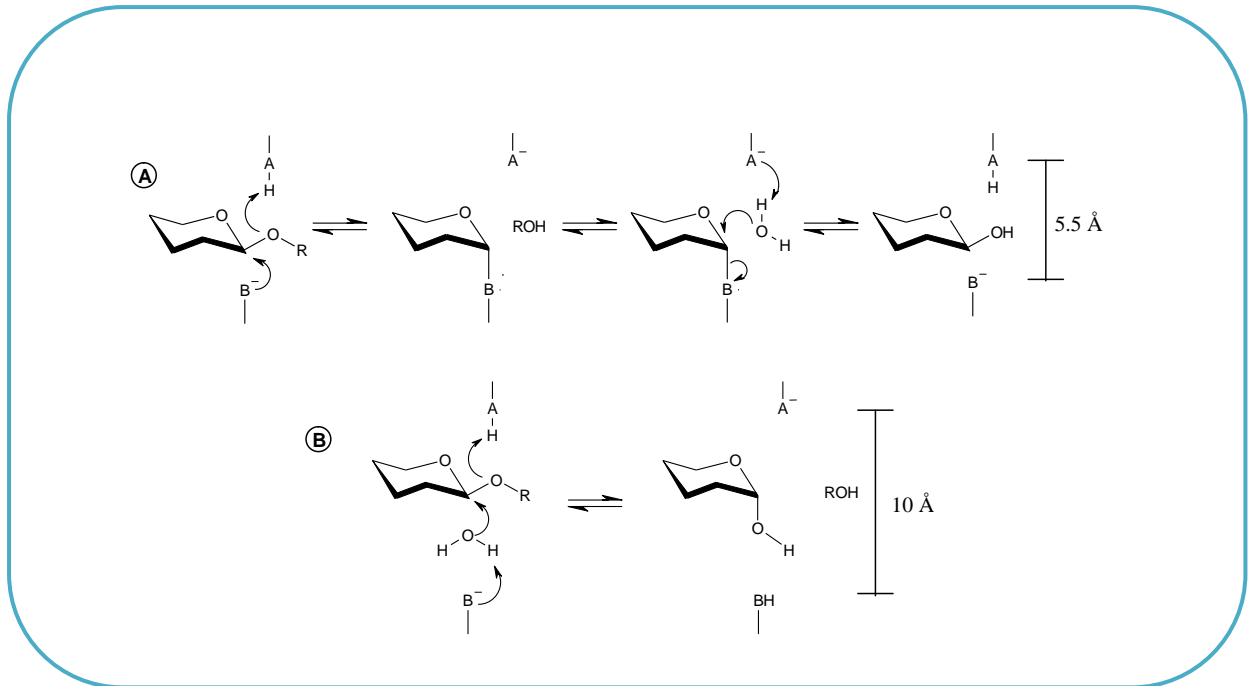


Figure IG-27 : Mécanismes d'hydrolyse des liaisons glycosidiques par les glycosides hydrolases (Henrissat & Davies, 1995)

a) Rétention de configuration anomérique et b) inversion de configuration anomérique

B.1 Les carraghénases

Les enzymes qui dégradent spécifiquement les carraghénanes font parties de la classe des glycoside-hydrolases (GH) et sont appelées les carraghénases. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques entre les deux unités galactopyranoses.

B.1.1 Les glycoside-hydrolases

Les glycoside-hydrolases représentent un large groupe d'enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. Elles sont répertoriées dans la classification CAZY (www.cazy.org) et on y compte à ce jour 130 familles. Ces enzymes ont un rôle important dans de multiples processus biologiques, comme la croissance et la dégradation des parois cellulaires, le transfert de l'énergie. Elles peuvent aussi être impliquées dans des stratégies de défense antibactérienne ou des mécanismes pathogènes.

Chimiquement, la liaison glycosidique est un pont entre le carbone anomérique d'un sucre et le groupement hydroxyle (-OH) d'un autre sucre. La réaction de coupure s'effectue en général grâce à deux résidus catalytiques de l'enzyme, un catalyseur acide/base et un nucléophile, et selon 2 mécanismes majeurs, impliquant soit la rétention, soit l'inversion de la configuration anomérique (Figure IG-27) (Koshland, 1953 ; Sinnott, 1990). Dans le premier cas, l'hydrolyse s'effectue *via* 2 substitutions nucléophiles successives. Pour le mécanisme d'inversion de la configuration anomérique, une seule étape de substitution nucléophile est effectuée. Les oligosaccharides ainsi produits sont caractérisés par leur extrémité réductrice, celle-ci étant définie par l'unité dont l'hydroxyle en position anomérique est libre.

Les glycoside-hydrolases possèdent également différents modes d'action qui rendent compte des modalités de dépolymérisation des polysaccharides (Rees, 1977). Les endo-hydrolases attaquent aléatoirement la chaîne glycosidique entraînant une décroissance rapide du degré de polymérisation du polysaccharide. Les exo-hydrolases sont actives sur des extrémités de chaîne ou des ramifications. Le caractère processif ou multi-attaque d'une enzyme permet de décrire des modes d'action intermédiaires. Après une première attaque aléatoire, les enzymes processives restent associées à l'extrémité de chaîne avant de procéder à une seconde coupure (Henrissat & Davies, 1995).

| Organismes | Taille (kDa) | Conditions optimales | | Produits terminaux | Références | Séquençage | Surexpression |
|------------------------------|--------------|----------------------|------|--------------------|--|------------|---------------|
| | | pH | T° | | | | |
| kappa-carraghénases | | | | | | | |
| <i>P. carrageenovora</i> | 32,6* | 8,0 | 40°C | DP4, DP2 | (Weigl <i>et al.</i> , 1966; McLean <i>et al.</i> , 1979) | √ | √ |
| <i>Z. galactanivorans</i> | 31,7* | 7,2 | 40°C | DP6, DP4 | (Potin <i>et al.</i> , 1991) | √ | |
| <i>P. tetradonis</i> | 34,1* | 8,0 | 55°C | - | (Kobayashi <i>et al.</i> , 2012) | √ | √ |
| <i>P. porphyrae</i> | 40,0 | 9,0 | 55°C | DP4 | (Liu <i>et al.</i> , 2011) | √ | |
| <i>Tamlana sp. HC4</i> | 66,4 | 8,0 | 30°C | DP2 | (Sun <i>et al.</i> , 2010) | | |
| iota-carraghénases | | | | | | | |
| <i>A. fortis</i> | 51,9* | 8,0 | 40°C | DP6, DP4 | (Bellion, 1982; Greer, 1984) | √ | √ |
| <i>Z. galactanivorans A1</i> | 53,4* | 8,0 | 40°C | DP6, DP4 | (Potin <i>et al.</i> , 1991; Barbeyron <i>et al.</i> , 2000) | √ | |
| <i>Z. galactanivorans A2</i> | 46,3* | 8,0 | 40°C | - | (Rebuffet <i>et al.</i> , 2010) | √ | |
| <i>Z. galactanivorans A3</i> | 35,3* | 8,0 | 40°C | - | (Rebuffet <i>et al.</i> , 2010) | √ | |
| <i>M. thermotolerans</i> | 55* | 7,5 | 50°C | DP4 | (Hatada <i>et al.</i> , 2010) | √ | √ |
| lambda-carraghénases | | | | | | | |
| <i>P. carrageenovora</i> | 98,0 | 6,5 | 30°C | DP6, DP4 | (Weigl <i>et al.</i> , 1966; McLean <i>et al.</i> , 1979) | √ | faible |
| <i>P. CL19</i> | 103* | 7,0 | 35°C | DP4 | (Ohta & Hatada, 2006) | √ | |
| <i>A. operculata</i> | | | | | (Bouarab, 2000) | | |

Tableau IG-9 : Carraghénases citées dans le texte à titre d'exemple

B.1.2 Les carraghénases

La première activité carraghénolytique a été observée au Japon, dans l'appareil digestif d'invertébrés marins qui puisaient leur ressource en carbone de la dégradation des parois d'algues rouges (Mori, 1939 ; Mori, 1943). Jusqu'à ce jour aucune carraghénase n'a été isolée chez les algues rouges elles-mêmes, bien que leur existence soit prédite par l'analyse bio-informatique du génome de *Chondrus crispus* (Jonas Collen, communication personnelle, travaux en cours de publication). On compte en effet, dans cette algue rouge, 3 gènes codant pour des GH16 qui groupent avec des carraghénases lors des analyses. Par contre, le rôle prédominant de bactéries marines dans la dégradation naturelle des algues a été établi (Tableau IG-9). *Pseudoalteromonas carrageenovora* fut la première bactérie carraghénolytique isolée en 1955 (Yaphe *et al.*, 1955). Elle produit les trois types de carraghénases connues à ce jour : une κ -carraghénase (Weigl *et al.*, 1966b ; McLean & Williamson, 1979a), une λ -carraghénase (Weigl *et al.*, 1966b ; Johnston & McCandless, 1973) et plus récemment observée, une ι -carraghénase (Henares *et al.*, 2010). D'autres bactéries carraghénolytiques ont été identifiées par la suite, notamment *Alteromonas fortis* isolée à la surface de l'algue *Eucheuma spinosum*, avec la mise en évidence de la première activité ι -carraghénase, ainsi qu'une nouvelle κ -carraghénase (Bellion, 1982 ; Greer & Yaphe, 1984c). Ces deux activités ont été détectées dans une autre bactérie marine plus récemment découverte, *Zobellia galactanivorans*, isolée de l'algue *Delesseria sanguinea* (Potin *et al.*, 1991 ; Barbeyron *et al.*, 1998 ; Barbeyron *et al.*, 2000). Toutes les carraghénases connues à ce jour clivent spécifiquement les liaisons $\beta(1-4)$ de leur substrat respectif. Néanmoins, aucune activité carraghénase agissant sur une autre structure que celles du κ -, ι - ou λ -carraghénane n'a été mise en évidence.

a. Les κ -carraghénases

Les κ -carraghénases portent le numéro EC 3.2.1.83 et appartiennent à la famille 16 des glycoside-hydrolases. Plusieurs de ces enzymes sont caractérisées, celles ayant fait l'objet d'études les plus abouties étant celles de *Pseudoalteromonas carrageenovora* et de *Zobellia galactanivorans* (Michel *et al.*, 2006). Ces κ -carraghénases ont été purifiées à partir des surnageants de culture, démontrant la sécrétion de ces enzymes dans le milieu marin (Weigl &

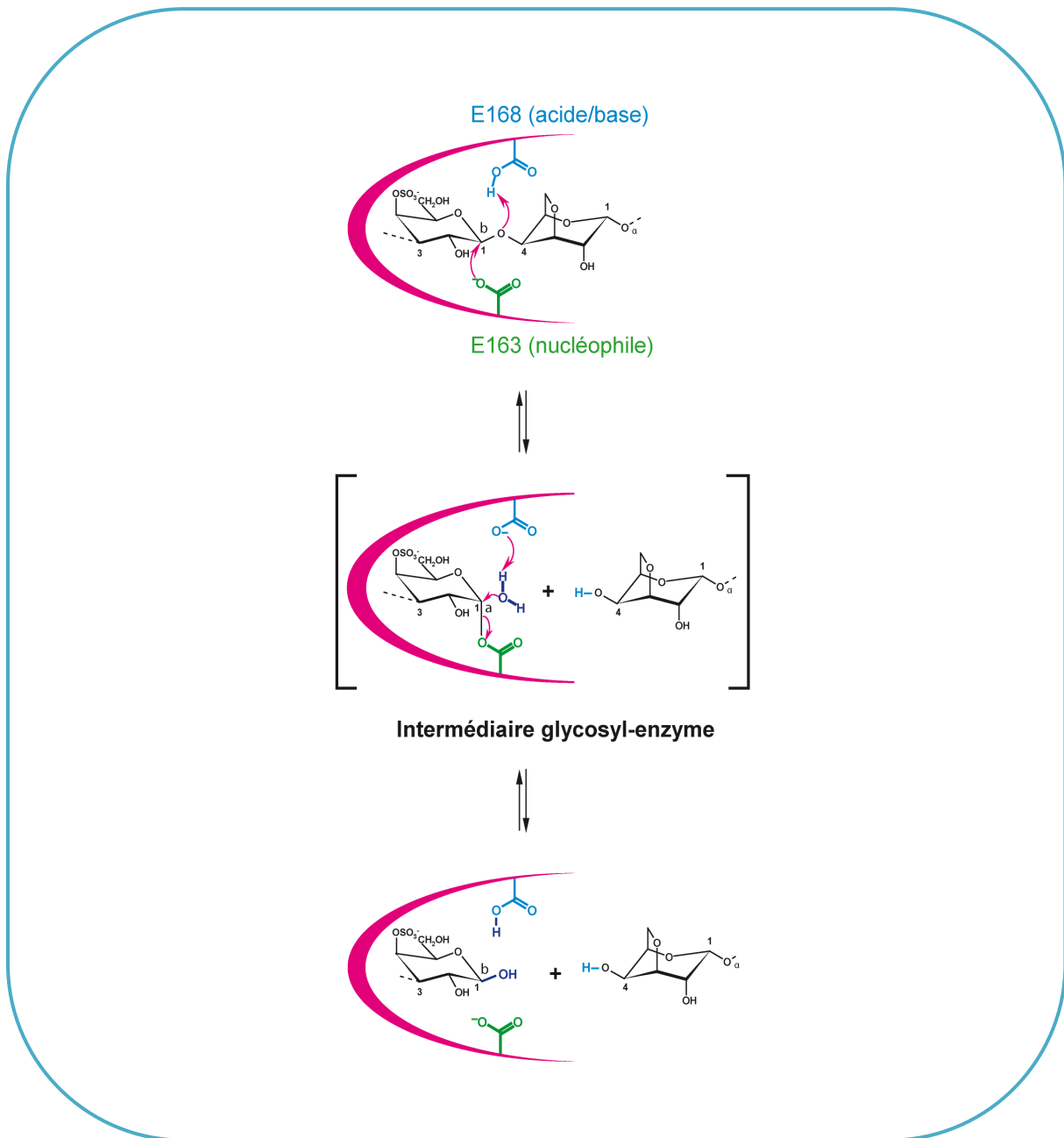


Figure IG-28 : Mécanisme d'hydrolyse de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*, de type SN1 avec rétention de la configuration anomérique (McCarter & Withers, 1994)

Yaphe, 1966 ; McLean & Williamson, 1979a ; Potin *et al.*, 1991). Les κ -carraghénases de *P. carrageenovora* et *Z. galactanivorans* ont été séquencées et la comparaison des gènes a révélé que ces protéines étaient homologues. Les gènes codent pour des protéines de respectivement 44,4 kDa et 61,5 kDa (Barbeyron *et al.*, 1994 ; Barbeyron *et al.*, 1998). Cependant, ces enzymes possèdent une extension C-terminale de 96 et 229 acides aminés respectivement, qui est clivée lors de la sécrétion (Potin *et al.*, 1995 ; Barbeyron *et al.*, 1998). Les κ -carraghénases matures de *P. carrageenovora* et *Z. galactanivorans* ont donc une masse moléculaire de 31,7 et 32,6 kDa respectivement.

Les profils d'activités en fonction du pH et de la température des κ -carraghénases de *P. carrageenovora* et *Z. galactanivorans* sont relativement proches, avec des optima d'activité à pH 8 et 7,2 respectivement, les deux atteignant leur maximum d'activité à 40°C (Weigl & Yaphe, 1966 ; McLean & Williamson, 1979a ; Potin *et al.*, 1991). Cependant, la κ -carraghénase de *Pseudoalteromonas tetraodonis*, récemment caractérisée, se distingue des autres en montrant un maximum d'activité à un pH 8 et une température de 55°C (Kobayashi *et al.*, 2012). La stabilité thermique de cette κ -carraghénase est largement améliorée en présence de ι - ou de λ -carraghénane dans le milieu d'incubation. Bien que sécrétées dans le milieu marin, aucune des κ -carraghénases décrites à ce jour ne présentent de dépendance vis-à-vis du chlorure de sodium.

La κ -carraghénase, comme les autres glycoside-hydrolases de la famille 16, agit selon un mécanisme de rétention de la configuration anomérique (Figure IG-28). Ce mécanisme a été démontré dans le cas de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* par l'apparition du néo- κ -carratétraose d'anomérie β , lors du suivi cinétique en ^{13}C -RMN de l'hydrolyse du néo- κ -carrahexaose (Potin *et al.*, 1995). La rétention de configuration du carbone anomérique lors de l'hydrolyse est la conséquence d'un mécanisme de substitution nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}1$, à deux étapes (McCarter & Withers, 1994 ; Davies & Henrissat, 1995). La première étape est une attaque du groupement carboxyle nucléophile sur le carbone anomérique, avec coupure simultanée de la liaison RO^- activée par sa neutralisation par le groupement carboxyle acide. Cette étape aboutit à la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Le groupement carboxyle acide/base capture ensuite un proton d'une molécule d'eau, activant

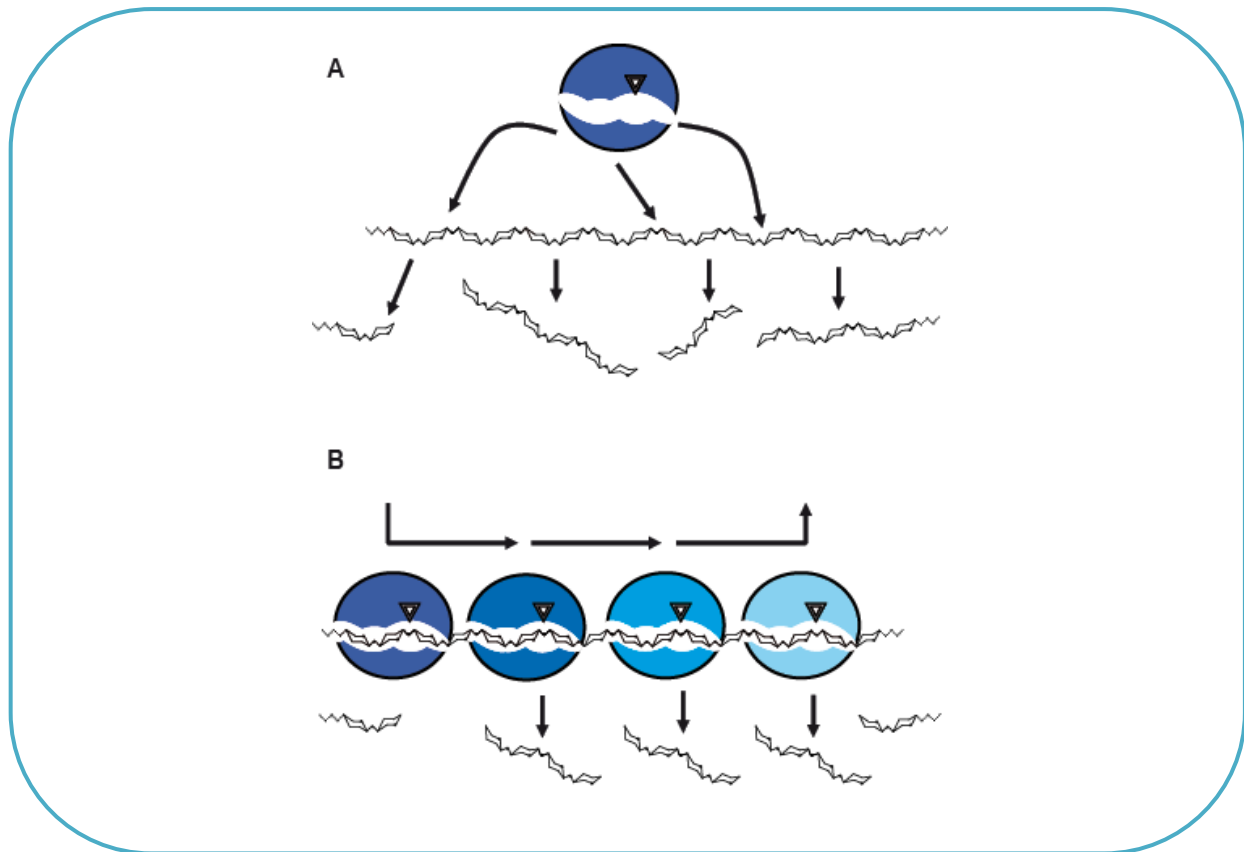


Figure IG-29 : Modes d'action de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* (Lemoine *et al.*, 2009)

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

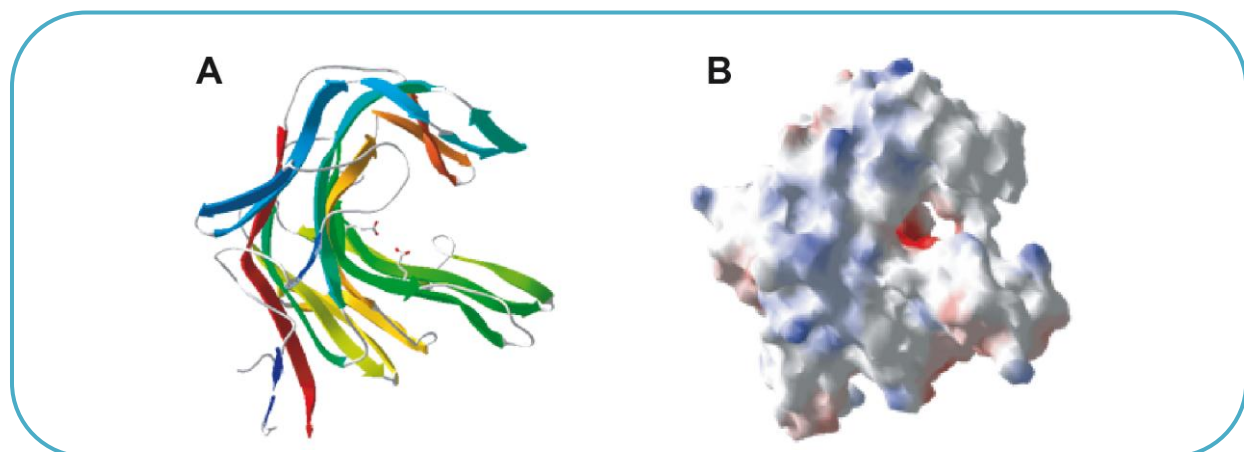


Figure IG-30 : Structure secondaire de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* (PDB : 1DYP) (Michel *et al.*, 2001)

- (A) Représentation en ruban du repliement en sandwich β
- (B) Surface moléculaire colorée suivant les potentiels électrostatiques du bleu foncé (+) au rouge (-)

ainsi le nucléophile HO^- , qui attaque le carbone anomérique, hydrolysant l'intermédiaire glycosyl-enzyme. Cette seconde étape peut être une transglycosylation si le groupement nucléophile est issu, non pas d'une molécule d'eau, mais d'un galactopyranose. La résolution de la structure de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* par diffraction des rayons X (Michel *et al.*, 2001b) a confirmé l'identification des deux acides aminés catalytiques du site actif participant à l'hydrolyse de la liaison $\beta(1-4)$: l'acide aminé nucléophile est le glutamate E163, et l'acide aminé acide/base le glutamate E168. Ils sont séparés de 5,4 Å, distance couramment rencontrée chez les enzymes présentant un mécanisme de rétention de configuration (McCarter & Withers, 1994 ; Davies & Henrissat, 1995).

Il a été démontré récemment que la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* agit selon un mode d'action endo lorsque son substrat est soluble, et avec un mode d'action processif lorsque son substrat est à l'état solide (Figure IG-29) (Lemoine *et al.*, 2009). La κ -carraghénase de *P. tetraodonis* semble agir selon le même mécanisme (Kobayashi *et al.*, 2012). Les κ -carraghénases coupent spécifiquement les liaisons $\beta(1-4)$ du κ -carraghénane, libérant des produits de la série néo- κ -carrabiose. Toutefois, les produits terminaux et le substrat minimal diffèrent par contre d'une κ -carraghénase à l'autre : les produits limites de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* sont les néo- κ -carrabiose (DP2) et néo- κ -carratétraose (DP4) et son substrat minimal le néo- κ -carrahexaose (Weigl *et al.*, 1966a ; McLean & Williamson, 1979a ; Bellion, 1982 ; Rochas *et al.*, 1983) ; les produits limites de la κ -carraghénase de *Z. galactanivorans* sont le néo- κ -carratétraose (DP4) et le néo- κ -carrahexaose (DP6) avec comme substrat minimal du néo- κ -carraoctaose (Potin *et al.*, 1991).

La structure de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* a été résolue (Michel *et al.*, 2001a). Cette enzyme adopte un repliement en sandwich, constitué de 2 feuillets β antiparallèles de 6 et 7 brins, formant un profond sillon dont le rôle est de fixer la chaîne de carraghénane. La gorge catalytique est recouverte par deux feuillets β associés, conférant à l'enzyme une topologie de son site actif en tunnel (Figure IG-30). Basée sur une étude cristallographique d'un complexe de la κ -carraghénase avec un oligo-carratétraose, une chaîne de κ -carraghénane a été modélisée dans ce tunnel, permettant d'identifier 7 sous-sites de fixation (de -5 à +2) entre le site actif et le substrat (Michel *et al.*, 2001b).

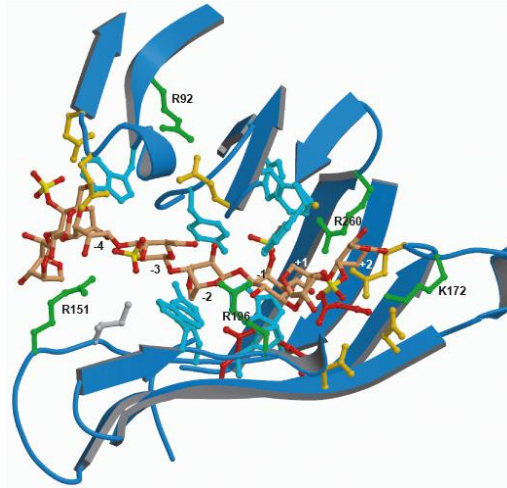


Figure IG-31: Structure du site actif de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* (Michel *et al.*, 2001b)

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

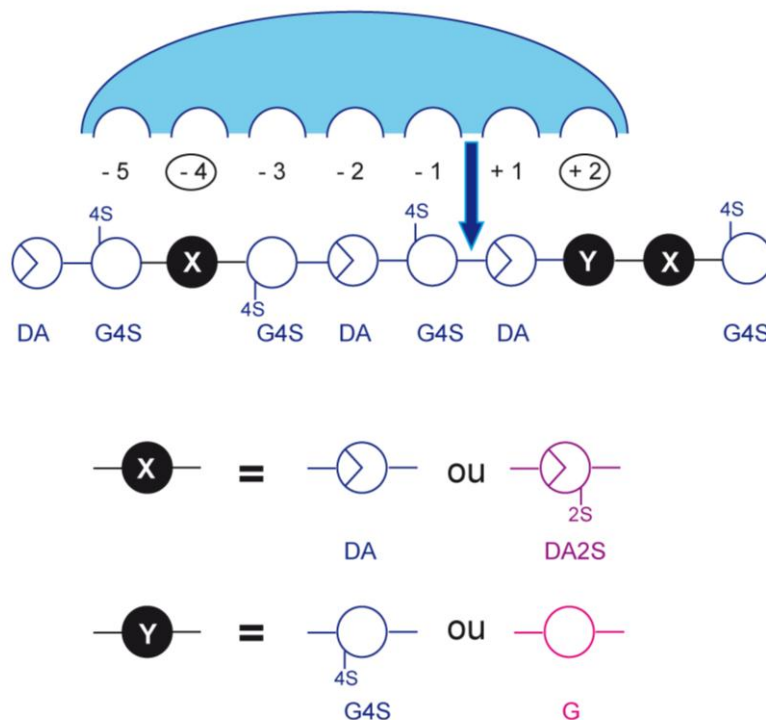


Figure IG-32: Spécificité du site actif de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* (d'après la Thèse Jouanneau, 2010)

Pour la reconnaissance des chaînes, les résidus basiques lysine et arginines du site catalytique (K191, R151, R260, R196) en positions (-5, -3, -1, +2) interagiraient avec les unités sulfatées du κ -carraghénane (G4S), alors que les groupements DA, en position (-4, -2, +1), seraient dans un environnement hydrophobe (Y64, W266, F271) (Figure IG-31). La κ -carraghénase de *P. carrageenovora* a été utilisée pour l'analyse structurale de carraghénanes hybrides κ -/ β - et κ -/ ι - (Knutsen & Grasdalen, 1992a ; Correc *et al.*, 2012 ; Guibet *et al.*, 2008). La caractérisation d'oligosaccharides hybrides a permis de détailler la spécificité du site actif de cette enzyme. Le sous site +2 peut accueillir une unité G à la place d'un G4S, et le sous-site -4 ainsi que la position +3 peuvent accueillir des unités DA2S à la place des unités DA (Figure IG-32).

b. Les ι -carraghénases

Les ι -carraghénases caractérisées à ce jour portent le numéro EC 3.2.1.157 et appartiennent à la famille 82 des glycoside-hydrolases. On dénombre une dizaine d'activités ι -carraghénases aujourd'hui dans la littérature. Celles ayant fait l'objet d'investigations les plus nombreuses sont celle d'*Alteromonas fortis* et les trois enzymes de *Z. galactanivorans*. Les protéines natives de deux ι -carraghénases (celle de *A. fortis* et une de *Z. galactanivorans*) ont été purifiées à partir des surnageants de cultures, toutefois une activité ι -carraghénase avait également été observée sur des fractions membranaires d'*A. fortis*, suggérant que cette carraghénase pourrait être associée aux membranes et libérée dans le milieu externe lors d'une croissance rapide de la bactérie en milieu riche en nutriments (Greer & Yaphe, 1984). Les gènes des ι -carraghénases d'*A. fortis* et de *Z. galactanivorans* ont été clonés et les protéines surexprimées dans *E. coli* (Michel *et al.*, 2000 ; Rebuffet *et al.*, 2010). Le gène de la ι -carraghénase de *Microbulbifer thermotolerans* a, lui, été surexprimé dans *Bacillus subtilis* (Hatada *et al.*, 2011).

Les tests d'activité sur la ι -carraghénase d'*A. fortis* ont montré une activité maximale à un pH de 8 et une température de 40°C (Greer & Yaphe, 1984). En revanche, bien que la ι -carraghénase de *M. thermotolerans* présente un maximum d'activité à un pH quasi-similaire, de 7,5, sa température optimale quant à elle, est de 50°C (Hatada *et al.*, 2011). C'est la plus haute température optimale décrite pour une ι -carraghénase. Contrairement aux κ -carraghénases les ι -carraghénases présentent une dépendance vis-à-vis du chlorure de sodium.

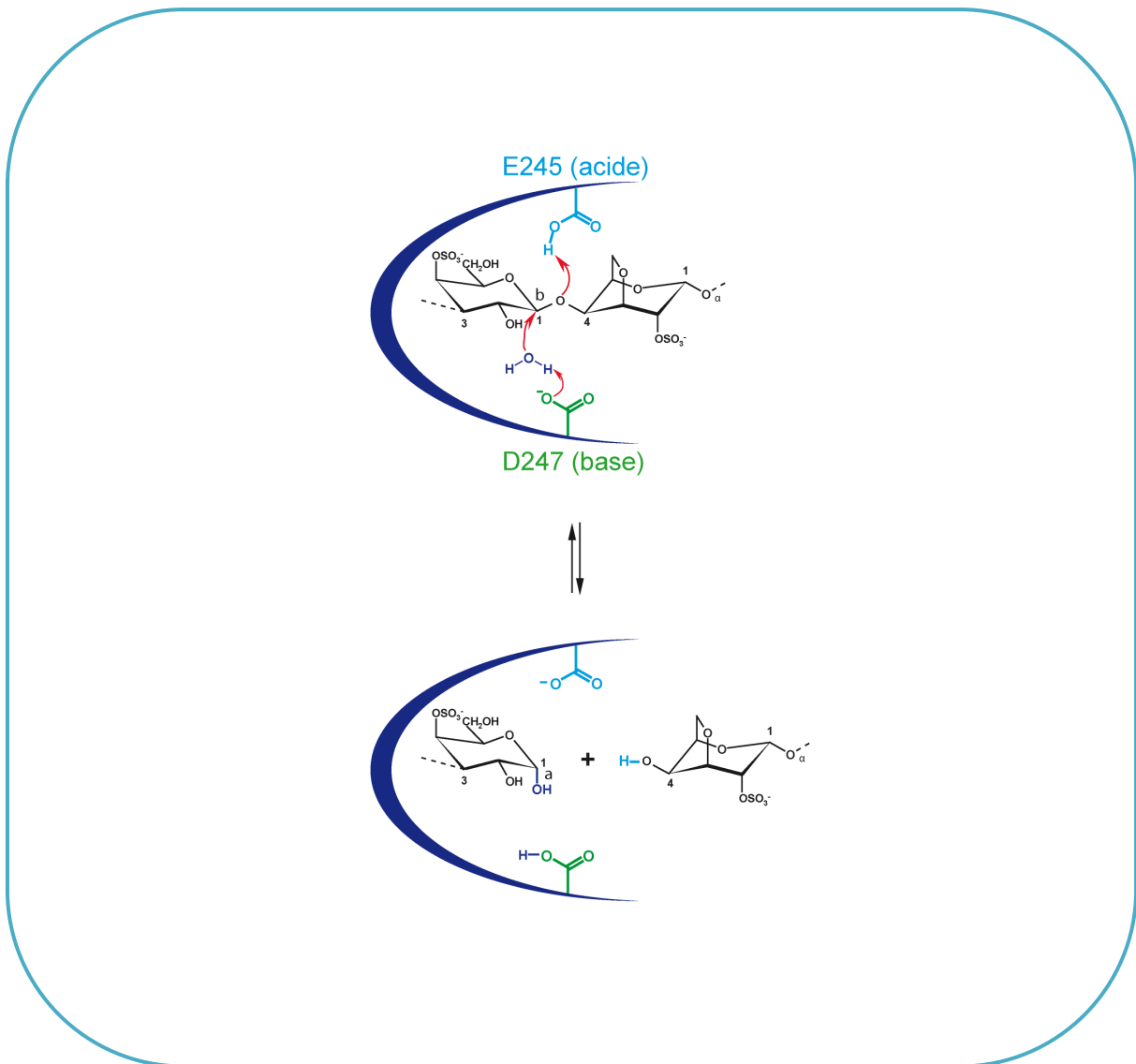


Figure IG-33 : Mécanisme d'hydrolyse de la ι -carraghénase d'*A. fortis*, de type SN2 avec inversion de la configuration anomérique (McCarter & Withers, 1994)

Ces deux ι -carraghénases étudiées montrent une activité maximale en présence de 100 mM NaCl. Cette activité carraghénolytique décroît fortement dès lors que la concentration en NaCl s'éloigne de cet optimum (Hatada *et al.*, 2011) suggérant que ce sont les ions Na^+ qui jouent un rôle primordial, ainsi que les ions Ca^{2+} dans le cas de *M. thermotolerans*.

Les ι -carraghénases agissent selon un mécanisme d'inversion de configuration anomérique (Figure IG-33). Ce mécanisme a été montré par l'apparition initiale d'extrémités réductrices de configuration α , lors du suivi cinétique par ^1H -RMN de l'hydrolyse du ι -carraghénane (Barbeyron *et al.*, 2000). L'inversion de la configuration est la conséquence d'un mécanisme d'hydrolyse concerté stéréospécifique de substitutions nucléophiles ($\text{S}_{\text{N}}2$) (McCarter & Withers, 1994 ; Davies & Henrissat, 1995). Au cours de ce mécanisme, un acide aminé carboxylique, sous sa forme basique, capte un proton d'une molécule d'eau, libérant le nucléophile HO^- , qui va alors attaquer le carbone anomérique provoquant la rupture de la liaison glycosidique. L'oxygène de cette liaison se neutralise en captant un proton d'un acide aminé carboxylique sous sa forme acide. Les acides aminés catalytiques de la ι -carraghénase d'*A. fortis* ont été identifiés comme l'acide glutamique E245 et l'aspartate D247 (Michel *et al.*, 2001b ; Rebuffet *et al.*, 2010).

Les ι -carraghénases actuellement décrites sont des enzymes endo-processives (Michel *et al.*, 2003). En effet, il a été montré que les ι -carraghénases d'*A. fortis* et de *Z. galactanivorans* agiraient selon un mode endo en phase liquide (Potin, 1992 ; Barbeyron *et al.*, 2000 ; Knutsen *et al.*, 2001). En revanche, en phase solide, la ι -carraghénase d'*A. fortis* agirait selon un mode processif, comme l'a montré la dégradation enzymatique de gels de ι -carraghénane par microscopie électronique à transmission. Un affinement progressif des fibres sans destruction du réseau fibrillaire a en effet été observé (Michel *et al.*, 2003). Les ι -carraghénases coupent spécifiquement les liaisons $\beta(1-4)$ du ι -carraghénane, libérant des produits de la série néo- ι -carrabiose (Bellion, 1982 ; Barbeyron *et al.*, 2000 ; Hatada *et al.*, 2011). Cependant les produits terminaux diffèrent à nouveau d'une ι -carraghénase à l'autre reflétant des modalités de reconnaissance différentes. Les ι -carraghénases d'*A. fortis* et de *Z. galactanivorans* forment du néo- ι -carrahexaose (DP6) et néo- ι -carratétrahexaose (DP4), quand celle de *M. thermotolerans* produit principalement du néo- ι -carratétrahexaose (DP4).

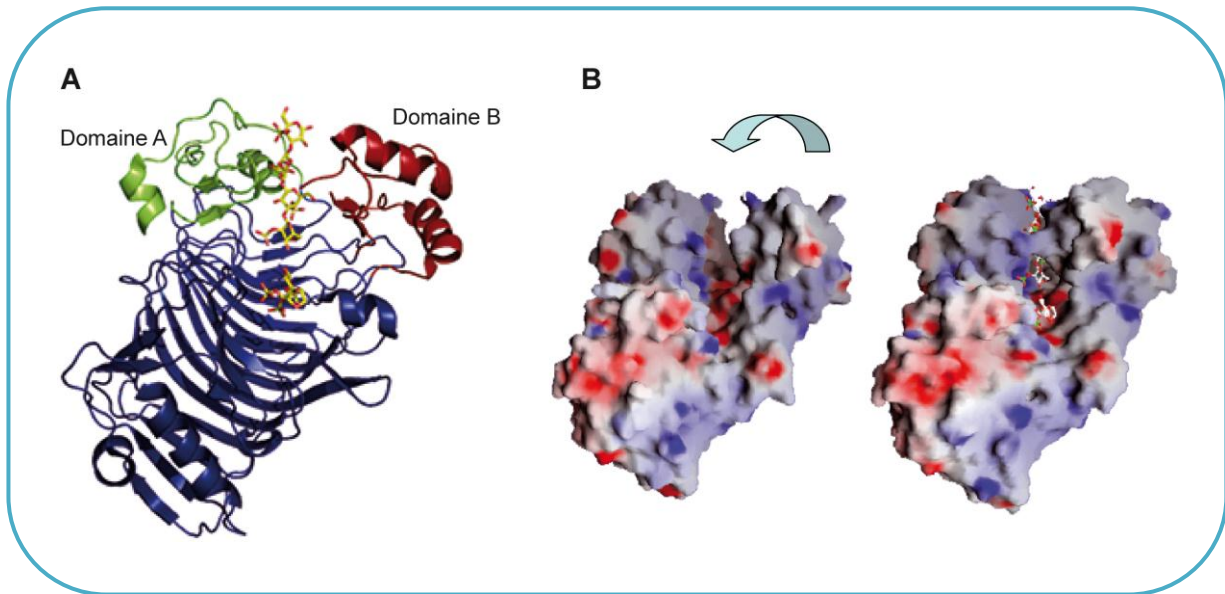


Figure IG-34 : Structure secondaire de la ι -carraghénase d'*A. fortis* (Michel *et al.*, 2003)

(A) Repliement en hélice β .

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

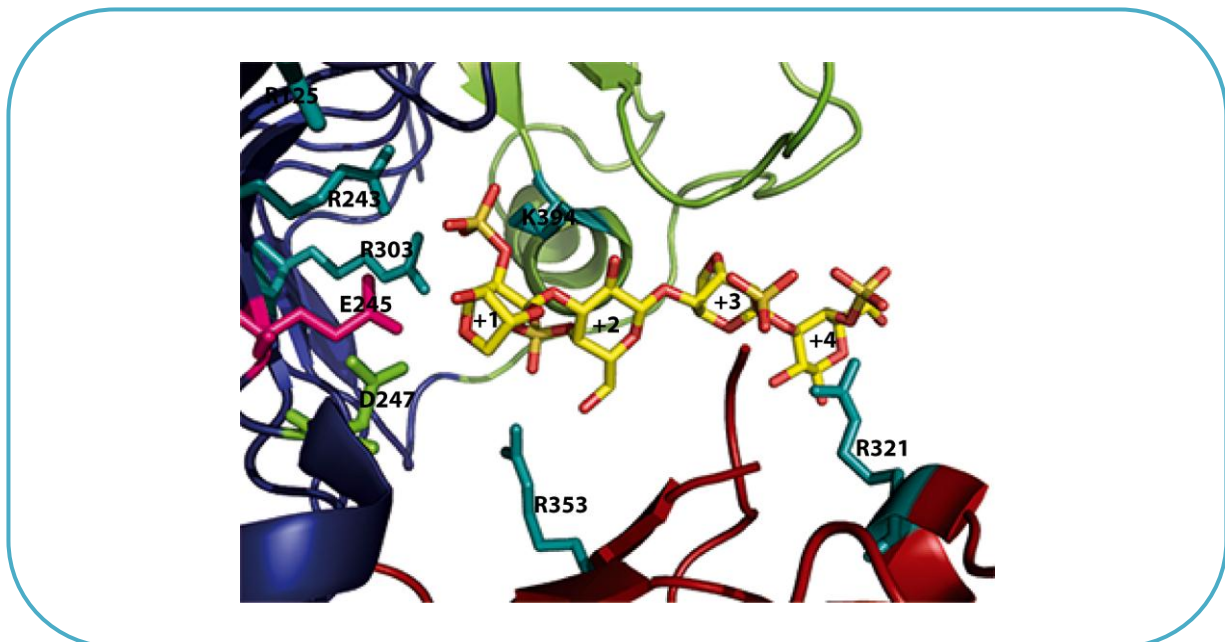


Figure IG-35: Structure du site actif de la ι -carraghénase d'*A. fortis* (Michel *et al.*, 2003)

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

La structure de la ι -carraghénase d'*A. fortis* a été résolue par diffraction des rayons X (Michel *et al.*, 2001a). Cette enzyme adopte un repliement en hélice β droite de 10 tours composées de 4 feuillets β parallèles. Elle possède également deux domaines additionnels A et B dans la région C-terminale formant une grande crevasse, qui constitue la zone de fixation de la chaîne de ι -carraghénane (Figure IG-34A). Il a été montré que le domaine A se refermait sur le sillon lorsqu'une chaîne de ι -carraghénane s'y était fixée (Figure IG-34B) expliquant ainsi la processivité (Michel *et al.*, 2003). La ι -carraghénase aurait ainsi deux conformations, une conformation ouverte permettant l'attaque endo d'une chaîne isolée, et une conformation de type tunnel, induite par la fixation du substrat, créant les conditions de la processivité. La structure de la ι -carraghénase en complexe avec un néo- ι -carrabiose et un néo- ι -carratétraose a également été résolue (Michel *et al.*, 2003). Le tétrasaccharide DA2S-G4S-DA2S-G4S s'était positionné dans les sous-sites +1 à +4, et le disaccharide DA2S-G4S dans les sous-sites -4 et -3 ; les sous-sites -2 et -1 sont restés vides. La reconnaissance et la fixation des chaînes de ι -carraghénane sont réalisées par des interactions entre les groupements sulfate des unités G4S et DA2S et des résidus basiques lysine et arginines (K394, R125, R243, R303, R353, R312) (Figure IG-35) (Michel *et al.*, 2003 ; Rebuffet *et al.*, 2010). Il a été montré que la ι -carraghénase est capable d'accepter une unité D2S,6S à la place d'une unité DA2S dans le sous-site -4, malgré un encombrement stérique et un environnement électrostatique tout à fait différent entre ces deux unités. Il semble également que l'enzyme puisse accepter une unité DA à la place d'une unité DA2S dans son sous site -2 cette fois (Figure IG-36) (Jouanneau, 2010).

c. Les λ -carraghénases

Peu de λ -carraghénases sont connues à ce jour. Elles portent le numéro EC 3.2.1.162, mais il n'a pas encore été attribué de numéro à la nouvelle famille qu'elles constituent dans la classification CAZY. La première λ -carraghénase qui fut caractérisée est excrétée par la bactérie marine *Pseudoalteromonas carrageenovora* (Weigl *et al.*, 1966b). Après purification partielle de cette λ -carraghénase, l'hypothèse d'un complexe enzymatique extracellulaire impliquant trois hydrolases avait été avancée (Johnston & McCandless, 1973). Celle-ci fut écartée par la purification à l'homogénéité de la λ -carraghénase comme protéine unique de 98 kDa (Greer, 1984 ; Potin, 1992). Cela fut par la suite confirmé par la purification de la λ -carraghénase de *Pseudoalteromonas CL19* (Ohta & Hatada, 2006). Une autre λ -carraghénase

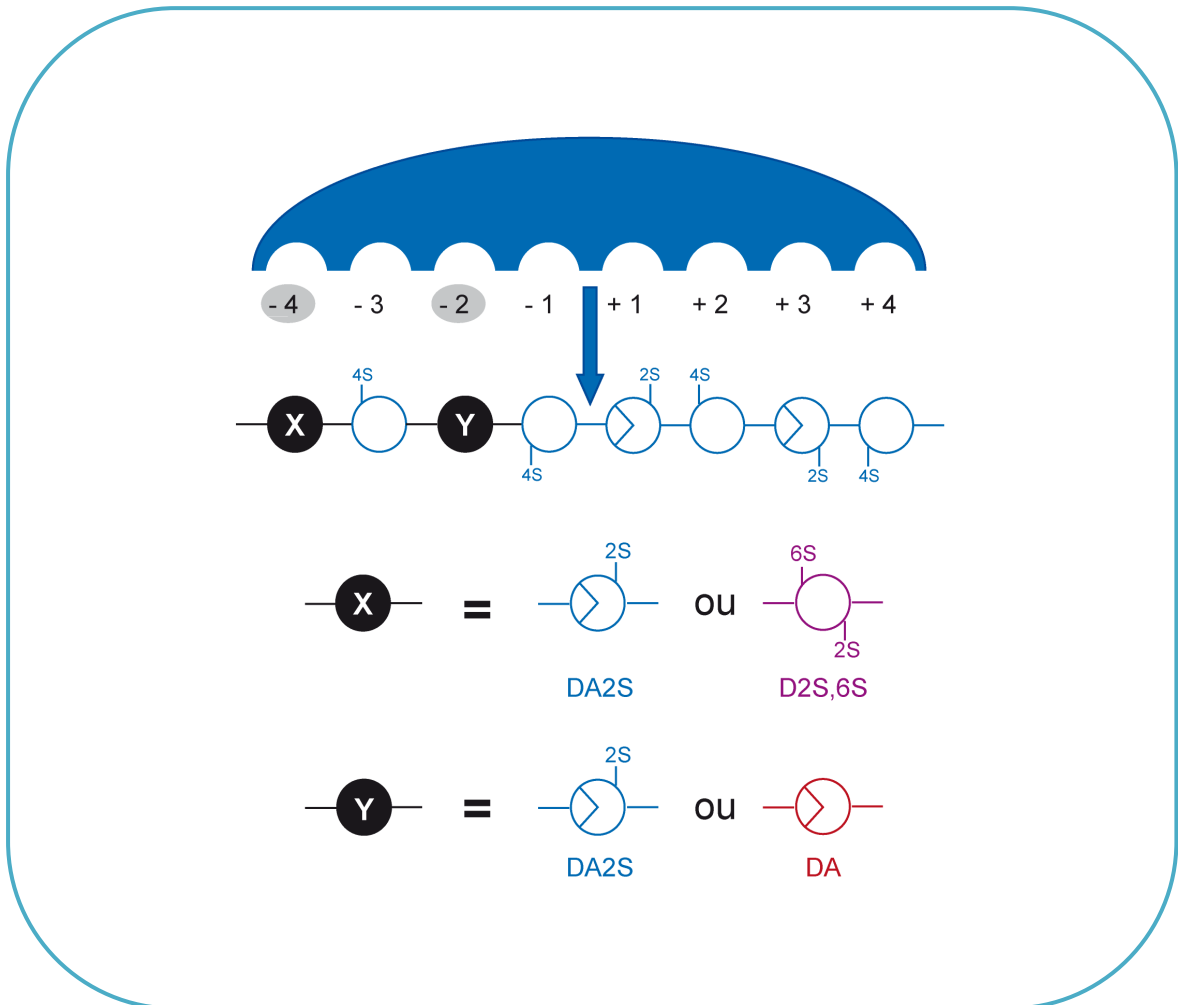


Figure IG-36 : Modalités de reconnaissance de la α -carraghénase d'*A. fortis* (d'après la Thèse [Jouanneau, 2010](#))

a été détectée chez l'algue verte *Acrochaete operculata*, qui est un pathogène endophyte des sporophytes de l'algue rouge *Chondrus crispus* (Bouarab *et al.*, 1999).

Le séquençage récent de la λ -carraghénase de *P. carrageenovora* a montré qu'elle ne s'apparentait ni à la famille 16 des κ -carraghénases, ni à la famille 82 des ι -carraghénases, représentant par conséquent une nouvelle famille de glycoside-hydriolases (Colin, 2005). Le gène de la λ -carraghénase code une protéine de 942 acides aminés, avec un poids moléculaire de 105 kDa. La surexpression de la λ -carraghénase a abouti à une production de l'enzyme sous forme de corps d'inclusion. Après dénaturation à l'urée 8 M, le repliement de l'enzyme a été possible par dilution rapide mais avec un faible rendement (Colin, 2005). Par conséquent, λ -carraghénase recombinante de *P. carrageenovora* n'est pas disponible sous forme soluble. La surexpression de la λ -carraghénase de *P. CL19*, de 917 acides aminés et avec un poids moléculaire de 103 kDa, a uniquement permis de valider l'activité de la protéine sur gel après 48h d'incubation (Ohta & Hatada, 2006).

Toutes les études biochimiques ont donc été réalisées à partir de λ -carraghénases natives (Guibet *et al.*, 2007 ; Ohta & Hatada, 2006). Les conditions optimales d'activité ont été déterminées à un pH de 6,5 et une température de 30°C pour la λ -carraghénase de *P. carrageenovora* (Greer, 1984) et à un pH de 7,0 et une température de 35°C pour celle de *P. CL19* (Ohta & Hatada, 2006). La λ -carraghénase de *P. carrageenovora* hydrolyserait les carraghénanes de la famille lambda (solubles en KCl) extraits de Gigartinaceae, et plus particulièrement les structures π - (G2S-DP2S), ξ - (G2S-D2S) et λ -carraghénanes (G2S-D2S,6S) extraits de formes tétrasporophytes de *G. canaliculata*, *G. pistillata* et *C. crispus* (Greer, 1984). Greer avait donc avancé que la sulfatation en 2 sur l'unité G serait nécessaire à la reconnaissance du substrat par l'enzyme. En effet, la présence d'oligosaccharides hybrides après dégradation à la λ -carraghénase de tétrasporophytes issus de différentes algues, confirme sa capacité à accepter dans son site actif des motifs autres que ceux du λ -carraghénane (Guibet, 2007). Toutefois, aucune étude n'a montré l'aptitude de la λ -carraghénase à hydrolyser des homopolymères de θ -, ξ -, π -carraghénanes. Les liaisons $\beta(1-4)$ sont hydrolysées par la λ -carraghénase selon un mécanisme d'inversion de configuration. L'analyse des produits limites par RMN a montré qu'il s'agissait de néo- λ -carratétraose (DP4) et de néo- λ -carrahexaose (DP6). Cette enzyme agit selon un mode d'action endo et possède 8 sous-sites de fixation (-4 à +4) au niveau de son site actif (Guibet, 2007).

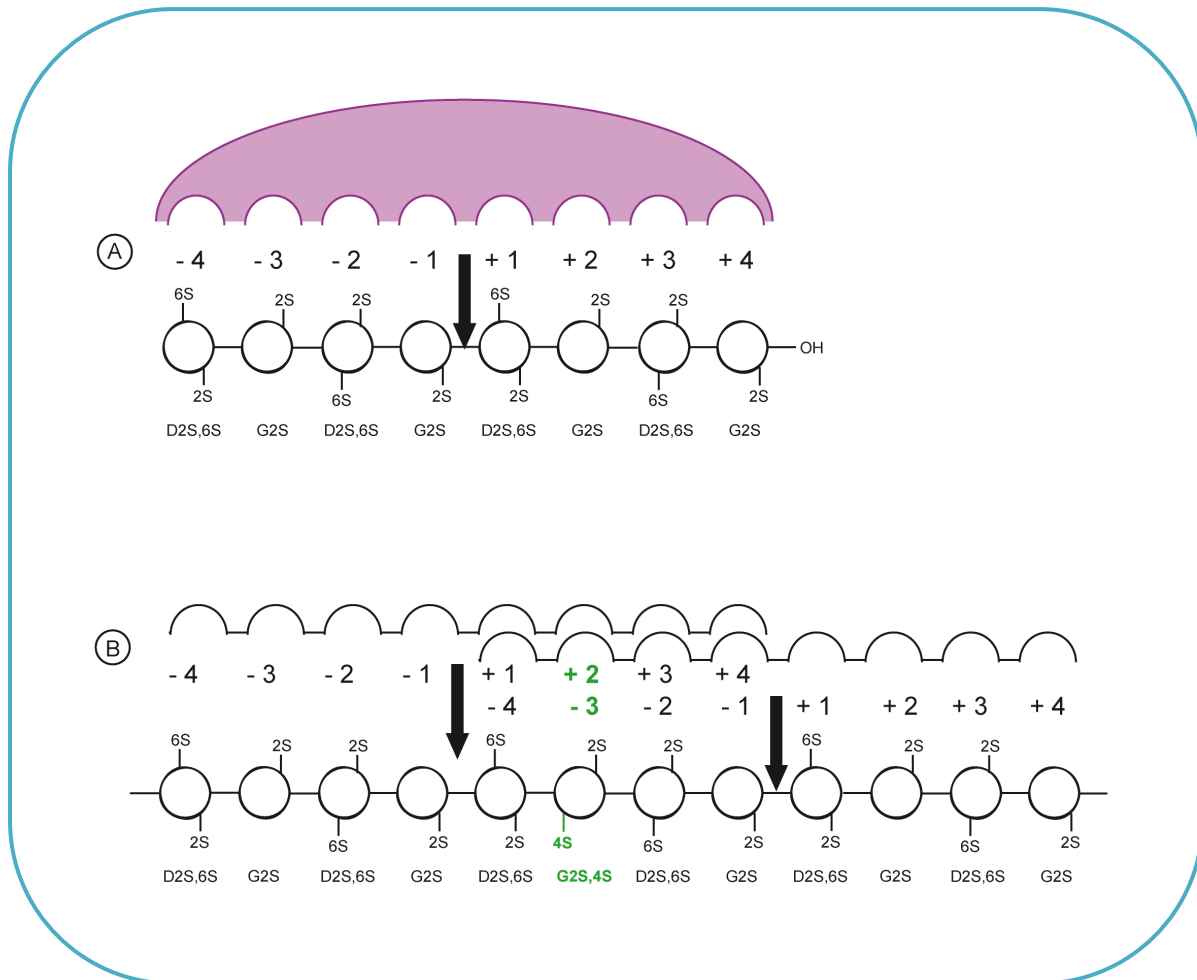


Figure IG-37 : Spécificité du site actif de la λ -carraghénase de *P. carrageenovora* (d'après Guibet, 2007)

A) Positionnement et coupure des chaînes de motifs λ -carraghénane.

B) Positionnements des unités G2S,4S dans le site actif de l'enzyme pour obtenir le tétrasaccharide D2S,6S-G2S,4S-D2S,6S-G4S.

Le substrat minimum requis pour une fixation productive est le néo- λ -carrhexaose et se positionnerait entre les sous-sites -2 à +4 (Figure IG-37). La λ -carraghénase peut accepter dans son site actif des motifs autres que le lambda (G2S-D2S,6S), traduisant l'adaptation des carraghénases aux structures hybrides (Guibet, 2007). La λ -carraghénase de *P. CL19* présente elle aussi un mode d'action endo mais produit essentiellement du néo- λ -carratétraose (Ohta & Hatada, 2006).

En raison de la difficulté à obtenir la λ -carraghénase recombinante, aucune structure cristallographique n'a encore été résolue.

B.2 Les sulfatases

Contrairement aux sulfotransférases qui ont fait l'objet d'intenses investigations ces dernières années, les sulfatases ont reçu considérablement moins d'attention (Hanson *et al.*, 2004). Ce travail de thèse reposant sur ces enzymes, le chapitre suivant leur sera consacré.

IV – LES SULFATASES

Les sulfatases sont essentiellement connues pour leur implication dans des maladies héréditaires graves. Pour cette raison, la plupart des études sur les sulfatases ont été menées sur les enzymes humaines ou pathogènes pour l'Homme. Cependant, les sulfatases permettent la désulfatation de nombreux autres composés biologiques, tels que les carraghénanes où par contre très peu de sulfatases actives ont été décrites. Tout au long de cette thèse, ces enzymes furent au cœur de notre travail, puisqu'elles représentent des outils potentiels pour modifier la structure des carraghénanes. Pour cette raison, cette classe d'enzymes sera ici décrite dans le détail.

A. Importance des molécules sulfatées...

Les molécules sulfatées sont extrêmement diverses d'un point de vue structural comme d'un point de vue fonctions biologiques. Chez l'homme et d'autres vertébrés, plusieurs classes de composés sulfatés ont été particulièrement étudiées : les cérébrosides sulfatés, un groupe de glycosphingolipides membranaires des cellules nerveuses (Coetzee *et al.*, 1998) ; les stéroïdes sulfatés, qui servent de précurseurs aux molécules d'oestrogènes, d'androgènes et de cholestérols (Reed *et al.*, 2005) ; les glycoaminoglycans (GAGs) qui sont les constituants majeurs de la matrice extracellulaire et participent à de nombreux processus physiologiques (Sasisekharan *et al.*, 2006). On retrouve ces derniers polysaccharides chez les invertébrés (Medeiros *et al.*, 2000).

Mais c'est dans le milieu marin, riche en sulfate (25 mM dans l'eau de mer), que les molécules sulfatées sont les plus abondantes. En effet, toutes les macro-algues marines synthétisent des polysaccharides sulfatés qui sont les composants majeurs de leur paroi cellulaire : les agars et les carraghénanes chez les algues rouges (Cosson *et al.*, 1995), les fucanes chez les algues brunes (Kloareg & Quatrano, 1988), et les ulvanes et autres galactanes sulfatés (xylogalactoarabinane, glucuronane) chez les algues vertes (Lahaye & Robic, 2007). Comme les GAGs chez les animaux, ces polysaccharides jouent un rôle structural crucial, et présentent de nombreuses fonctions biologiques.

Il est important de souligner que l'abondance du sulfate chez les eucaryotes marins serait une réponse à leur adaptation dans le milieu marin ; on ne trouve en effet aucun polysaccharide sulfaté chez les plantes terrestres. Les algues rouges et brunes produisent une seconde classe de molécules sulfatées, les phlorotannins, des oligomères de polyphénols sulfatés et/ou halogénés, impliqués dans les mécanismes de bioadhésion (Vreeland *et al.*, 1998). De nombreux exopolysaccharides produits par des bactéries sont également sulfatés (Llamas *et al.*, 2011).

B. ...et des sulfatases dans les bactéries marines

Comme dans l'environnement terrestre, ce sont les micro-organismes qui sont les plus aptes à dégrader les molécules sulfatées présentes dans le milieu marin, pour survenir à leurs besoins en source de soufre et de carbone. Une des sources abondantes de soufre est représentée par les algues échouées sur les grèves, qui sont ainsi décomposées par de nombreux micro-organismes produisant des sulfatases. Ainsi, si l'on s'intéresse au génome des bactéries marines, on peut constater que certaines espèces possèdent un très grand nombre de sulfatases. C'est le cas de la bactérie *Rhodopirellula baltica*, qui dénombre pas moins de 104 sulfatases à formylglycine (Glöckner *et al.*, 2003). On suppose qu'une grande partie de ces enzymes sont impliquées dans la dégradation de polysaccharides sulfatés provenant des algues marines (Glöckner *et al.*, 2003). De plus, le génome de la bactérie marine *Zobellia galactanivorans*, devenue une référence dans la dégradation de polysaccharides marins (Barbeyron *et al.*, 2001 ; Michel *et al.*, 2006) a révélé la présence de 71 sulfatases à formylglycine (Tristan Barbeyron, communication personnelle, travaux en cours de publication).

C. Les enzymes de désulfatation : les Sulfatases

Les sulfatases constituent une famille d'enzymes présente chez les trois royaumes du vivant : les Eubactéries, les Archées et les Eucaryotes. Ces enzymes ont été découvertes au cours du 20^{ème} siècle, cependant pendant longtemps, leur rôle a été sous-évalué et souvent

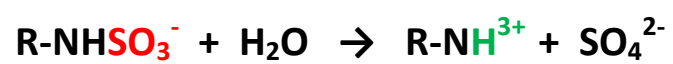


Figure IG-38 : Réactions catalysées par les sulfatases

réduit à la dégradation du sulfate inorganique dans les sols (Hanson *et al.*, 2004). L'importance des sulfatases a en fait été soulignée par leur implication dans divers désordres génétiques chez l'homme. En effet, les déficits de nombre d'entre elles sont responsables de maladies héréditaires graves, telles que les mucopolysaccharidoses (Neufeld & Muenzer, 2001), la leucodystrophie métachromatique (Von Figura *et al.*, 2001), l'ichtyose liée au chromosome X (Ballabio & Shapiro, 2001), ou la chondrodysplasie *punctata* aussi appelée syndrome de Conradi-Hünemann (Franco *et al.*, 1995). La maladie d'Austin (Maire, 2003), ou syndrome du déficit multiple en sulfatases, présente les conséquences de l'ensemble des maladies précédemment citées, puisque caractérisée par des déficits plus ou moins importants de toutes les sulfatases humaines connues à ce jour. Depuis, les sulfatases en général ont révélé être impliquées dans de nombreux processus métaboliques tels que la biosynthèse des hormones, la dégradation cellulaire ou la régulation du développement des cellules de signalisation chez les mammifères (Parenti *et al.*, 1997 ; Hopwood & Ballabio, 2001 ; Hanson *et al.*, 2004). On les trouve dans divers compartiments subcellulaires : lysosome, Golgi et réticulum endoplasmique.

Les sulfatases catalysent la désulfatation des esters sulfatés (CO-S) et des sulfamates (CN-S) suivant les réactions décrites à la figure IG-38. Ces réactions sont communes à toutes les sulfatases, bien que chacune ait sa propre spécificité de substrat. Ces enzymes hydrolysent les liaisons ester-sulfate de nombreux composés biologiques : stéroïdes, carbohydrates, protéoglycanes, ou encore glycolipides (Sardiello *et al.*, 2005). Un nombre limité de sulfatases a été biochimiquement caractérisé (principalement chez l'Homme) au regard de la grande diversité des substrats sulfatés.

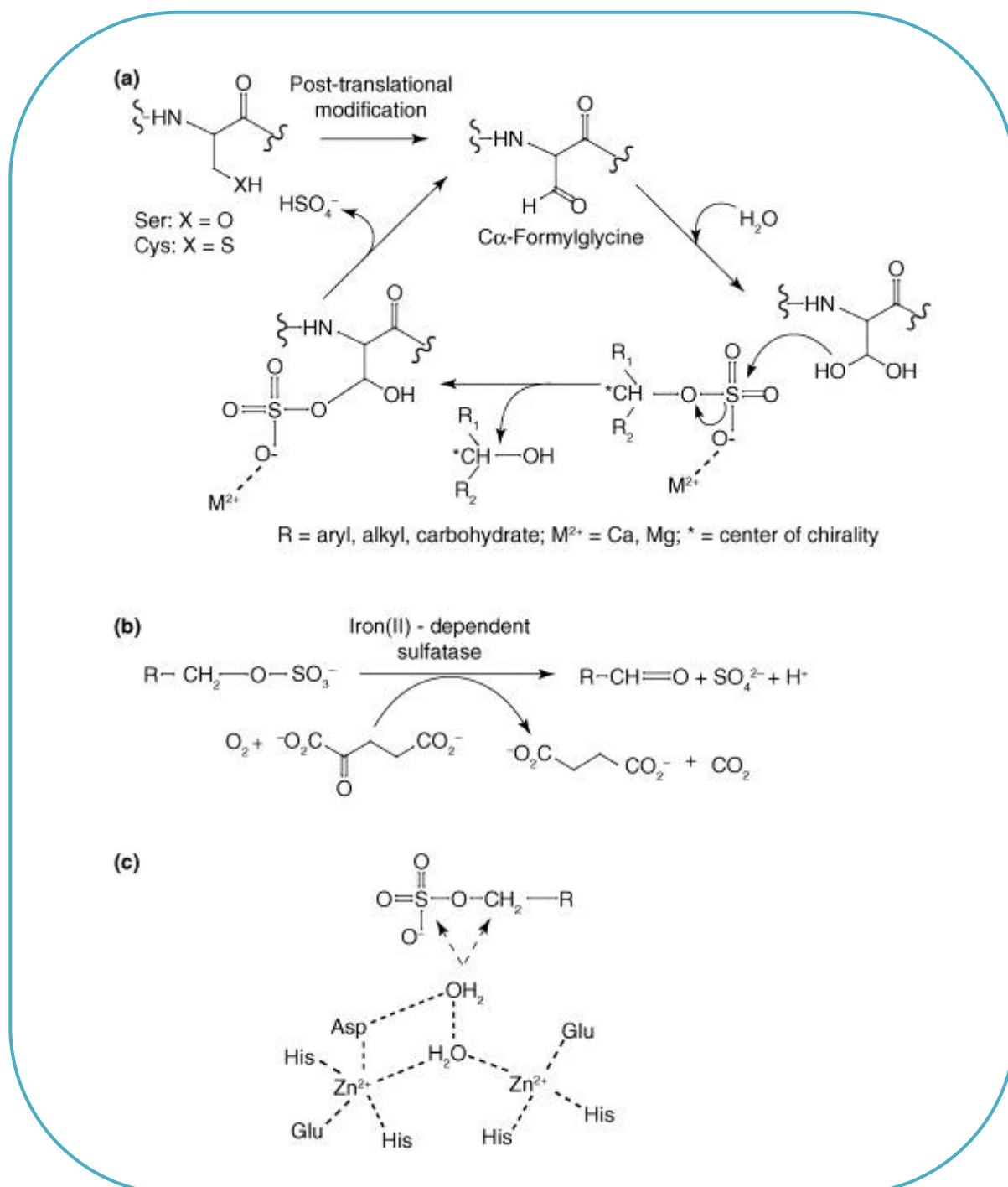


Figure IG-39 : Mécanismes catalytiques des sulfatases (Gadler & Fabert, 2006)

- (a) Mécanisme des sulfatases à formylglycine : la forme hydratée du résidu α -formylglycine attaque l'atome S par expulsion de l'alcool avec rétention de la configuration.
- (b) Clivage oxydatif des esters sulfatés par les sulfatases dépendantes du fer (II), conduisant à la destruction du centre chiral en C.
- (c) Sphère de coordination des atomes de Zn^{2+} dans le site actif des sulfatases métallo- β -lactamases ; l'attaque nucléophile de la molécule d'eau activée pourrait se produire sur l'atome S ou C.

D. Classification des sulfatases

Selon l'IUBMB, les sulfatases basées sur un mécanisme d'hydrolyse des esters portent le code EC 3.1.6.x, où x représente la spécificité de substrat. On y compte à ce jour 17 classes de sulfatases (EC 3.1.6.1 à EC 3.1.6.18 – la classe EC 3.1.6.5 ayant été supprimée) (Berteau *et al.*, 2006). Les enzymes catalysant la désulfatation des sulfamates portent le code EC 3.10.1.x. Les sulfatases basées sur un mécanisme d'oxydation portent le numéro EC 1.14.11.x (dioxygénase) (Muller *et al.*, 2004).

D.1 Classifications des sulfatases humaines

A ce jour, les analyses bioinformatiques ont révélé l'existence de 17 gènes distincts codant pour des sulfatases chez l'homme (Sardiello *et al.*, 2005). Les sulfatases humaines ont été classées sur la base de leur localisation subcellulaire et leurs activités dépendantes du pH (Buono & Cosma, 2010). Le 1^{er} groupe rassemble les sulfatases dépendantes d'un pH acide, situées dans le lysosome, telles que les arylsulfatases A et B (ARSA, et ARSB), la galactosamine-N-acétyl-6-sulfate-sulfatase (GALNS) ou l'héparane N-sulfatase (SGSH). Le 2^{ème} groupe est constitué des sulfatases dépendantes d'un pH neutre, situées dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, et inclut les arylsulfatases humaines C à H entre autres. Enfin le 3^{ème} groupe est composé des sulfatases dépendantes d'un pH neutre ou basique, localisées dans le domaine extracellulaire, comme les Sulfatases 1 (Sulf1) et 2 (Sulf2).

D.2 Classification de l'ensemble des sulfatases par famille

On compte à ce jour 3 groupes distincts de sulfatases classées par homologies de séquences d'acides aminés. Le groupe I regroupe les sulfatases à formylglycine (Figure IG-39a) dont font d'ailleurs partie toutes les sulfatases humaines, le groupe II rassemble les sulfatases dépendantes du fer (Figure IG-39b), enfin le groupe III réunit les sulfatases β -lactamases (Figure IG-39c).

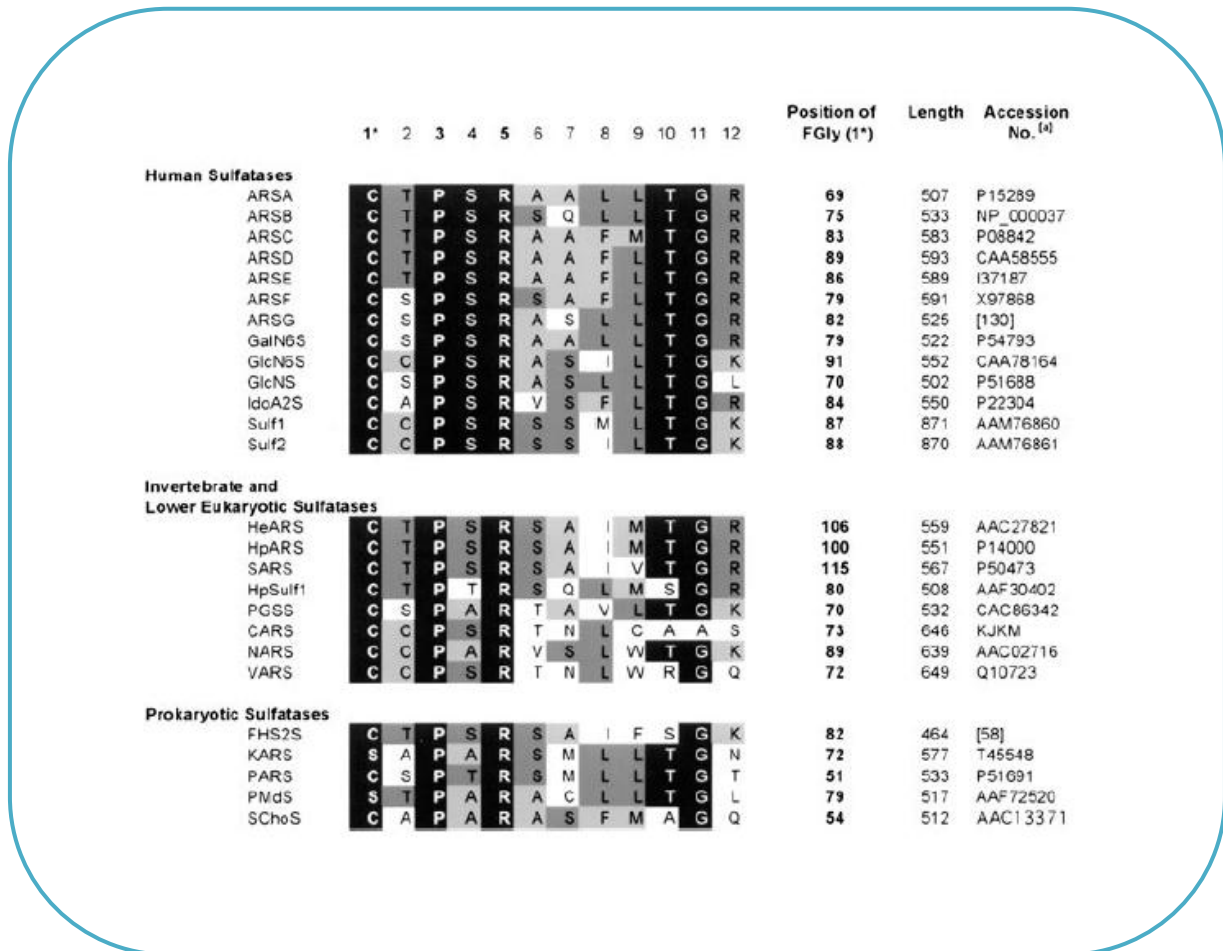


Figure IG-40 : Séquence consensus considérée comme la signature des sulfatases
(Hanson *et al.*, 2004)

Alignement partiel de gènes de sulfatases. Les résidus hautement conservés sont visualisés en blanc sur fond noir ; les autres résidus conservés de façon significative sont visualisés sur fond gris. Les codes d'accension ExPASy sont donnés, ou la référence de la littérature dans les cas échéants.

Contrairement aux sulfatases du groupe I, qui partagent de très fortes similarités de séquences, les sulfatases des groupes II et III présentent des séquences hautement divergentes, compliquant ainsi la découverte de ces protéines par les recherches de génomiques.

D.2.1 Famille I : Les sulfatases à formylglycine (FGly)

La majorité des sulfatases connues à ce jour appartiennent au groupe I : les sulfatases à Formylglycine (FGly). Souvent appelées « arylsulfatases », ces enzymes sont extrêmement répandues chez les procaryotes et les eucaryotes. Une des particularités de ces sulfatases est qu'elles doivent subir une modification post-traductionnelle au niveau de leur site actif pour être fonctionnelles (Schmidt *et al.*, 1995 ; Dierks *et al.*, 1998 ; Landgrebe *et al.*, 2003). Cette modification consiste en une oxydation d'un résidu de cystéine (sulfatases Cys-type présentes chez les eucaryotes et les procaryotes), ou de sérine (sulfatases Ser-type uniquement chez les procaryotes) qui aboutit à la formation d'un acide aminé modifié : le 3-oxoalanine couramment appelé la C α -formylglycine (FGly) (Boltes *et al.*, 2001). Cette transformation se produit pendant ou immédiatement après la traduction, avant le repliement de la sulfatase (Schmidt *et al.*, 1995) . Le résidu C α -Formylglycine est présent au sein d'un motif particulier défini par la séquence (C/S)_x(P/A)_xR, et qui est considéré comme la signature des sulfatases (Bajorova & Williams, 2008). Cette séquence consensus de 12 acides aminés est strictement conservée chez toutes les sulfatases à formylglycine (Figure IG-40) (Hanson *et al.*, 2004), et est décrite comme essentielle pour la conversion, mais aussi pour la conformation du site actif. Des mutations dans ce site actif ou dans les régions attenantes, entraîne une diminution de l'affinité du substrat ou de la stabilité de la sulfatase (Recksiek *et al.*, 1998 ; Dierks *et al.*, 1999 ; Waldow *et al.*, 1999). Par conséquent, les sulfatases sont des protéines difficile d'accès en production hétérologue, parce qu'il faut tenir compte de cette modification post-traductionnelle particulière et des divers mécanismes de modification existants.

Les sulfatases de la famille I partagent diverses caractéristiques. Elles présentent une taille relativement similaire, entre 500 et 800 acides aminés. Ce sont des protéines largement glycosylées. Enfin, elles partagent de remarquables homologies de séquences (entre 20 et 60% d'identité) sur la longueur totale de la protéine, et en particulier dans la région N-terminale qui contient la séquence consensus. Par conséquent, ces sulfatases présentent un site

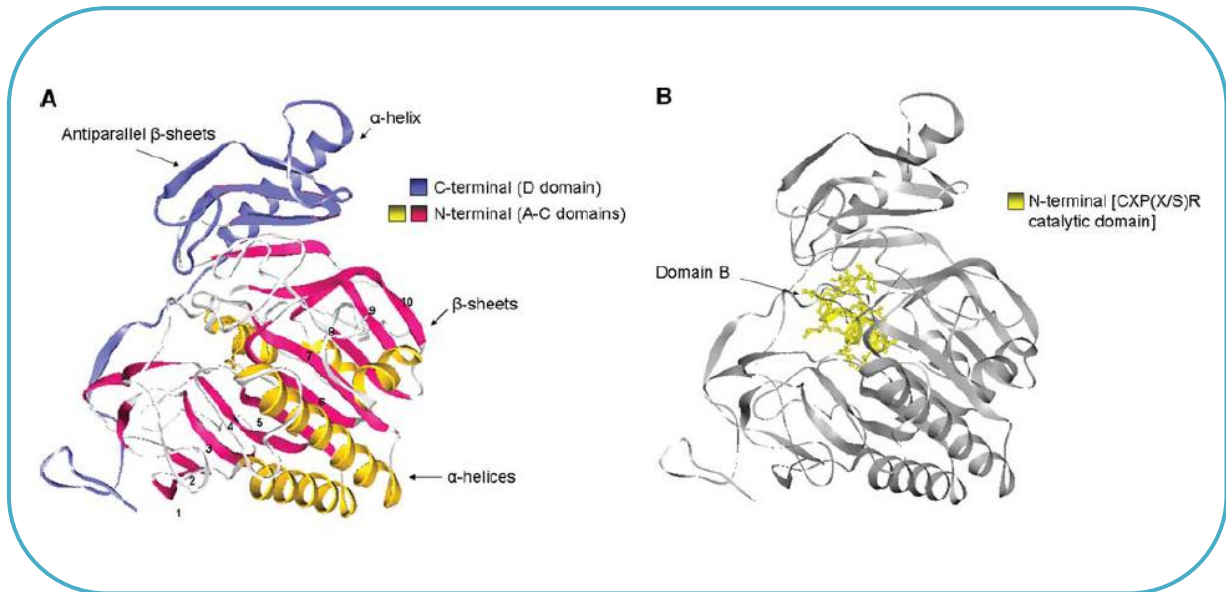


Figure IG-41 : Structure cristalline de l'arylsulfatase A humaine (ARSA) (PDB : 1AUK)
(Buono & Cosma, 2010)

(A) Visualisation des différents domaines.

(B) Représentation détaillée du domaine B de la région N-terminale qui contient la séquence consensus CXP(X/S)R dans la poche de fixation du substrat.

actif hautement similaire qui conduit à une modification post-traductionnelle unique (Diez-Roux & Ballabio, 2005). Les fortes similarités de séquence alliées aux analogies structurales de ces enzymes, suggèrent qu'elles ont évolué à partir d'un gène ancestral commun (Hanson *et al.*, 2004). Par ailleurs, des ressemblances significatives ont été observées entre les sulfatases à formylglycine et des phosphatases alcalines, notamment au niveau du site actif, suggérant un mécanisme catalytique similaire et une évolution commune de ces deux familles de protéines (Diez-Roux & Ballabio, 2005). Des similitudes entre les sulfatases et les phosphatases ont aussi été observées d'un point de vue structural.

➤ Structure cristalline

La comparaison des structures cristallines (toutes « Cys-type ») de trois sulfatases humaines (Bond *et al.*, 1997 ; Lukatela *et al.*, 1998 ; Hernandez-Guzman *et al.*, 2003) avec une sulfatase bactérienne issue de *Pseudomonas aeruginosa* (Boltes *et al.*, 2001) a montré qu'elles présentaient une structure tridimensionnelle hautement similaire, en plus d'une région fondamentale superposable, qui constitue le site actif de ces enzymes (Hopwood & Ballabio, 2001 ; Boltes *et al.*, 2001). Les structures cristallines des sulfatases à formylglycines apparaissent comme des monomères relativement sphériques et sont caractérisées par 4 domaines (Figure IG-41A) (Hanson *et al.*, 2004 ; Buono & Cosma, 2010). Les domaines A, B et C, hautement conservés, participent à la formation de la région N-terminale. Celle-ci présente plusieurs hélices α entourées par 10 grands feuillets β . Le domaine B inclut le site actif (Figure IG-41B) dans lequel les acides aminés peuvent atteindre jusqu'à 90% de similarités entre les sulfatases, révélant ainsi des régions peu variables, essentielles pour la fonction enzymatique. Le site actif des sulfatases contient un ion métallique divalent localisé dans la poche de fixation du substrat. La région C-terminale, moins conservée, inclut le domaine D. Elle est constituée par un petit feuillet β anti-parallèle, étroitement associée à une hélice α . La majeure partie de leur structure secondaire (hélices α et feuillets β) est conservée chez tous les membres des sulfatases de la famille I.

La résolution récente de deux structures cristallines de sulfatases « Ser-type » issues de *Bacteroides fragilis* et de *Bacteroides thetaiotaomicron* (Structures non publiées mais accessibles sur la PDB) montre deux domaines additionnels qui seraient spécifiques des sulfatases « Ser-type » (Bojorova & Williams, 2008).

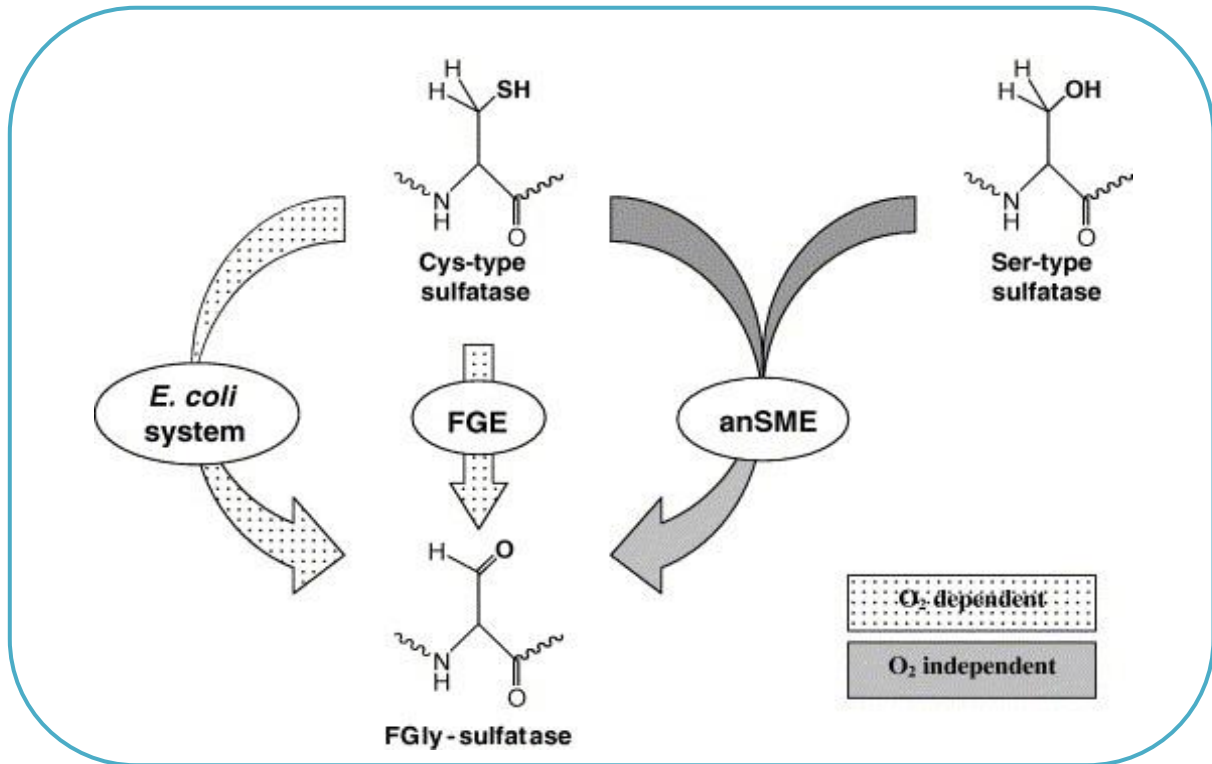


Figure IG-42 : Systèmes de maturation des sulfatases (chez les procaryotes) (Benjdia *et al.*, 2007)

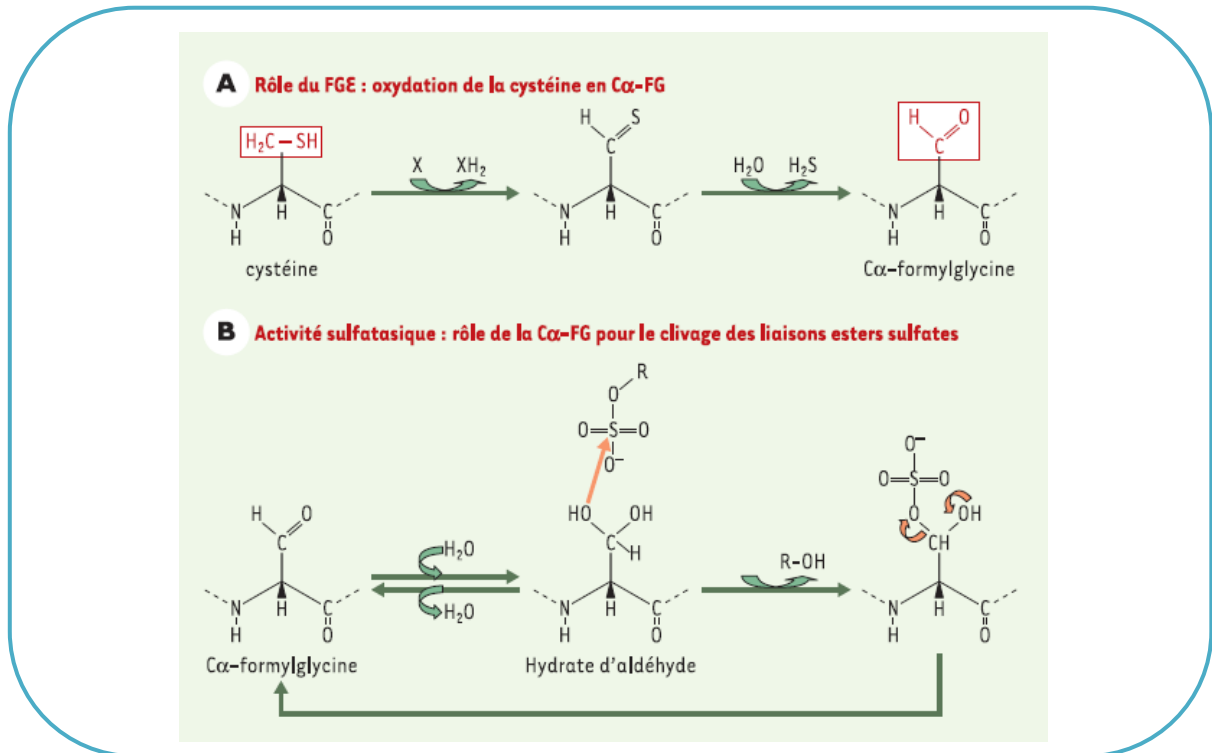


Figure IG-43 : Formation de la C α -Formylglycine (A) et rôle dans le mécanisme des sulfatases de la famille I (B) (Maire, 2003)

➤ Les enzymes de maturation des sulfatases à formylglycine

Chez les eucaryotes, présentant uniquement des sulfatases « Cys-type », la conversion post-traductionnelle est catalysée *via* la *Formylglycine Generating Enzyme* (FGE). En revanche, chez les procaryotes, la formation du résidu C α -formylglycine est catalysée par au moins 3 systèmes enzymatiques différents (Figure IG-42) (Benjdia *et al.*, 2007), mais deux seulement sont actuellement identifiés.

➤ La Formylglycine Generating Enzyme : FGE

Le premier système de maturation repose sur la **FGE** (*Formylglycine-Generating Enzyme*). L'implication de cette enzyme dans la machinerie post-traductionnelle des sulfatases de la famille I est relativement récente, puisqu'elle n'a été mise en évidence qu'en 2003 (Dierks *et al.*, 2003). La FGE appartient à la famille des oxygénases et utilise donc de l'oxygène moléculaire (O₂), ainsi qu'un agent réducteur encore non identifié, pour catalyser l'oxydation aérobie du résidu cystéine en C α -Formylglycine. La FGE est spécifique des sulfatases « Cys-type ». Elle oxyde un résidu cystéine dans la séquence consensus et forme ainsi, par l'apparition de la fonction aldéhyde, le résidu C α -Formylglycine (Figure IG-43A) (Schmidt *et al.*, 1995). Par la suite, la C α -Formylglycine, sous forme d'hydrate d'aldéhyde, peut former, après attaque nucléophile grâce à l'un de ses groupes hydroxyles, un intermédiaire covalent avec le groupement sulfate, puis le libérer grâce à son autre groupe hydroxyle (Figure IG-43B).

On retrouve la FGE chez l'homme et dans certaines bactéries. La FGE humaine a été clonée et se situe dans le réticulum endoplasmique (Dierks *et al.*, 2003). La première structure cristalline d'une FGE procaryotique a été résolue à partir de *Streptomyces coelicolor*, une homologue de la FGE de *Mycobacterium tuberculosis* (Carlson *et al.*, 2008). La topologie globale de cette FGE bactérienne présente de remarquables similarités avec celle de la FGE humaine (Dierks *et al.*, 2005). En effet, toutes deux présentent une petite structure secondaire contenant 16% d'hélices α et 12% de feuillets β , et partagent le repliement devenu caractéristique des FGE (Figure IG-44). La principale distinction réside dans le nombre d'ions Ca²⁺ stabilisant la structure : un seul pour la FGE de *S. coelicolor* et 2 ions pour la FGE humaine (Carlson *et al.*, 2008). Les sites actifs des deux FGE sont remarquablement

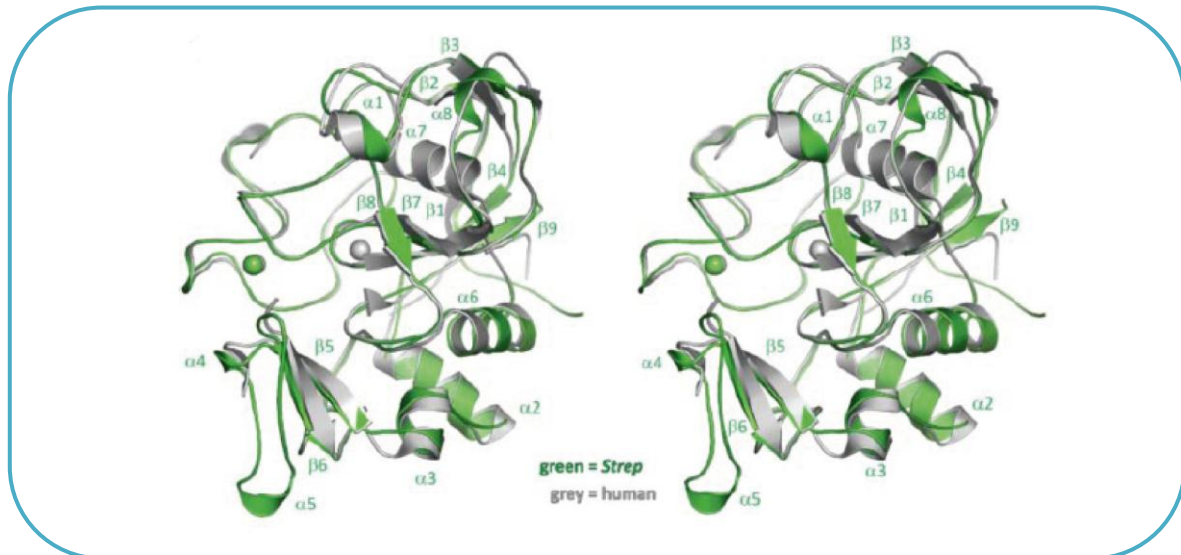


Figure IG-44 : Superposition de la structure de la FGE de *S. coelicolor* (en vert) avec celle de la FGE humaine (en gris) (Carlson *et al.*, 2008)

Les éléments de la structure secondaire de *S. coelicolor* sont indiqués.
Les ions Ca^{2+} sont schématisés par les sphères.

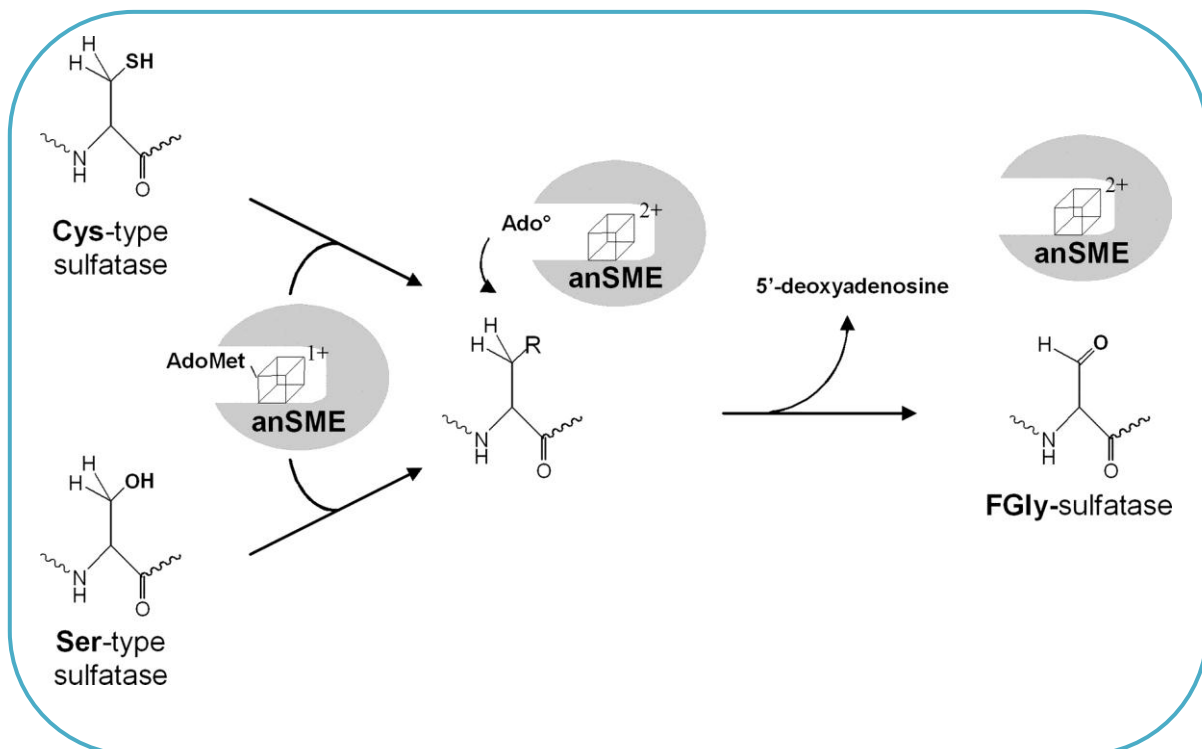


Figure IG-45 : Mécanisme proposé pour la réaction de maturation catalysée par les AnSME (Benjdia *et al.*, 2008)

Le cluster $[4\text{Fe}-4\text{S}]^+$ réduit de l'AnSME interagit avec l'AdoMet, et clive par réduction l'AdoMet en méthionine et en un radical 5'-déoxyadényl radical (Ado $^{\bullet}$). Celui-ci extrait un proton à partir d'un résidu sérine ou cystéine, amenant à la production d'un 5'-déoxyadényl radical et à la formation de la Formylglycine (FGly).

similaires avec une taille identique et la possibilité d'accueillir seulement 6 des 12 (13 suivant les publications) acides aminés définissant la signature des sulfatases.

Le rôle de la FGE est crucial pour le fonctionnement des sulfatases et son dysfonctionnement peut entraîner des conséquences extrêmement graves. En effet, la maladie d'Austin est causée par une déficience de la conversion post-traductionnelle de la cystéine en C α -formylglycine, en raison d'une mutation du gène SUMF1 codant pour la FGE (Lukatela *et al.*, 1998).

► L'Anaerobic Sulfatase Maturing Enzyme : AnSME

Le second système de maturation implique l'AnSME (*Anaerobic Sulfatase Maturing Enzyme*), qui appartient à la superfamille des enzymes radicaux AdoMet (S-adénosyl-L-méthionine) (Berteau *et al.*, 2006). Elle a été découverte en premier chez *Clostridium perfringens*, puis, par grâce à des BLASTS du motif (C/S)XAXR (la signature des sulfatases maturées) a été mise en évidence chez de nombreuses autres bactéries des phyla bactériens majeurs (Proteobacteria, Planctomycetes, Cyanobacteria, Bacteroidetes). Cette enzyme est à substrat double car capable d'hydrolyser l'oxydation des résidus cystéine et sérine en C α -formylglycine (Figure IG-45) (Benjdia *et al.*, 2008). Contrairement à la FGE, l'AnSME est capable d'activer les sulfatases dans des conditions anaérobies. Néanmoins, le mécanisme par lequel ces enzymes catalysent l'oxydation des résidus cystéine et sérine, est encore obscur mais des mécanismes détaillés hypothétiques commencent à émerger (Benjdia *et al.*, 2010). Toutefois, il a été démontré qu'en plus du motif C x_3 C x_2 C qui se lie au cluster [4Fe-4S]²⁺ commun à tous les membres de la superfamille des radicaux AdoMet, les AnSME possèdent deux clusters cystéinyles conservés additionnels avec des fonctions inconnues. Ces clusters se lient à deux autres clusters [4Fe-4S]²⁺ et sont indispensables à la conversion post-traductionnelle (Benjdia *et al.*, 2010).

➤ Le système de maturation d'*Escherichia coli*

Le troisième système de maturation est celui de *E. coli*, encore inconnu, dépendant de l'oxygène et permettant la conversion spécifique des sulfatases « Cys-type » (Benjdia *et al.*, 2007). *E. coli* est généralement considérée comme privée d'activité sulfatase, bien que 3 gènes de sulfatase, qui pourraient être essentiels à la pathogénicité des souches d'*E. coli*, sont prédits dans le génome de *E. coli* K12. Par ailleurs, il a été démontré qu'*E. coli* est capable de maturer efficacement diverses « Cys-type » sulfatases hétérologues mais pas les « Ser-type ». Cela suggère qu'une ou plusieurs enzymes de maturation des sulfatases, qui restent à être identifiées, jouent un rôle critique dans *E. coli*. Aucune enzyme apparentée à la FGE n'est présente chez *E. coli*. Cependant, dans le génome d'*E. coli*, 2 gènes *aslB* et *ydeM* codent pour des AnSME potentielles et sont localisées dans les opérons des sulfatases prédites. Elles représentent donc d'excellents candidats susceptibles de coder pour des enzymes de maturation de sulfatases « Cys-type » (Benjdia *et al.*, 2007). Le système de maturation de *E. coli* est aérobie et probablement présent dans d'autres bactéries.

D.2.2 Famille II : Les sulfatases dioxygénases Fe(II)- α -kétoglutarate dépendantes

Les sulfatases dioxygénases Fe(II)- α -kétoglutarate dépendantes constituent un deuxième groupe de sulfatases (Müller *et al.*, 2004). La superfamille des dioxygénases Fe(II)- α -kétoglutarate dépendantes présente une grande variété d'enzymes répandues chez les organismes eucaryotes et procaryotes. Elles catalysent des réactions de biosynthèse et de biodégradation. Les dioxygénases dépendantes de l' α -kétoglutarate sont classées suivant leurs caractéristiques biochimiques et dépendent de fer non hémique. Les sulfatases de ce groupe sont uniquement exprimées en conditions limitées de sulfate par les bactéries (Müller *et al.*, 2004). Elles coupent de façon oxydative les esters sulfatés en sulfate inorganique et en aldéhyde correspondant, et nécessitent à la fois de l'oxygène et un α -kétoglutarate comme co-substrats. L'enzyme « décarboxyle » une molécule d' α -kétoglutarate (α KG) en succinate par molécule d'esters sulfatés clivée.

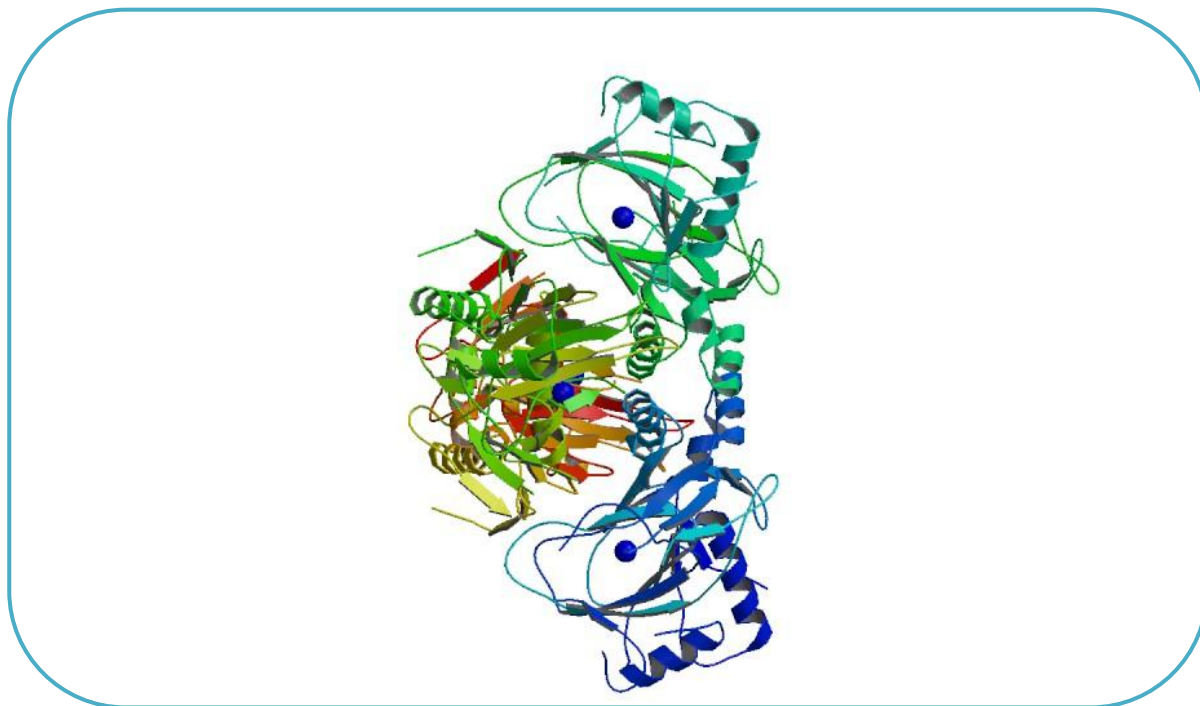


Figure IG-46 : Structure cristalline de l'alkylsulfatase AtsK de *P. putida* S-313 (PDB : 10IH)
(Müller et al., 2004)

La résolution de la structure cristalline de l'alkylsulfatase AtsK de *Pseudomonas putida* S-313 a été résolue (Müller *et al.*, 2004). Cette sulfatase appartenant à la superfamille des dioxygénases Fe(II)- α -kétoglutarate dépendantes (Kahnert & Kertesz, 2000), la résolution de sa structure a permis de révéler en partie le mécanisme des sulfatases de cette famille. Ainsi, le repliement global de ces enzymes présente le motif « Jelly roll » caractéristique de la superfamille des dioxygénases Fe(II)- α -kétoglutarate dépendantes (Figure IG-46), hébergeant le site actif dans le domaine central. Elles utilisent un « 2-his-1-carboxylate facial triad » dans leur centre catalytique et présentent des motifs communs d'acides aminés. Les principales différences parmi les structures de cette famille résident dans des insertions ou des extensions de la région C-terminale.

D.2.3 Famille III : Les sulfatases métallo- β -lactamases

Les sulfatases métallo- β -lactamases dépendantes du zinc forment le groupe III (Hagelueken *et al.*, 2006). L'expression des β -lactamases est le mécanisme le plus connu de résistance aux antibiotiques parmi les bactéries. Ces enzymes ont été groupées en 4 classes (de A à D) en concordance avec leurs homologues de séquences. Les classes A, C et D présentent un résidu sérine sur leur site actif comme nucléophile, alors que la classe B des lactamases (généralement appelées métallo- β -lactamases : M β Ls) emploie un ou deux ions Zn (II) pour couper les cycles β -lactames. Les sulfatases du groupe III présentent le repliement caractéristique des métallo- β -lactamases et en forme le groupe 13. Le premier membre du groupe III des sulfatases est la protéine *SdsA* de *Pseudomonas aeruginosa*. Elle ne présente pas de similarité de séquences avec les sulfatases des groupes I et II, mais des homologues de gènes (37% de similarités de séquences) ont été trouvés dans de nombreuses eubactéries. Les homologues eucaryotes, probablement acquis par une α -protéobactérie, sont moins fréquents.

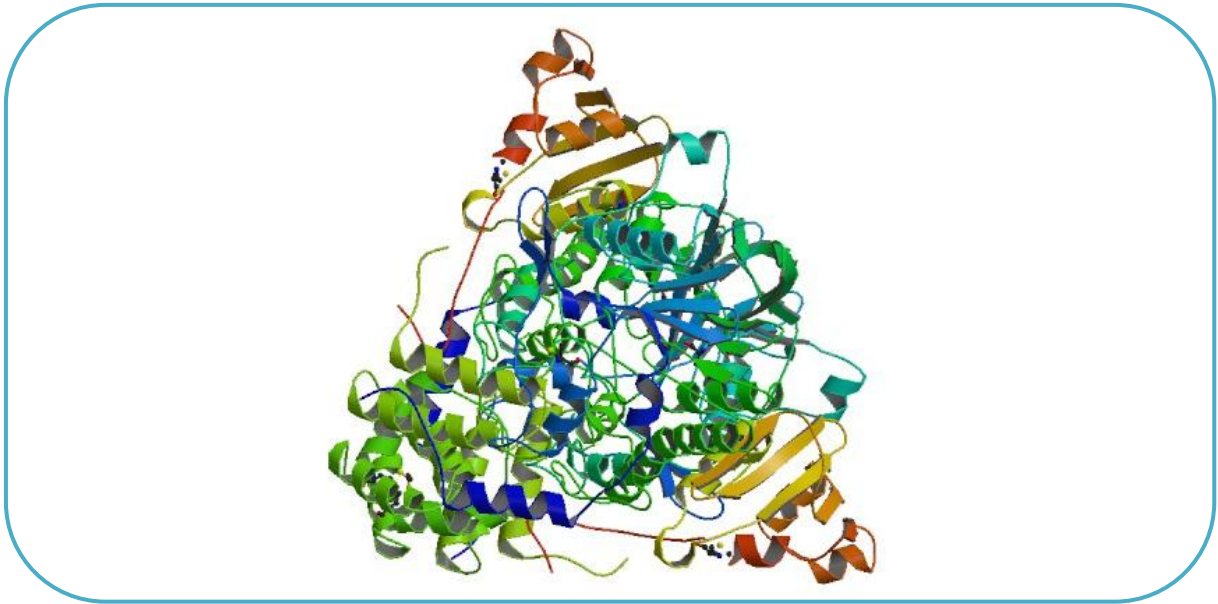


Figure IG-47 : Structure cristalline de l'alkylsulfatase SdsA1 de *P. aeruginosa* (PDB : 2CG3)

Les domaines structuraux sont différenciés par un code couleur : en bleu, le domaine N-terminal ; en vert, le domaine de dimérisation ; en rouge-orange, le domaine C-terminal. Les ions Zn²⁺ sont schématisés par des sphères jaunes.

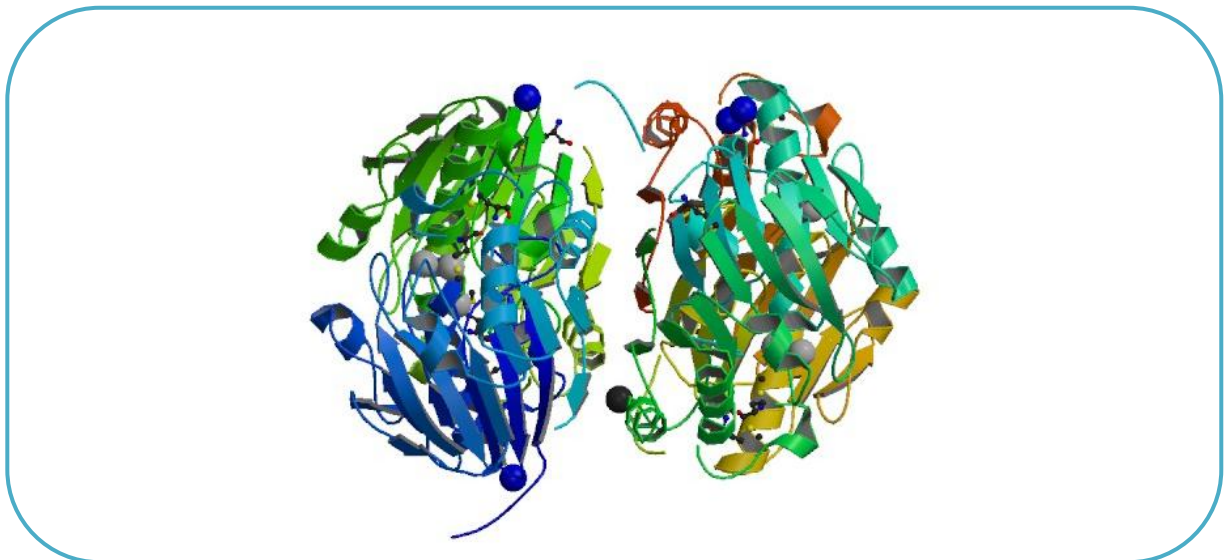


Figure IG-48 : Structure cristalline de la protéine homologue à ElaC issue de *Bacillus anthracis* (PDB : 1ZKP)

La structure cristalline de cette première sulfatase du groupe III a été établie (Figure IG-47). On y compte 3 domaines distincts : un domaine catalytique N-terminal avec un cluster binucléaire Zn^{2+} (caractéristique du repliement des M β LS) (Daiyasu *et al.*, 2001); un domaine C-terminal muni d'une région hydrophobe présumée pour recruter les longs substrats aliphatiques ; enfin un domaine central de dimérisation présentant une résistance au SDS à de fortes concentrations. Le domaine catalytique de l'arylsulfatase SdsA1 adopte un repliement $\alpha/\beta/\alpha$ commun à la famille des métallo- β -lactamases et lie deux ions zinc comme co-facteurs *via* des acides aminés histidines conservés (Davison *et al.*, 1992 ; Hagelueken *et al.*, 2006). La résolution des structures cristallines des protéines et des complexes enzyme-substrat, révèle un mécanisme enzymatique impliquant une molécule d'eau indirectement activée par le cluster Zn^{2+} , distinguant de ce fait ces sulfatases des autres classes précédemment décrites (groupe I et II).

L'arylsulfatase AtsA de *P. carrageenovora* (souche 9) (Barbeyron *et al.*, 1995) appartient à la famille des métallo- β -lactamases et présente les histidines conservées formant le site métallique binucléaire (Melino *et al.*, 1998). Cependant, elle ne présente que 13% de similarité de séquence avec le domaine catalytique de l'alkylsulfatase SdsA1 de *P. aeruginosa*, et utilise comme cofacteur des ions Mn^{2+} . La structure cristalline de la protéine homologue de ElaC de *Bacillus anthracis* (Brunzelle *et al.*, non publiée), une protéine homologue de l'AtsA de *P. carrageenovora* (souche 9), a été résolue (Figure IG-48), montrant le repliement caractéristique des β -lactamase. Ainsi, l'arylsulfatase AtsA de *P. carrageenovora* (souche 9) pourrait être le premier membre d'une sous-famille des sulfatases métallo- β -lactamases.

E. Les carraghénane-sulfatases

E.1 Les carbohydrate-sulfatases

Les groupements sulfates représentent une caractéristique structurale unique des carbohydrates liés à des protéines ou des lipides, et peut conférer à des cellules, des tissus ou des organes, des fonctions spécifiques (Honke & Taniguchi, 2002).

La plupart des sulfatases humaines sont des exo-sulfatases agissant sur des carbohydrates (Obaya, 2006 ; Sardiello *et al.*, 2005). Localisées dans le lysosome, elles permettent la dégradation d'anciens glycoconjugués sulfatés. Deux autres carbohydrate-sulfatases ont également été identifiées chez l'homme mais dans les cellules de surface (Morimoto-Tomita *et al.*, 2002). Ce sont des exo-sulfatases permettant l'hydrolyse du sulfate en position 6 des unités glucosamines du polymère d'héparine.

Les recherches sur des sulfatases agissant sur des carbohydrates ont été principalement axées sur les glycoaminoglycanes (GAGs) : chondroïtine, héparine et dermatane. Elles ont permis de révéler la haute spécificité du processus de désulfatation. On peut citer par exemple, la 2S-héparine-sulfatase de *Flavobacterium heparinum* (Raman *et al.*, 2003), inactive sur le sulfate en position 6 et réciproquement la 6S-héparine sulfatase inefficace sur le groupement sulfate en position 2 (Myette *et al.*, 2009). Toutefois, il a été démontré dans le cas de la 4S-chondroïtine-sulfatase de *B. thetaiotaomicron* que certaines modifications du substrat n'empêche pas l'action de la sulfatase (Malleron *et al.*, 2012). En effet, il semble que la présence de l'acide carboxylique n'est pas essentielle à la reconnaissance du substrat par la sulfatase dans ce cas.

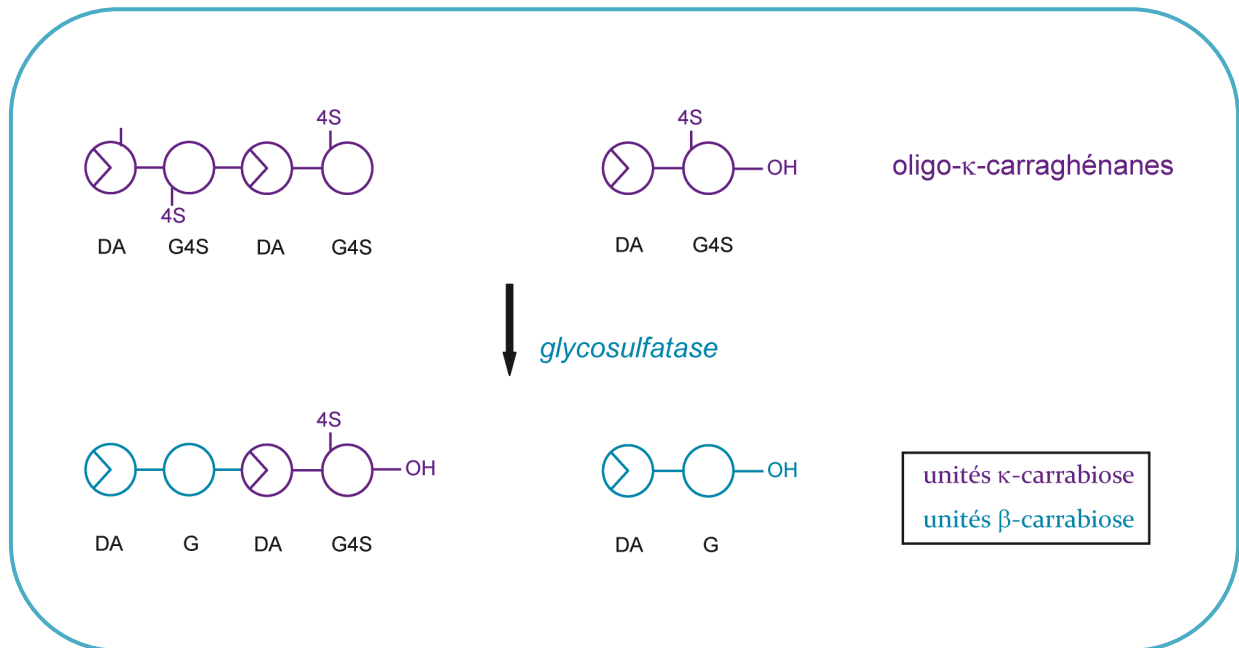


Figure IG-49 : Désulfatation des oligo-κ-carragénanes par la glycosulfatase de *P. carrageenovora* décrite par McLean & Williamson (1979)

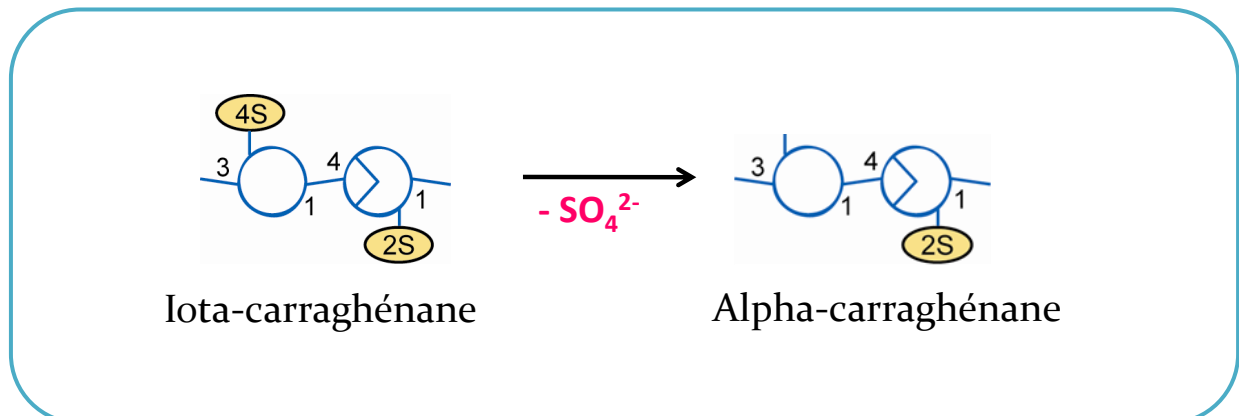


Figure IG-50 : Désulfatation du polymère de ι-carragénane par la 4S-ι-carragénane-sulfatase de *P. carrageenovora* décrite par Genicot-Joncour & Helbert (2009)

E.2 4S-oligo- κ -carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora*

La première activité sulfatase agissant sur du carraghénane a été identifiée dans la bactérie *P. carrageenovora* (Weigl & Yappe, 1966). Elle hydrolyse le groupement sulfate en position 4 de l'unité G des motifs κ -carrabioses des oligo- κ -carraghénanes DP4 et DP2 (Figure IG-49) (McLean & Williamson, 1979). Toutefois, dans le cas du DP4, seul le sulfate localisé du côté non-réducteur est hydrolysé. Cette sulfatase a été purifiée et présente un poids moléculaire d'environ 55 kDa. Elle agit selon un mode d'action exo. Les conditions optimales à l'activité de désulfatation ont été déterminées à un pH de 7,0, une température de 25°C et une concentration en NaCl entre 250 et 500 mM. L'enzyme purifiée est inhibée en présence de phosphate inorganique. L'enzyme n'a pas été séquencée à ce jour, ne permettant pas de classer cette sulfatase dans une famille.

E.3 4S- ι -carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora*

Une seconde sulfatase a été identifiée récemment chez *P. carrageenovora*, et permet l'hydrolyse du groupement sulfate en position 4 de l'unité G des motifs ι -carrabioses (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2010). Contrairement à la première sulfatase décrite, cette nouvelle sulfatase agit sur du polymère, et selon un mode d'action endo. Ainsi, par retrait du groupement sulfate, la 4S- ι -carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora* produit de l' α -carraghénane (Figure IG-50). La sulfatase purifiée présente un poids moléculaire de 110 kDa et a été séquencée. Elle ne présente aucune similarité de séquence avec les 3 familles de sulfatases décrites à ce jour. Elle constitue par conséquent le premier membre d'une nouvelle famille. Une protéine homologue, Q3IKL4 (Uniprot), a cependant été identifiée chez *Pseudoalteromonas haloplanktis* dont le génome est entièrement séquencé (Médigue *et al.*, 2005). Elle code pour une protéine hypothétique. *P. haloplanktis* est phylogénétiquement proche de *P. carrageenovora* suggérant que ces deux bactéries partagent des activités enzymatiques et des gènes en commun. Les conditions optimales d'activité de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora* ont été mesurées à un pH autour de 8,3, une température de 45°C et une concentration en NaCl avoisinant les 200 mM.

PROBLÉMATIQUE
SCIENTIFIQUE

Problématique scientifique

Les carraghénanes présentent des propriétés rhéologiques uniques et sont très largement exploités dans l'industrie agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique comme agents de texture (gélifiant et épaississant). Les multiples propriétés fonctionnelles des carraghénanes s'expliquent par leur grande diversité structurale. Car, en réalité, ces polysaccharides d'origine marine présentent dans la nature des structures hybrides. Plusieurs unités de répétitions différentes constituent la chaîne polymérique, et la composition et la distribution de ces motifs est extrêmement variable. Elle dépend en effet de nombreux facteurs notamment l'espèce de l'algue, les paramètres environnementaux ou encore le procédé d'extraction. Par conséquent, cette variabilité est difficilement maîtrisable et est, dans le meilleur des cas, corrigée par des ajustements de formulation industriels.

Ma thèse a pour finalité de contrôler les propriétés fonctionnelles des carraghénanes en faisant appel à l'utilisation d'enzymes. Manipuler les propriétés physico-chimiques de ces polymères revient en fait à contrôler leur structure chimique. Les intérêts de cet objectif sont nombreux. D'une part, il serait possible de préparer des molécules modèles homopolymériques pour des études de rhéologie. Les carraghénanes présentant des structures hybrides dans la nature, il est nécessaire de produire des structures idéales, avec un seul motif carrabiose, pour étudier les capacités de gélification des différentes structures chimiques. D'autre part, l'hybridité a un rôle essentiel sur les propriétés physico-chimiques du polymère. Par conséquent, maîtriser une structure hybride précise en contrôlant le mode de distribution des unités carrabioses, revient à créer de nouvelles propriétés rhéologiques. La possibilité de cibler des propriétés fonctionnelles présente également l'intérêt de fabriquer des carraghénanes dont la structure et les fonctions seront indépendantes de leurs origines botaniques. Enfin, contrôler la structure de ces polymères, c'est aussi la possibilité de créer de nouveaux carraghénanes avec des structures inédites, inexistantes dans la nature, telles que des hybrides κ -/ α - ou ι -/ β - par exemple. Elargir la gamme des propriétés fonctionnelles des carraghénanes, et qui plus est par un procédé biotechnologique respectueux de l'environnement, leur offre de nouvelles perspectives de valorisation dans les différents domaines industriels.

Les carraghénanes sont composés d'unités galactoses se distinguant par la présence ou non d'un pont 3,6-anhydro et par leur degré de sulfatation. Ces éléments structuraux sont des paramètres clés à la gélification de ces polymères. Trois enzymes permettent donc de jouer sur les substituants des structures de carraghénanes : les sulfotransférases, les sulfurylases et les sulfatases. Les premières, les sulfotransférases permettent la mise en place des groupements sulfate sur la molécule, mais dans le cas des carraghénanes, ces enzymes qui requièrent du PAPS (un donneur de sulfate) comme co-substrat, sont relativement mal connues. Les secondes enzymes, les sulfurylases, sont responsables de la formation du pont 3,6-anhydro. Plusieurs études ont déjà été réalisées et ont permis d'isoler les galactoses-6-sulfurylases convertissant le μ - en κ -carraghénane (Lawson & Rees, 1970 ; Wong & Craigie, 1978) et le ν - en ι -carraghénane (Genicot-Joncour *et al.*, 2009). Ces études sont d'ailleurs poursuivies dans notre laboratoire. Enfin, les sulfatases, permettent l'hydrolyse des groupements sulfate. A la lecture de la littérature, on pouvait supposer que les carraghénane-sulfatases, comme la plupart des carbohydre-sulfatases caractérisées, agissaient selon un mode d'action exo, et uniquement sur des oligosaccharides au cours de la biodégradation (McLean & Williamson, 1979). Mais une première carraghénane-sulfatase agissant sur du polymère fut découverte au laboratoire (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2010). Les intérêts biotechnologiques de sulfatases actives sur du polymère sont nettement plus importants que pour celles agissant sur les oligosaccharides, car on conserve ainsi les propriétés rhéologiques des carraghénanes. La découverte de cette sulfatase offrait de nouvelles perspectives, et le choix d'étude fut de ce fait orienté sur ces enzymes.

Il existe deux procédés majeurs pour découvrir de nouvelles enzymes. Le premier consiste à utiliser les données de génomiques pour sélectionner des gènes cibles et leur attribuer leur fonction par le biais de la surexpression. La seconde façon de procéder est de partir de l'activité enzymatique, la purifier pour permettre le séquençage de la protéine. Dans le cas des carraghénane-sulfatases, aucune séquence n'était connue au début de ces travaux. Il est donc difficile d'envisager la première stratégie. Bien que la purification de protéines natives puisse être fastidieuse, nous avons donc utilisé la seconde, et sommes partis des activités enzymatiques. Ce choix permettait également d'amorcer cette recherche sans *a priori*, pouvant conduire ainsi à des découvertes plus originales.

L’objectif de ma thèse s’inscrit donc dans la continuité de la découverte d’une sulfatase active sur du carraghénane polymérique, et avait donc pour but, dans un premier temps, la recherche de nouvelles carraghénane-sulfatases agissant sur du polymère. Fort de nos connaissances montrant que les bactéries marines catabolisant les polysaccharides possédaient obligatoirement l’activité recherchée, la stratégie envisagée reposait sur la réalisation d’un criblage de bactéries marines. Ces dernières seraient choisies en fonction de leur capacité à dégrader les polysaccharides d’algues rouges tels que l’agar et les carraghénanes. Une fois détectées, les enzymes responsables des activités les plus fortes, devaient être purifiées par des méthodes chromatographiques, pour permettre l’identification des protéines par spectrométrie de masse. La surexpression de ces sulfatases était envisagée, ainsi que la caractérisation biochimique comparative des enzymes natives et surexprimées. L’étude des mécanismes et du mode d’action des sulfatases était attendue. Enfin, les propriétés physico-chimiques des substrats modifiés par les sulfatases devaient rendre compte de l’intérêt de nos enzymes d’un point de vue biotechnologique.

Le premier volet de ce projet de thèse a donc porté sur la recherche de nouvelles carraghénane-sulfatases agissant sur du polymère. Cette investigation fut abordée en réalisant un criblage de plusieurs bactéries marines agarolytiques ou carraghénolytiques sur diverses structures de carraghénanes différentes. Les résultats obtenus par ce crible nous ont ainsi permis de cibler notre étude sur la bactérie *Pseudoalteromonas atlantica*, qui a révélé le plus grand nombre d’activités sulfatases mais surtout les plus abondantes.

Le second chapitre présente le travail réalisé sur une première sulfatase issue de *P. atlantica*, une 4S- ι -carraghénane-sulfatase. Sa purification a conduit à son identification. Il s’agit de la protéine Q15XH3 dont le gène a été annoté comme une sulfatase (Copeland *et al.*, 2006) et qui appartient à la famille des sulfatases à formylglycines. Le gène de la protéine a été surexprimé confirmant sa fonction de carraghénane-sulfatase. L’enzyme a aussi été caractérisée biochimiquement et son mode d’action étudié. La 4S- ι -carraghénane-sulfatase native a permis de réaliser de nouveaux substrats, comme l’ α -carraghénane, des oligo- α -carraghénanes ou encore des hybrides ι -/ α -carraghénane de ratios contrôlés.

Le troisième chapitre de cette thèse porte sur la purification d'une 4S- κ -carraghénane-sulfatase issue de *P. atlantica*. La protéine a pu être identifiée comme la sulfatase Q15XH1 et appartient également à la famille des formylglycines. L'enzyme a été caractérisée biochimiquement et son mode d'action déduit par comparaison de l'hybride κ -/ β -carraghénane formé avec ceux extraits des algues *Tichocarpus crinitus* et *Furcellaria Lumbricalis*. La sulfatase Q15XH1 a été surexprimée et l'activité de désulfatation des unités κ -carrabioses a pu être démontrée par RMN.

Les purifications des sulfatases Q15XH3 et Q15XH1 ont permis de mettre en évidence l'existence d'un cluster de gènes suspecté d'être impliqué dans la biodégradation des carraghénanes. Le chapitre IV relate de l'intérêt porté à ce cluster, et à la surexpression des autres sulfatases qui y sont présentes, les protéines Q15XH4 et Q15XG7. Nous avons ainsi tiré profit de l'accès aux données de génomique pour rechercher de nouvelles carraghénane-sulfatases. Bien que des doutes subsistent sur la désulfatation des oligos ι -carraghénanes par la sulfatase Q15XH4, la désulfatation des unités κ -carrabioses par la sulfatase Q15XG7 à, quant à elle, été prouvée par RMN, confirmant le rôle de ce cluster dans la dégradation des carraghénanes.

Le cinquième chapitre porte sur l'identification d'une ι -carraghénase dans *P. atlantica* et l'étude de son cluster. Homologue d'une ι -carraghénase nouvellement caractérisée chez *M. thermotolerans*, elle est en revanche très divergente des autres ι -carraghénases répertoriées. L'étude de ses produits de dégradation a permis de mettre en avant des modalités de reconnaissance différentes. La sulfatase présente dans le cluster de la ι -carraghénase a été surexprimée. L'identification de son substrat n'a pas été confirmée, cependant les résultats préliminaires laissent penser que cette sulfatase serait active sur du carraghénane.

La mise en évidence de nouvelles enzymes originales issues de la bactérie *P. atlantica*, a été abordée dans le chapitre VI. Une 2S- α -carraghénane-sulfatase permettant de convertir l' α -carraghénane en β -carraghénane a été purifiée, et l'existence d'une β -carraghénase a été confirmée. Un grand travail reste à effectuer sur ces enzymes dont l'identification serait une avancée importante pour la compréhension des voies métaboliques de *P. atlantica*.

Enfin, la mise en contexte de toutes les enzymes étudiées au cours de cette thèse dans *P. atlantica* sera effectuée dans la discussion générale. Les différentes approches entreprises (purification, génomique...) permettront de dresser une vue globale sur les mécanismes de dégradation des carraghénanes par cette bactérie marine.

Les perspectives de ces travaux seront énoncées dans la conclusion de ce manuscrit, où la création de nouveaux carraghénanes à des fins biotechnologiques sera abordée, après une étude critique des stratégies employées au cours de cette thèse.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

Chapitre I

*Recherche d'activités
carraghénane-sulfatases*

CHAPITRE I

RECHERCHE D'ACTIVITÉS CARRAGHÉNANE-SULFATASES

INTRODUCTION

Le premier objectif de cette thèse résidait dans la recherche de carraghénane-sulfatases. La désulfatation de composés biologiques reste encore une énigme d'un point de vue catabolique. L'intérêt porté à ces enzymes est par conséquent double, car en plus d'être des outils biotechnologiques potentiels, la caractérisation des sulfatases pourrait aider à la compréhension des mécanismes de biodégradation. La présence en abondance de sulfatases dans les bactéries marines a été récemment décrite, notamment à partir de l'annotation du génome de *Rhodospirellula baltica* (Glöckner *et al.*, 2003). Nous avons donc eu l'idée de cribler des bactéries marines pour trouver de nouvelles carraghénane-sulfatases.

La première carraghénane-sulfatase décrite dans la littérature au début de cette étude était celle issue de la bactérie marine *Pseudoalteromonas carrageenovora*, agissant sur les oligo- κ -carraghénanes (McLean & Williamson, 1979). Cette bactérie fut la première bactérie carraghénolytique isolée en 1955 (Yaphe & Baxter, 1955) et est aujourd'hui une référence en terme de dégradeur des carraghénanes. En effet, elle produit trois carraghénases différentes : une κ -carraghénase (Weigl *et al.*, 1966b ; McLean & Williamson, 1979a), une λ -carraghénase (Weigl *et al.*, 1966b ; Johnston & McCandless, 1973) et plus récemment observée, une ι -carraghénase (Henares *et al.*, 2010). La seconde carraghénane-sulfatase, mise en évidence récemment, agit quant à elle sur du polymère, le ι -carraghénane, et elle a également été purifiée de *P. carrageenovora* (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2010). Le cas de cette bactérie marine laissait donc entrevoir la grande probabilité de découvrir des

carraghénane-sulfatases chez des bactéries marines dégradant les carraghénanes.

La recherche de nouvelles carraghénane-sulfatases fut donc abordée en réalisant, dans un premier temps, un criblage d'activités de désulfatation. Ainsi, les extraits enzymatiques de quatre bactéries marines furent croisés avec diverses structures de carraghénanes, et les activités résultantes mesurées par une méthode chromatographique. La réalisation du criblage directement sur les carraghénanes, et non sur un substrat synthétique tel que le méthylumbelliféryl-sulfate (MUF-S), permet d'avoir un criblage plus spécifique de la structure désulfatée, jusqu'à la détermination de la position du sulfate éliminé, lorsque la structure est porteuse d'un unique groupement sulfate. En effet, une activité détectée sur le polymère de κ -carraghénane, par exemple, indique une désulfatation du groupement sulfate en position 4 de l'unité G. En revanche, pour les activités détectées sur des structures de carraghénanes présentant plusieurs groupements sulfate par unité disaccharidique, seule la RMN permet de trancher sur le sulfate éliminé, par visualisation de la conversion du carraghénane initial en un autre. Au démarrage de ce projet de thèse, nous avons fait le choix d'entreprendre le criblage uniquement sur des polymères de carraghénanes, qui présentent davantage d'intérêts biotechnologiques que les oligosaccharides.

| Bactéries | Agarases | Carraghénases | Carraghénane-sulfatases |
|---|---|---|---|
| <i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> | | κ -carraghénase (McLean & Williamson, 1979a) ι -carraghénase (Henares <i>et al.</i> , 2010) λ -carraghénase (Johnston & McCandless, 1973) | 4S-oligo- κ -sulfatase (McLean <i>et al.</i> , 1979) 4S- ι -sulfatase (Genicot & Helbert, 2010) |
| <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | | | Gène analogue à la 4S- ι -sulfatase de <i>P. carrageenovora</i> (Genicot & Helbert, 2010) |
| <i>Cobetia marina</i> | | κ -carraghénase (données internes au labo) | |
| <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> | β -agarase I (Morrice <i>et al.</i> , 1983a) β -agarase II (Morrice <i>et al.</i> , 1983b) | ι -carraghénase (CAZY, 2011) | |

Tableau 1-1 : Activités carraghénolytiques et agarolytiques des quatre bactéries criblées

RESULTATS

A. Choix des conditions du crible

A.1 Choix des différentes bactéries marines

Quatre bactéries marines carraghénolytiques ou agarolytiques disponibles au laboratoire furent sélectionnées pour la réalisation du criblage (Tableau 1-1). La bactérie *P. carrageenovora* (ATCC 43555), contenant les deux carraghénane-sulfatases déjà caractérisées, fut notamment choisie afin d'avoir une référence interne à notre test. *Pseudoalteromonas haloplanktis* (DSMZ collection N°6060) a été choisie en raison de la présence dans son génome d'un gène analogue à la 4S- ι -carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora* (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2010). *Cobetia Marina* (DSMZ collection N°4741) fut retenue pour sa capacité à dégrader le κ -carraghénane (données internes au laboratoire). De plus, la présence d'une activité sulfatase sur le λ -carraghénane avait été suspectée dans une autre souche de cette bactérie lors de précédentes études au laboratoire. Enfin, *Pseudoalteromonas atlantica* (strain T6c / BAA-1087) connue pour ses fortes activités agarolytiques (Morrice *et al.*, 1983) fut sélectionnée.

A.2 Inductions de culture des bactéries

Pour favoriser la sécrétion des enzymes recherchées, les bactéries ont été cultivées en présence de différents carraghénanes avec pour but d'induire les sulfatases. Nous avons ainsi réalisé une culture en présence de κ -carraghénane, une autre en présence de ι -carraghénane et enfin une dernière en présence de λ -carraghénane. En effet, l'ajout d'un substrat polysaccharidique dans le milieu de culture peut influencer l'expression d'enzymes de dégradation des polysaccharides produites par la bactérie. De plus, ce n'est pas toujours le substrat de l'enzyme d'intérêt qui induit sa production. Ce constat est nettement mis en

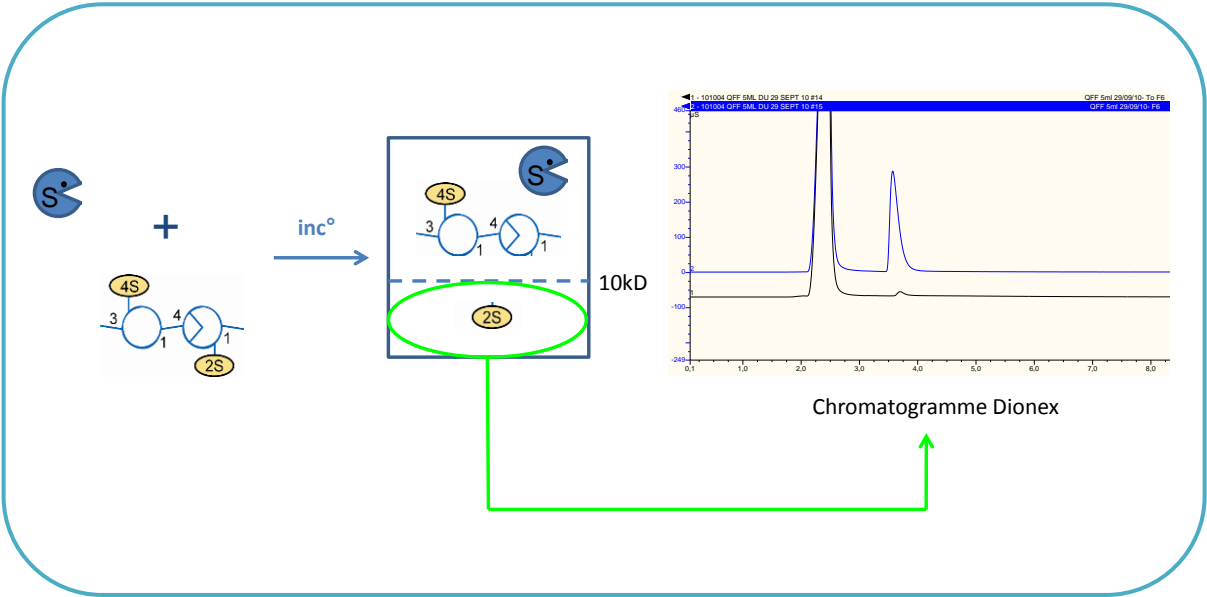


Figure 1-1 : Stratégie du dosage d'activités carraghénane-sulfatases

évidence dans le projet CRAZY (Fer *et al.*, 2012), où une activité xylanase est stimulée en présence de carraghénanes. L'importance de l'induction a également été illustrée par la carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora*, dont la production est favorisée par l'ajout de λ -carraghénane dans le milieu de culture, et non par du ι -carraghénane (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2010). Le choix de cultiver les bactéries dans différentes conditions multiplie donc les chances de détection de carraghénane-sulfatases.

A.3 Stratégie du criblage

Les cultures des quatre bactéries ont été réalisées en milieu ZoBell (ZoBell C.E, 1941), milieu à base d'eau de mer, fréquemment utilisé pour la culture de bactéries marines. Le protocole mis en place pour la préparation des extraits bactériens a été pensé pour assurer la compatibilité des échantillons avec la mesure du sulfate par chromatographie échangeuse d'anions. Ainsi, les culots bactériens lysés et les surnageants de culture concentrés ont été dialysés contre du tampon Tris-HCl, afin d'éliminer le sulfate libre présent dans les extraits. Ce sulfate provient du milieu de culture et probablement aussi de la dégradation des carraghénanes inducteurs. Les échantillons ont ensuite été incubés à 37°C pendant 48h en présence des différents carraghénanes, dans un milieu à pH 8,3. Les études réalisées au laboratoire sur la 4S- ι -carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora* ont permis d'orienter nos choix sur les conditions d'incubation à utiliser pour ce crible. Les incubations effectuées, celles-ci ont été diluées deux fois (pour éviter la saturation de la mesure des ions en chromatographie) puis filtrées sur 10 kDa. Nous avons ainsi séparé le polymère des groupements sulfate qui ont été libérés dans le milieu lors de la réaction de désulfatation (Figure 1-1). Le filtrat ainsi obtenu a été élué sur une colonne échangeuse d'anions sur un système HPLC pour mesurer la quantité de sulfate libéré lors de l'incubation. Malgré l'étape de dialyse, il reste toujours du sulfate résiduel dans les extraits bactériens. Par conséquent, pour connaître la quantité exacte du sulfate contenu dans les milieux avant la réaction, des échantillons contrôles ont été effectués dans les mêmes conditions que les incubations mais en inactivant les enzymes des extraits bactériens 15 min à 100°C. La quantité réelle de sulfate libéré par la ou les enzyme(s) de désulfatation est donc déduite en ôtant la quantité de sulfate des contrôles à celle des échantillons, et en multipliant cette valeur par deux en raison de la

(A) *Pseudoalteromonas carrageenovora*

| Extrait bactérien | Induction | Substrats | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|-------|--------|------|------|
| | | Kappa | Iota | Lambda | Mu | Nu |
| Surnageant | Kappa | 0 | 0 | 2,9 | 0 | 3,3 |
| | Iota | 7,3 | 13,7 | 0 | 0,4 | 0 |
| | Lambda | 0 | 0 | 7,7 | 0,4 | 7,9 |
| Culot | Kappa | 4,4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Iota | 31,4 | 36,8 | 0 | 42,8 | 48,3 |
| | Lambda | 49,1 | 243,8 | 10,0 | - | - |

(B) *Pseudoalteromonas haloplanktis*

| Extrait bactérien | Induction | Substrats | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|-------|--------|------|------|
| | | Kappa | Iota | Lambda | Mu | Nu |
| Surnageant | Kappa | 5,9 | 95,5 | 0 | 37,1 | 9,4 |
| | Iota | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Lambda | 0 | 270,5 | 103,6 | 74,9 | 6,6 |
| Culot | Kappa | 0 | 0 | 35,9 | 2,2 | 0 |
| | Iota | 0 | 0 | 176,9 | 16,2 | 97,0 |
| | Lambda | 20,0 | 0 | 18,4 | 28,4 | 0,9 |

(C) *Cobetia marina*

| Extrait bactérien | Induction | Substrats | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|------|--------|----|----|
| | | Kappa | Iota | Lambda | Mu | Nu |
| Surnageant | Kappa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Iota | 0 | 0 | 75,7 | 0 | 0 |
| | Lambda | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Culot | Kappa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Iota | 0 | 0 | 339,2 | 0 | 0 |
| | Lambda | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| |
|---------------|
| A > 200 |
| 100 < A < 200 |
| 50 < A < 100 |
| A < 50 |

(D) *Pseudoalteromonas atlantica*

| Extrait bactérien | Induction | Substrats | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|-------|--------|-------|-------|
| | | Kappa | Iota | Lambda | Mu | Nu |
| Surnageant | Kappa | 2,3 | 0 | 0,4 | 0,8 | 2,9 |
| | Iota | 14,1 | 409,3 | 13,1 | 228,4 | 197,2 |
| | Lambda | 2,7 | 33,7 | 7,7 | 1,0 | 59,9 |
| Culot | Kappa | 0,4 | 35,4 | 0,8 | 4,2 | 44,5 |
| | Iota | 46,8 | 840,5 | 37,9 | 93,0 | 661,2 |
| | Lambda | 3,7 | 134,2 | 0,4 | 11,2 | 179,9 |

Tableaux 1-2 : Criblage d'activités carraghénane-sulfatases

Les données sont exprimées en μM de sulfate libéré.

dilution effectuée avant la filtration.

A.4 Choix des différents carraghénanes

Le criblage a été réalisé sur le κ -carraghénane, le ι -carraghénane et le λ -carraghénane. La gélification des carraghénanes peut altérer l'activité des enzymes car le substrat est alors moins accessible (Lemoine et al., 2009). Ainsi, nous avons fait le choix de cribler également les hybrides κ -/ μ -carraghénane et ι -/ ν -carraghénane, couramment utilisés pour leur viscosité moindre en solution.

B. Mise en évidence des activités sulfatases

B.1 Mesure du sulfate libéré par HPAEC

Les résultats du criblage sont présentés dans les tableaux 2A à 2D pour les quatre bactéries criblées. Les valeurs des tableaux illustrent les activités de désulfatation détectées pour chaque incubation. Les données ont ici été exprimées en μM de sulfate libéré. Pour chaque extrait bactérien, l'induction de la culture est précisée.

Le criblage de *P. carrageenovora* (Tableau 1-2A) a montré l'activité 4S- ι -carraghénane-sulfatase précédemment observée au laboratoire (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2010) dans le lysat bactérien induit au λ -carraghénane (243,8 μM). Cette activité, que nous avons choisie comme référence interne à notre test, nous a permis de valider la sensibilité de notre protocole de criblage. Aucune autre activité significative n'a été observée chez cette bactérie dans les conditions du crible.

Les résultats obtenus pour *P. haloplanktis* (Tableau 1-2B) ont révélé également une activité de désulfatation du ι -carraghénane par un extrait induit au λ -carraghénane, mais cette fois dans le surnageant de culture (270,5 μM). Avec une intensité moindre, on retrouve cette

activité dans le surnageant induit au κ -carraghénane (95,5 μM). On peut également noter la désulfatation possible mais faible du λ -carraghénane par le culot induit au ι -carraghénane (176,9 μM) ou le surnageant induit au λ -carraghénane (103,6 μM). Toutefois, ces résultats sont à prendre avec réserve car le λ -carraghénane utilisé dans le criblage contenait en faible pourcentage des motifs κ - et ι -carrabioses. Les études RMN conduites sur ces incubations n'ont pas permis de confirmer la désulfatation du λ -carraghénane.

Une seule activité a été détectée dans le crible de *Cobetia marina* (Tableau 1-2C), sur le λ -carraghénane. La désulfatation a été mesurée avec le culot (339,2 μM) et le surnageant (75,7 μM) lorsque la culture a été induite au ι -carraghénane. Cette activité avait été suspectée lors de précédentes études, cependant elle n'a jamais pu être confirmée. Dans notre cas également, les analyses RMN n'ont pas permis de montrer la conversion du λ -carraghénane en un autre motif.

Le criblage de la bactérie *P. atlantica* (Tableau 1-2C) s'est révélé le plus intéressant. En effet, les activités étaient nombreuses et présentaient de fortes intensités. La désulfatation la plus abondante a été détectée sur le ι -carraghénane avec le culot bactérien induit au ι -carraghénane (840,5 μM) mais aussi dans le surnageant de cette culture (409,3 μM). On confirme ici l'importance de l'induction de culture car on ne retrouve pas cette activité de façon aussi abondante lorsque la bactérie a été cultivée en présence de κ - ou de λ -carraghénane (35,4 μM et 134,2 μM respectivement avec le culot). L'activité de désulfatation est confirmée par les activités retrouvées en parallèle sur l'hybride ι - ν -carraghénane (197,2 et 661,2 μM pour le surnageant et le culot respectivement induit au ι -carraghénane). *P. atlantica* révèle une autre activité plus originale avec des activités de désulfatation sur l'hybride κ -/ μ -carraghénane avec le surnageant et le culot bactérien encore induits au ι -carraghénane (228,4 et 93,0 μM respectivement).

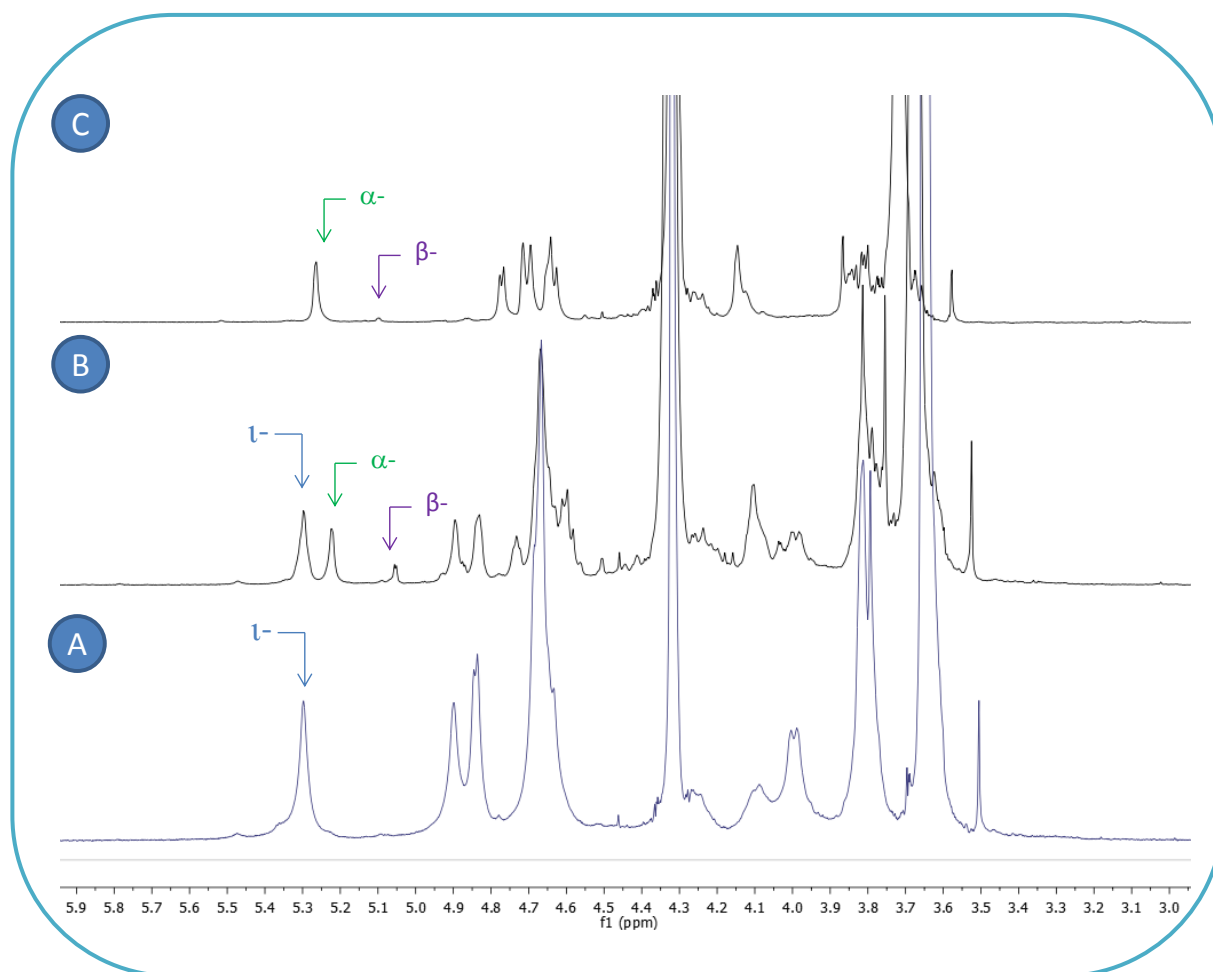


Figure 1-2 : Spectres ^1H -RMN du ι -carraghénane (A) incubé avec le surnageant de culture de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane (B) et avec le lysat de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane (C) dans les conditions du crible

B.2 Analyses RMN ^1H du criblage

Dans le cas de *P. atlantica*, seules les activités de désulfatation du ι -carraghénane ont pu être confirmées par les analyses RMN, car elles étaient suffisamment abondantes. Les spectres obtenus ont montré une réelle modification du substrat de départ (Figure 1-1). Le spectre ^1H -RMN du ι -carraghénane présente un signal caractéristique du proton anomérique à 5,35 ppm (Figure 1A). Après incubation avec le surnageant de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane, on observe l'apparition de deux autres signaux anomériques à 5,27 et 5,08 ppm (Figure 1B). Le premier à 5,27 ppm est caractéristique de l' α -carraghénane (van de Velde, 2004) tandis que le second à 5,08 ppm peut être du κ - comme du β -carraghénane, ces derniers présentant des déplacements chimiques du proton anomérique extrêmement proches (van de Velde, 2004). Le spectre ^1H -RMN du ι -carraghénane incubé, dans les conditions du crible, en présence du lysat bactérien de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane, montre essentiellement un signal à 5,28 ppm correspondant à une conversion quasi-totale du substrat en α -carraghénane (Figure 1C).

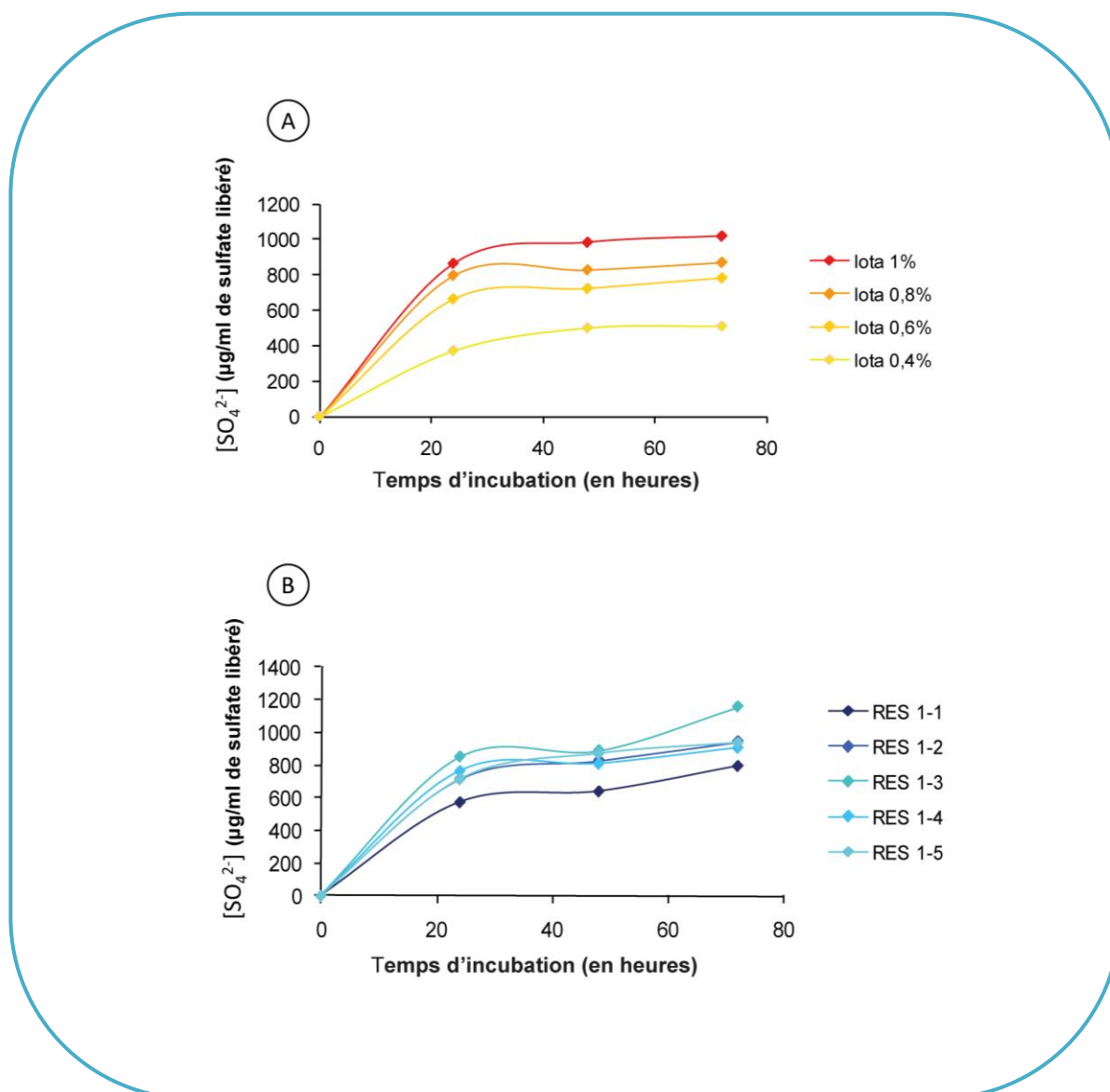


Figure 1-3 : Cinétiques de désulfatation du ι-carraghénane par le lysat de *P. atlantica* induit au ι-carraghénane, en fonction de la concentration de substrat (A) et du rapport enzyme / substrat (B)

C. Analyse des extraits bactériens de *P. atlantica*

La richesse des résultats obtenus pour le criblage de *P. atlantica*, nous a conduits à étudier de façon plus détaillée les extraits bactériens produits par cette bactérie et les activités détectées lors du criblage. Ces caractérisations sur les extraits bruts ont permis de mettre en avant des facteurs importants influençant le comportement des sulfatases, facteurs qui seront détaillés ci-après. Des activités carraghénolytiques ont également pu être mises en évidence.

C.1 Activités de désulfatation

C.1.1 Désulfatation du ι -carraghénane par le lysat de *P. atlantica*

L'activité de désulfatation mesurée lors du criblage sur le ι -carraghénane, étant nettement supérieur avec le culot bactérien qu'avec le surnageant de culture, nous avons choisis de mener les expériences suivantes exclusivement sur le lysat. En raison de la viscosité du ι -carraghénane, des cinétiques de désulfatation ont été réalisées à différentes concentrations de substrat, afin de déterminer laquelle permettait une détection nette de l'activité, sans être gêné par la viscosité du substrat. Quatre concentrations de substrat ont été choisies alliant une quantité de matière suffisante à une viscosité visuellement réduite dans le tube à 37°C : 0.4, 0.6, 0.8, et 1% (p/v). Dans la gamme de concentrations choisies, les courbes de cinétiques augmentent proportionnellement à la quantité de matière (Figure 1-3A). On peut donc estimer que la viscosité est négligeable pour l'action de la sulfatase dans ces conditions.

Dans le même but, des cinétiques de désulfatation du ι -carraghénane ont été effectuées en faisant varier le rapport enzyme / substrat : 1 volume de lysat bactérien pour 1, 2, 3, 4, ou 5 volumes de polysaccharide. Les cinétiques obtenues ont montré des profils relativement similaires pour l'ensemble des rapports dont le volume de substrat est supérieur à celui de l'enzyme (Figure 1-3B). Le rapport 1-3 présente des activités légèrement supérieures, mais de façon non significative.

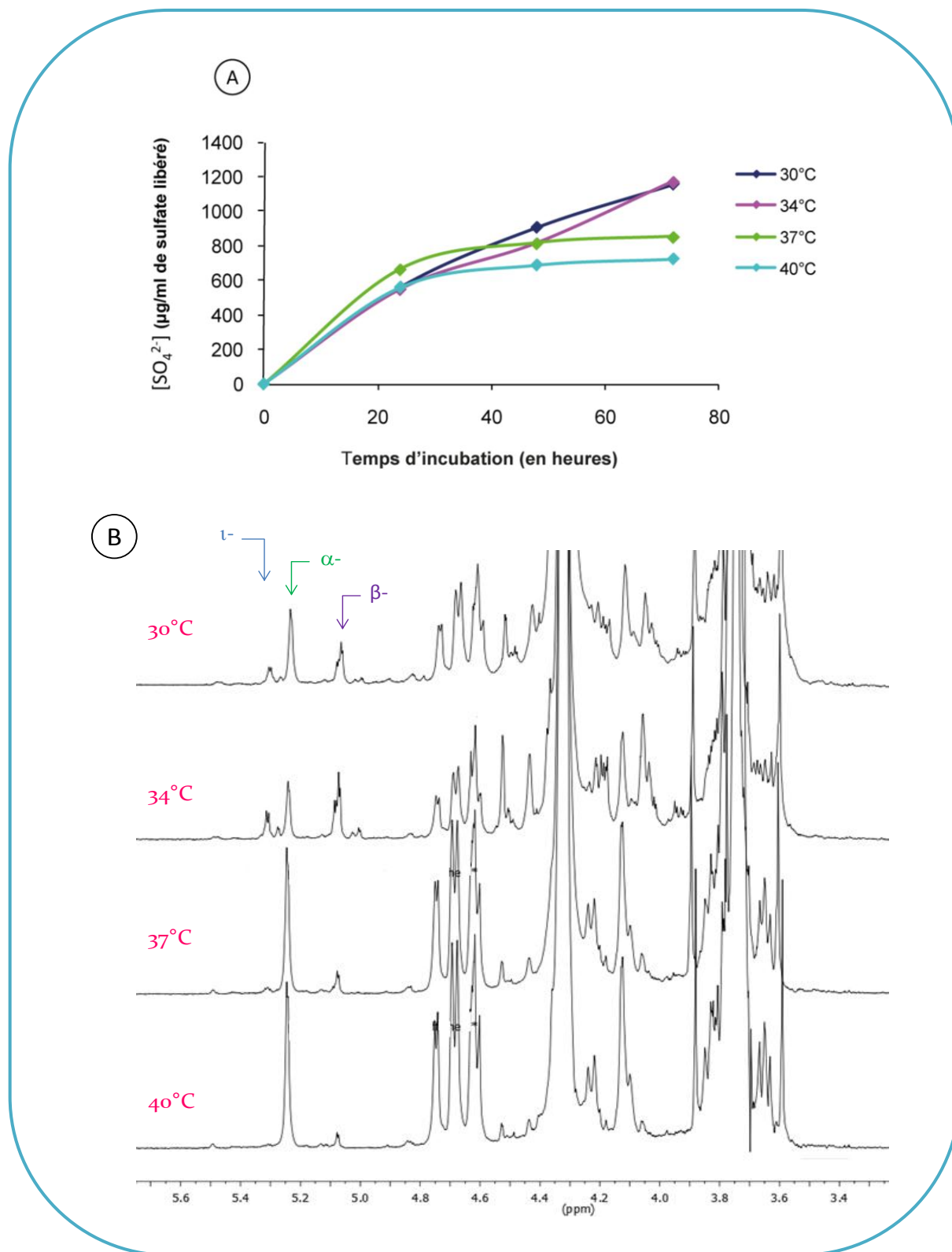


Figure 1-4 : Cinétiques de désulfatation du ι-carraghénane par le lysat de *P. atlantica* induit au ι-carraghénane, en fonction de la température d'incubation (A) et analyse RMN ^1H du point de cinétique à 72h (B)

Le comportement de la désulfatation du ι -carraghénane par le lysat bactérien de *P. atlantica* a aussi été étudié en variant la température d'incubation, dans une zone déterminée au préalable. Quatre températures furent testées : 30, 34, 37, et 40°C. Dans cette expérience, la désulfatation a été suivie par chromatographie comme pour les tests précédents, mais également par RMN. Les cinétiques obtenues par mesure HPAEC, ont montré que les deux températures les plus basses, 30 et 34°C, présentent une courbe de désulfatation qui ne semble pas avoir atteint son palier d'activité maximale après 72h d'incubation (Figure 1-4A). En revanche, les deux températures les plus élevées, soient 37 et 40°C, montrent des vitesses initiales relativement similaires mais atteignent le plateau dès 30h d'incubation. On suppose donc que l'enzyme s'est dénaturée à ces températures, tandis qu'une température plus basse la préserve pour des désulfatations de plus longue durée. Cette hypothèse est confirmée par les signaux anomériques obtenus sur les spectres RMN ^1H au dernier point de cinétique, soit 72h (Figure 1-4B). A 37 et 40°C, le ι -carraghénane (signal à 5,31 ppm) est totalement désulfaté en α -carraghénane (5,25 ppm) qui serait lui-même très légèrement désulfaté en β -carraghénane comme l'indique le signal à 5,08 ppm. En revanche, les deux températures plus basses, (30 et 34°C,) semblent favoriser une « double désulfatation » du ι -carraghénane, puisque même si le signal du ι -carraghénane résiduel est plus abondant que dans le cas précédent, l' α -carraghénane (5,23 et 5,24 ppm) est quant à lui, nettement plus converti en β -carraghénane (5,07 ppm). Ce qui explique également les plus fortes quantités de sulfate libéré mesurées par chromatographie dans ces cas. On peut donc en conclure que l'activité sulfatase qui catalyse la conversion du ι - en α -carraghénane est stable à 37°C et 40°C alors que celle convertissant l' α - en β -carraghénane est plus sensible à ces températures.

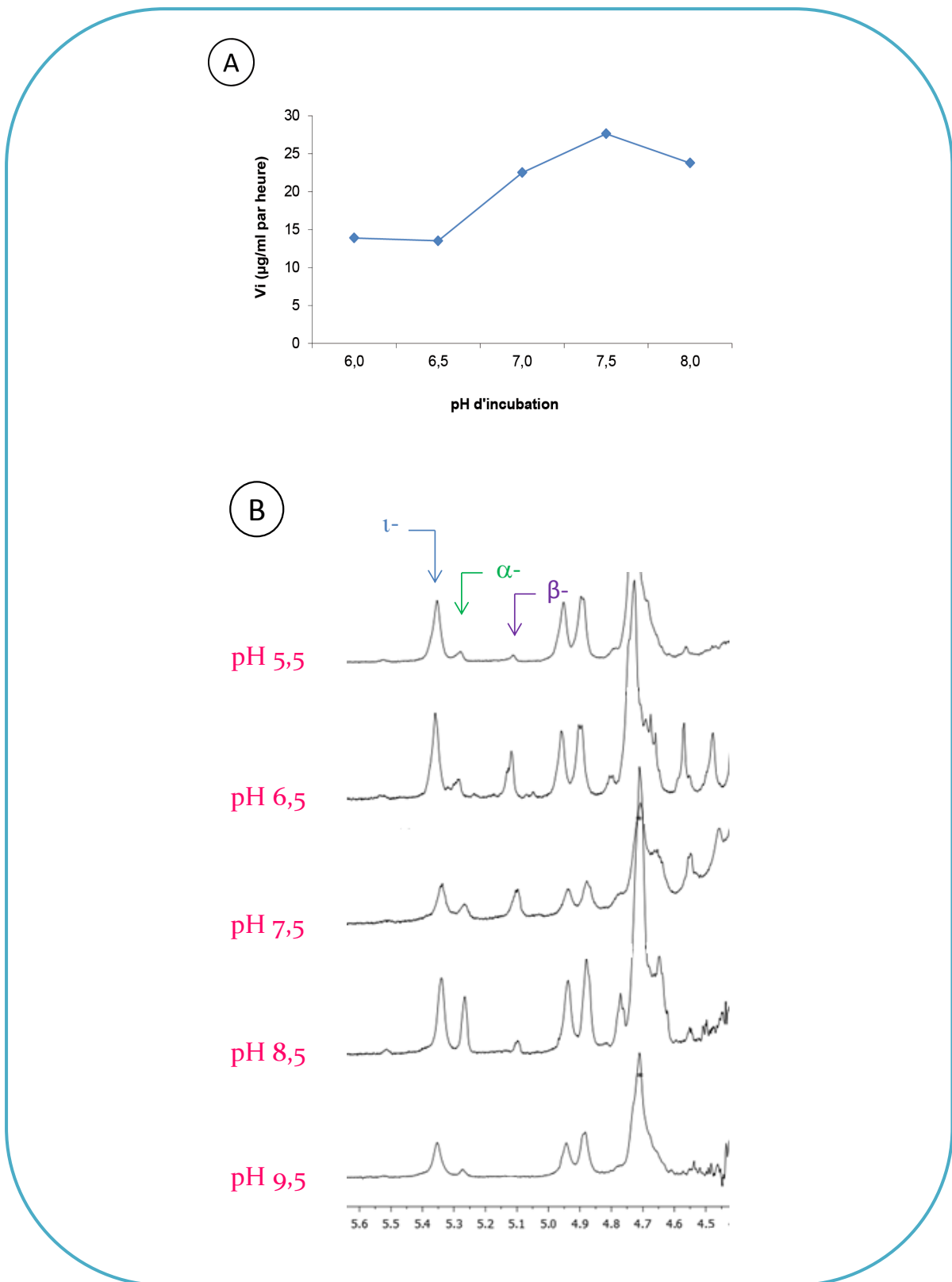


Figure 1-5 : Cinétiques de désulfatation du ι-carraghénane par le lysat de *P. atlantica* induit au ι-carraghénane, en fonction du pH d'incubation (A) et analyses ¹H-RMN des points de cinétique à 72h (B)

L'influence du pH sur la désulfatation du ι -carraghénane par le lysat de *P. atlantica* a également été étudiée sur une gamme allant de 5,5 à 9,5. Il a été observé qu'un pH de 7,5 est le plus favorable à la réaction (Figure 1-5A). Les analyses RMN ont montré des résultats corrélés aux mesures chromatographiques : la « double désulfatation » jusqu'au β -carraghénane (5,10 - 5,12 ppm) est atteinte aux pH 6,5 et 7,5 (Figure 1-5B). L'activité de conversion du ι - en α -carraghénane serait donc plus stable pour un pH compris entre 6,5 et 8,5 et celle de conversion de l' α - en β -carraghénane pour des pH de 6,5 à 7,5. Toutefois, ces conclusions sont à prendre avec précaution car nous avons utilisé 3 tampons différents pour couvrir la gamme de pH, introduisant une variable sur la nature des ions que nous avons ici négligée. Par conséquent, le comportement de l'activité de désulfatation a également été testé en fonction de la nature du tampon dans lequel était effectuée l'incubation. Quatre tampons ont été sélectionnés en fonction de leur zone tampon et ajustés à un pH de 7,5 : le Tris, le Bis-Tris Propane, l'HEPES et le MOPS. Nous avons ainsi constaté que le tampon Tris-HCl se distinguait nettement des autres tampons testés par des activités de désulfatation bien plus fortes (Figure 1-6).

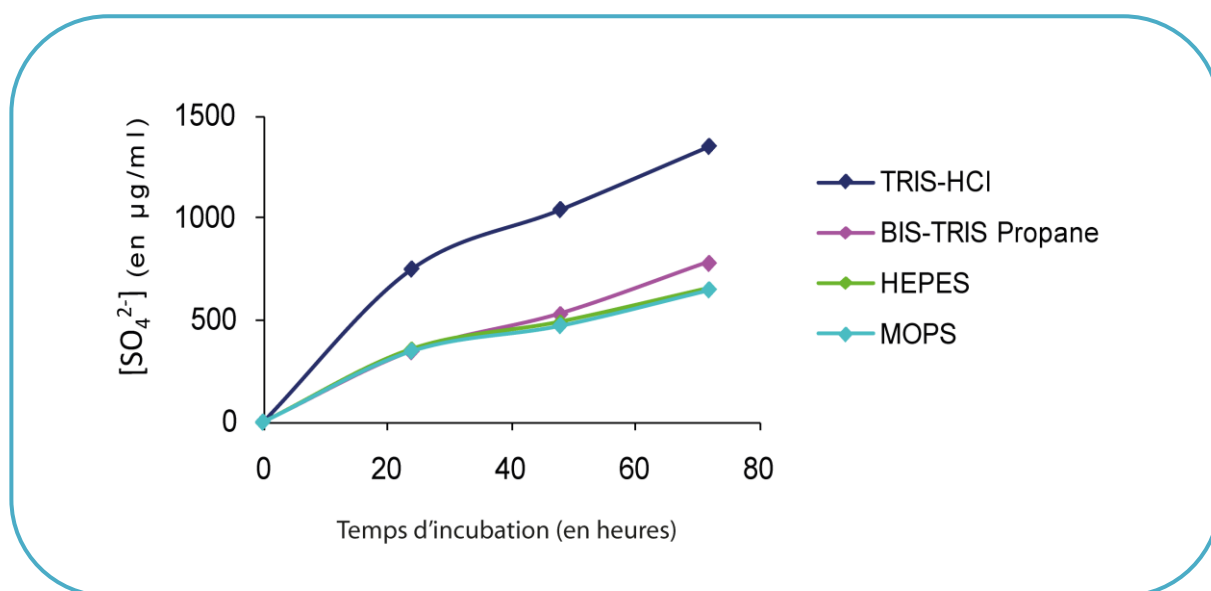


Figure 1-6 : Cinétiques de désulfatation du ι -carraghénane par le lysat de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane, en fonction de la nature du tampon

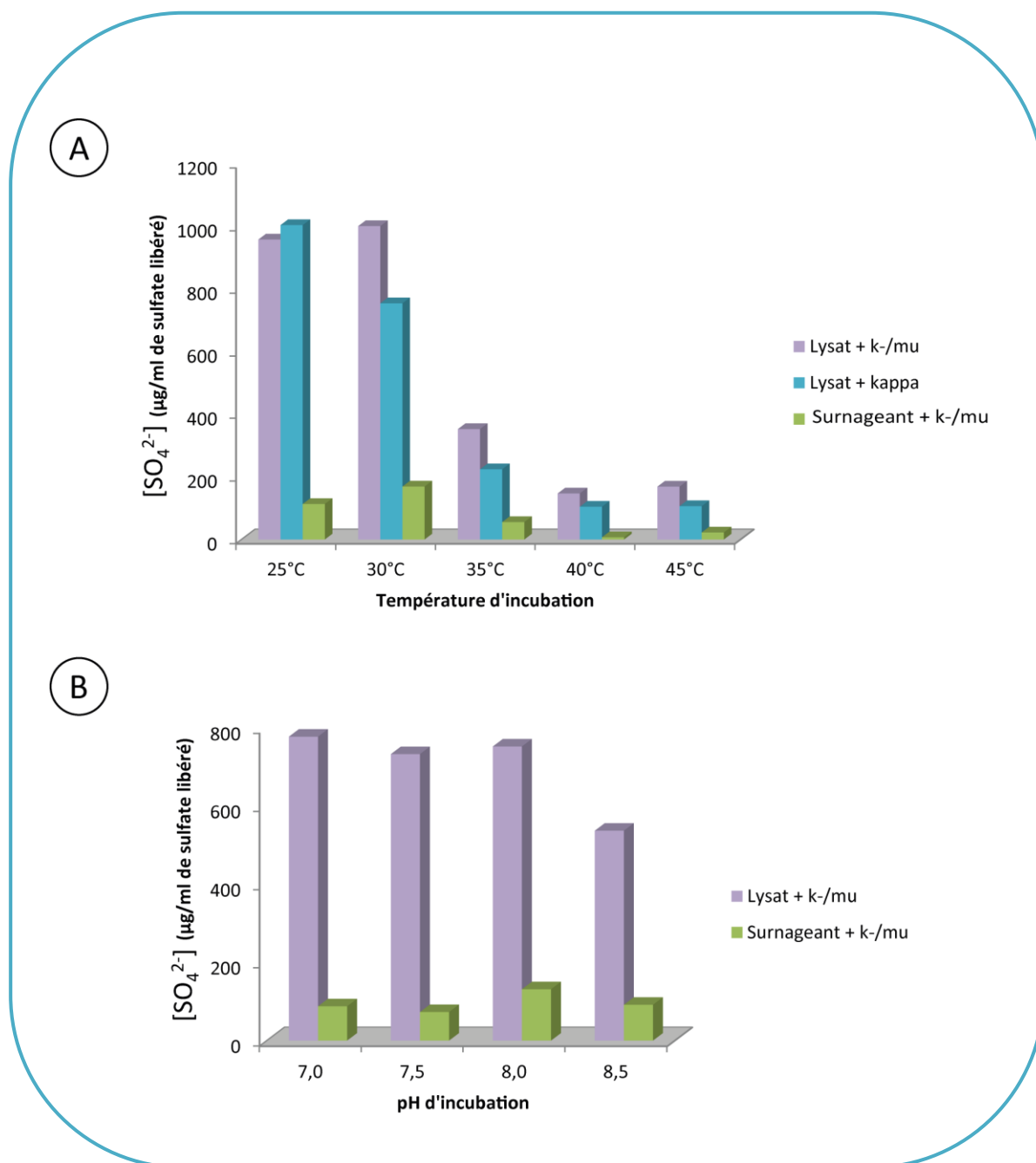


Figure 1-7 : Désulfatation du κ - ou κ - μ -carraghénane par les extraits de *P. atlantica* induits au κ -carraghénane, en fonction de la température d'incubation (A) et du pH (B)

C.1.2 Désulfatation du κ -carraghénane par le lysat de *P. atlantica*

Lors du criblage d'activités sulfatases, nous avons mis en évidence une désulfatation du κ -/ μ -carraghénane par le surnageant de culture de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane, et dans une moindre mesure par le culot bactérien (Chap I, § I-C). Ainsi, le premier test a consisté à comparer les activités de désulfatation des deux extraits à différentes températures d'incubation en présence de κ -/ μ -carraghénane. On a pu constater une désulfatation du substrat nettement plus importante avec le culot bactérien (Figure 1-7A). Il est possible que l'activité détectée dans le surnageant de culture soit en réalité une activité résiduelle, consécutive à un début de lyse des cellules qui se produirait au cours de la culture bactérienne. Des températures de 25 à 30°C sont les plus favorables à l'activité (Figure 1-7A). On peut noter que les incubations réalisées au cours du criblage étaient effectuées à 37°C, ce qui pourrait expliquer les activités plus faibles observées alors. Sur le même diagramme (Figure 1-7A), nous avons comparé la réactivité de l'enzyme face au κ -carraghénane et au κ -/ μ -carraghénane à la même concentration (1% p/v). Dans la majorité des cas, la désulfatation est légèrement supérieure sur le κ -/ μ -carraghénane, la présence de motifs μ -carrabiose rendant le substrat plus accessible à l'enzyme. Un test de comparaison de 4 conditions de pH en tampon Tris-HCl a permis de montrer la stabilité de l'enzyme dans une zone de pH comprise entre 7,0 et 8,0 (Figure 1-7B). L'ensemble de ces tests nous ont conduit à travailler sur le lysat bactérien pour envisager la purification de la κ -sulfatase.

C.2 Activités carraghénolytiques

Le ι -carraghénane a été incubé avec le lysat de *P. atlantica* dans les conditions optimales déterminées lors de l'analyse de cette activité de désulfatation (§ C.1.1), c'est-à-dire avec une concentration en ι -carraghénane de 1%, un milieu tamponné par du Tris-HCl à un pH de 7,5 et une température de 35°C. La désulfatation mesurée en chromatographie est d'environ 1500 μ g/ml de sulfate libéré par la réaction. Le spectre $^1\text{H-RMN}$ réalisé dans ces conditions montre 3 signaux de protons anomériques à 5,34, 5,27 et 5,10 ppm correspondant au ι -, α - et κ - ou β -carraghénane respectivement (Figure 1-8).

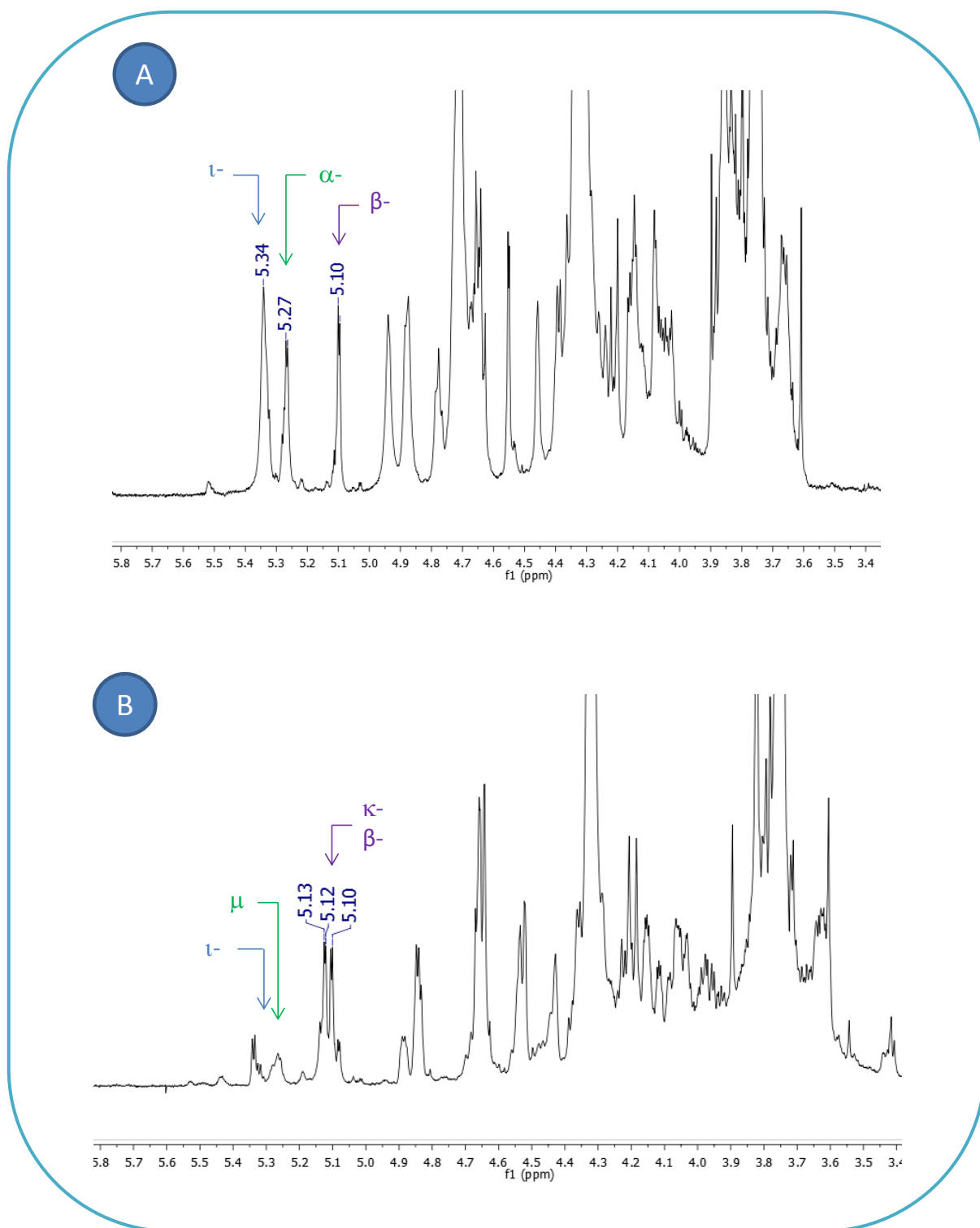


Figure 1-8 : Désulfatation du ι-carraghénane (A) et du κ-carraghénane (B) par le lysat bactérien de *P. atlantica* induits au ι-carraghénane

On observe également que le signal correspondant au substrat de départ (ι -carraghénane) comme ceux des produits de désulfatation (α - et β -carraghénanes) s'affinent au cours de l'incubation jusqu'au dédoublement des signaux anomériques notamment. Ce phénomène révèle l'existence de couplages entre des protons et est caractéristique des oligosaccharides. Ceci s'explique par une plus grande mobilité des molécules de carraghénanes induites par leur dégradation et suggère, par conséquent, la présence d'activité(s) carraghénolytique(s) dans notre extrait.

Dans le cas du κ -carraghénane incubé en présence du lysat de *P. atlantica* dans les conditions optimales, avec un pH de 7,0 et une température de 30°C, on obtient une activité de 800 $\mu\text{g/ml}$ de sulfate libéré par chromatographie. Le spectre $^1\text{H-RMN}$ correspondant montre un massif de signaux à 5,1 ppm (Figure 1-8) caractéristique des déplacements chimiques des protons anomériques du κ - et du β -carraghénane. Ces signaux sont fins et dédoublés, et l'on voit également de nouveaux signaux attenants qui apparaissent. Ces observations indiquent à nouveau la présence d'activité(s) carraghénolytique(s).

DISCUSSION

A. Criblage d'activités carraghénane-sulfatases

Du fait de la singularité de notre recherche et du manque de références à disposition dans la littérature sur le sujet, le choix du criblage de bactéries marines pour la quête de nouvelles carraghénane-sulfatases semblait le plus approprié. Pour certaines bactéries, comme c'est le cas pour *P. atlantica*, le séquençage du génome permet de connaître le nombre de sulfatases appartenant à des familles connues chez l'organisme, offrant ainsi un indice sur les possibilités de découverte de carraghénane-sulfatases. Ainsi, dans le cas de *P. atlantica*, on dénombre 19 sulfatases à formylglycine et une seule sulfatase métallo- β -lactamase (Copeland *et al.*, 2006). De plus, une fois qu'une activité est isolée, le génome permet de remonter plus facilement à la séquence du gène en question, grâce au séquençage de peptides, à la correspondance (*matching*) de la séquence avec le génome, et ainsi identifier le gène associé, voire sa fonction hypothétique. Toutefois, le substrat reste à déterminer, comme c'est le cas pour de nombreuses protéines de la classification CAZy, et les techniques de criblage alliées à des caractérisations biochimiques, demeurent le meilleur moyen d'attribuer leur substrat à des protéines de fonctions connues.

Les résultats de notre criblage se sont révélés fructueux. Assurés de la sensibilité satisfaisante de notre test, par la détection nette de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora*, nous avons pu mettre en évidence de nouvelles activités de désulfatation de carraghénanes. En plus d'être relativement nombreuses, les activités sont diverses car détectées sur différentes structures de carraghénanes (Tableau 1-2). Toutefois, se restreindre à une seule température d'incubation ou un seul pH peut sembler réducteur, et laisser penser que l'on passe à côté de certaines activités. L'intérêt d'un criblage restreint est cependant une obtention rapide de résultats, et nous avons tranché pour des conditions proches des optima de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase de *P. carrageenovora*.

Finalement, les résultats obtenus avec *P. carrageenovora*, *C. marina* et *P. haloplanktis* contrastaient avec ceux obtenus avec le criblage de *P. atlantica*, qui montrait des activités carraghénane-sulfatases abondantes et variées. La bactérie *P. atlantica* présentait également l'avantage d'avoir son génome séquencé. Dans ce contexte nous avons choisi d'orienter notre étude sur cet organisme, et plus largement sur les différents modes de dégradation des carraghénanes par cette bactérie marine.

B. Analyses des extraits bactériens de P. atlantica

Avant d'aborder la purification des carraghénane-sulfatases, une étude préliminaire a été entreprise, essentiellement sur le lysat de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane, afin de déterminer les conditions optimales à la détection des activités de désulfatation. Les spectres $^1\text{H-RMN}$ réalisés lors des caractérisations des activités de désulfatation ont permis, en plus de confirmer l'hydrolyse de groupements sulfate, de montrer la présence d'activité(s) carraghénolytique(s). Toutefois, les spectres obtenus dans ces conditions ne permettent pas d'identifier quelle(s) structure(s) de polymère est dégradée(s). Seule la purification des enzymes, permettant de séparer les activités de désulfatation de celle(s) de dépolymérisation, révélera le mécanisme enzymatique mis en jeu et la chronologie de celui-ci.

Dans le cas du κ -carraghénane, un seul groupement sulfate est présent sur l'unité κ -carrabiose, simplifiant ainsi les interprétations. On observe une activité de désulfatation et une activité de dépolymérisation. Seule la chronologie est à définir afin de déterminer si le polymère serait dégradé en premier et que la sulfatase agirait ensuite sur les oligosaccharides. Dans ce cas, nous serions dans un schéma de biodégradation du κ -carraghénane identique à celui observé chez la bactérie *P. carrageenovora* (Mclean & Williamson, 1979) (Introduction générale - § II.B). Dans le cas contraire, le κ -carraghénane serait d'abord converti en polymère de β -carraghénane par la sulfatase, puis celui-ci serait dégradé par une β -carraghénase.

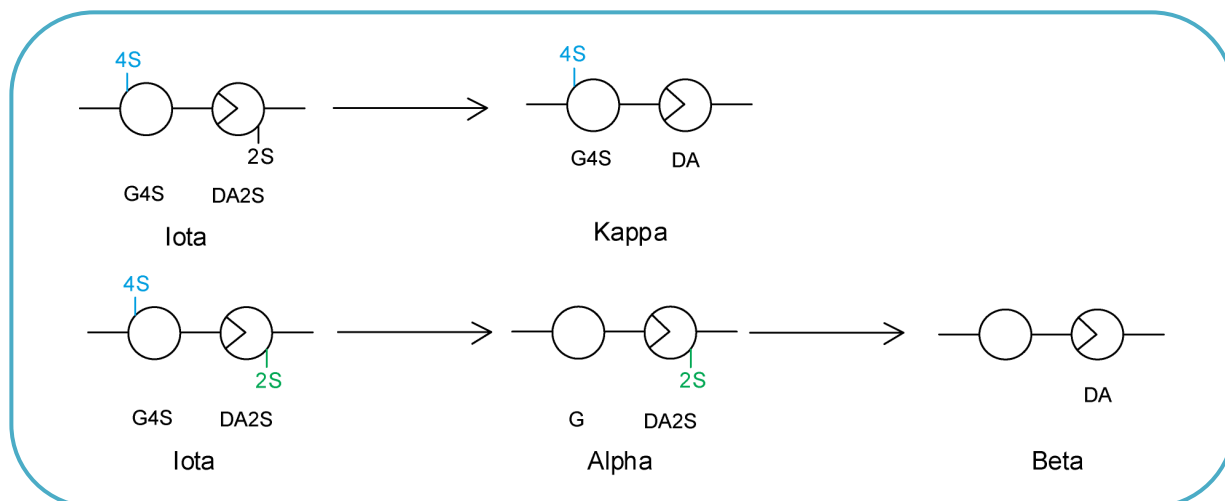


Figure 1-9 : Possibilités de désulfatation du ι -carraghénane

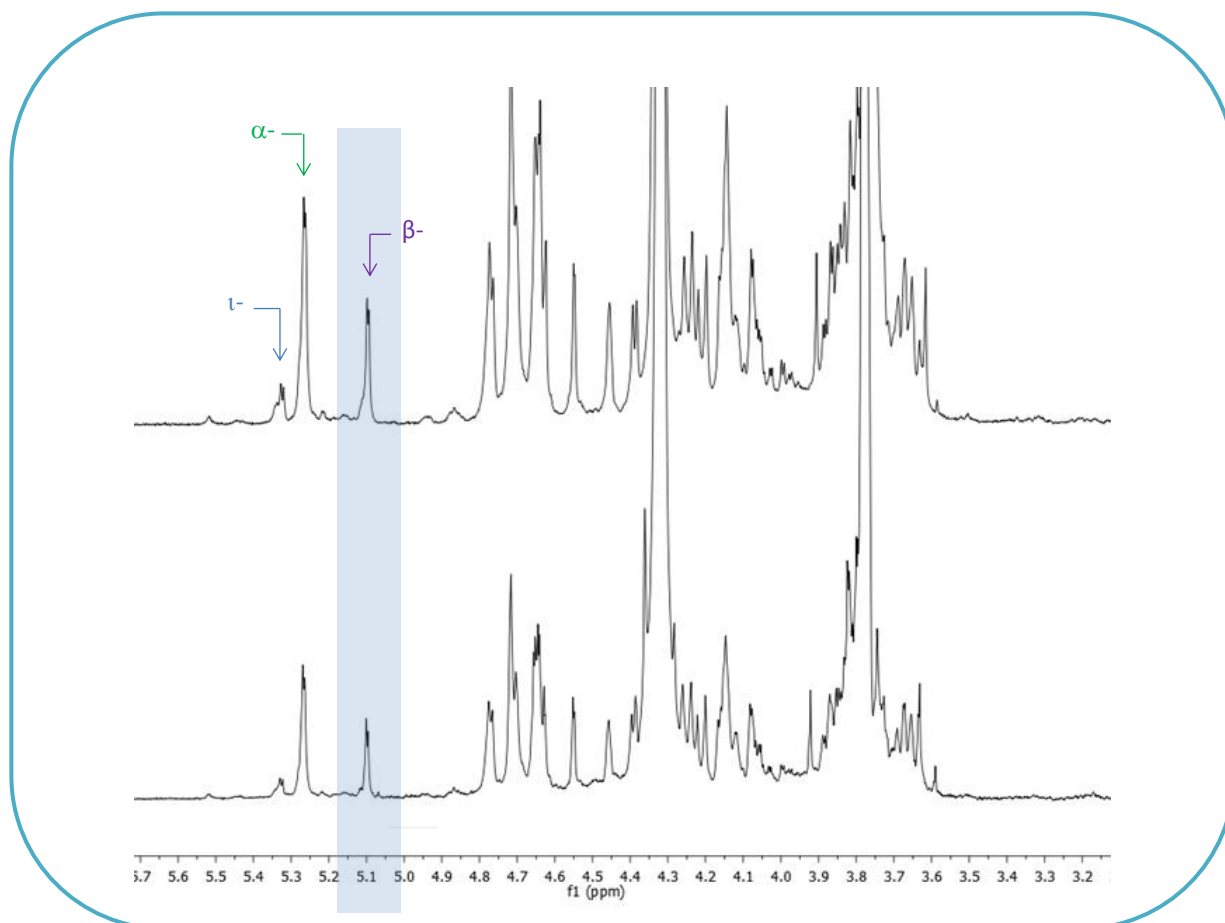


Figure 1-10 : Effet de la κ -carraghénase sur le ι -carraghénane modifié par le lysat de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane

Dans le cas du ι -carraghénane, deux schémas de désulfatation sont envisageables (Figure 1-9) puisqu'il y a deux groupements sulfate sur les unités ι -carrabioses. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer quel était le carraghénane formé dont le signal du proton anomérique était détecté à 5,08 ppm : soit du κ - soit du β -carraghénane. Ainsi, nous avons fait agir une κ -carraghénase sur notre milieu d'incubation. Aucun changement n'a été visualisé sur le spectre (Figure 1-10) orientant l'identification du carraghénane à 5,08 ppm comme étant du β -carraghénane. Un autre constat est venu appuyer cette hypothèse. En effet, nous avons constaté au cours de la caractérisation, que l'apparition du pic à 5,08 ppm sur les spectres $^1\text{H-RMN}$ n'était jamais détectable sans le signal de l' α -carraghénane. De plus, ce pic à 5,08 ppm était corrélé aux plus fortes activités de désulfatation mesurées par chromatographie. Ces valeurs sont même supérieures à celles observées pour des conversions de 100% en α -carraghénane. Cette observation suggère que nous serions dans le cas d'une « double désulfatation » lorsque l'on visualise un signal à 5,08 ppm. Par conséquent, le ι -carraghénane (5,35 ppm) serait converti dans un premier temps en α -carraghénane (5,27 ppm) par retrait du groupement sulfate en position 4 sur l'unité G ; puis l' α -carraghénane serait lui-même converti en β -carraghénane (5,08 ppm) en perdant son groupement sulfate en position 2 de l'unité DA (Figure 1-9). Comme dans le cas du κ -carraghénane, il n'est pas possible à ce stade de savoir quand intervient la dépolymérisation ni de trancher si les sulfatases mises en jeu dans ce processus agissent sur du polymère ou sur des oligosaccharides.

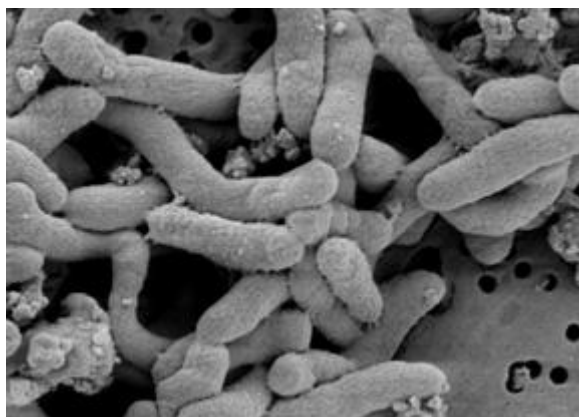


Figure 1-11 : Morphologie de la bactérie marine *Pseudoalteromonas atlantica*

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le criblage de la bactérie *P. atlantica* s'est révélé être riche de surprises, tant au niveau des activités carraghénane-sulfatases que sur la présence d'activités carraghénolytiques non prédites. L'analyse du lysat bactérien de *P. atlantica* a permis de mettre en évidence la complexité des mécanismes de biodégradation des carraghénanes par cette bactérie. En effet, on ne peut finalement pas s'intéresser aux carraghénanes-sulfatases de cet organisme sans prendre en compte le processus global et donc les enzymes de dépolymérisation. La purification des sulfatases permettra ainsi, en plus de caractériser de nouvelles enzymes, de répondre aux interrogations sur les mécanismes de biodégradation des différentes structures de carraghénanes par la bactérie marine *P. atlantica*.

Support d'étude : *Pseudoalteromonas atlantica*

Pseudoalteromonas atlantica a été isolée pour la première fois à partir d'une algue marine présente dans l'environnement côtier. Elle fût d'abord attribuée au genre *Pseudomonas* (Yaphe, 1957) avant d'être finalement affectée à celui des *Pseudoalteromonas*, après le séquençage des gènes d'ARNr 16S (Gauthier *et al.*, 1995). C'est une bactérie à gram-négatif, aérobie que l'on trouve aussi bien dans le vaste océan que sur la côte. Elle est psychrotrophe (résistante au froid) et chimioorganotrophe (elle respire en oxydant sa propre production organique). Cette bactérie, dont la morphologie représente des bâtonnets (Figure 1-11), est mobile grâce à un flagelle polaire unique lui permettant de se déplacer aisément entre des surfaces solides et l'océan, à la recherche de nutriments. Comme la plupart des espèces de *Pseudoalteromonas*, on trouve généralement *P. atlantica* associée à des hôtes marins eucaryotes, tels que les crabes et les algues (Yaphe, 1957 ; Costa-Ramos & Rowley, 2004).

P. atlantica présente la capacité de produire de façon très abondante des exopolysaccharides (EPS) lors de la formation de biofilms. Ceci révèle un fort potentiel en matière de recyclage des éléments, de désintoxication et de production de matériaux. C'est

également une bactérie dégradant l'agar, donc productrice d'agarases, enzymes largement utilisées en biotechnologie et dont, grâce à *P. atlantica*, l'une d'elles est aujourd'hui produite commercialement. En effet, c'est une β -agarase issue d'une souche *P. atlantica* sp que l'on trouve dans le commerce, sous sa forme recombinante. En plus des agarases, on trouve dans les diverses souches de *P. atlantica* des enzymes capables d'hydrolyser l'alginate et les carraghénanes (Akagawa-Matsushita, 1992), des EPS (Corpe, 1973; Uhlinger & Blanc, 1983), des molécules de signalisation (homosérine lactones ; A. Karls, données inédites), et des protéases (Hoffman & Decho, 2000). *P. atlantica* est également capable d'hydrolyser la protéine de gélatine en acides aminés individuels essentiels, afin de les utiliser comme nutriments.

Il a été montré que *P. atlantica* peut provoquer une maladie infectieuse chez des crabes comestibles. Des études démontrent en effet que les produits extracellulaires de *P. atlantica* entraînent une mort rapide lorsqu'ils sont injectés chez des crabes sains. Cependant, aucune étude à ce jour montre que *P. atlantica* serait nocive pour les humains (Costa-Ramos & Rowley, 2004).

Il existe plusieurs souches de *P. atlantica*. Lors de ce travail nous nous sommes intéressés à la souche T6c (ATCC-BAA-1087). Le génome de *P. atlantica* T6c est entièrement séquencé depuis 2006 (Copeland *et al.*, 2006). Sa taille est de 5.187007 mégabases et sa teneur en GC est de 45%. La bactérie n'a pas de plasmides connus. Le recensement des enzymes répertoriées dans la base de données CAZy révèle, à ce jour, 28 familles de glycoside-hydrolases, 12 familles de glycosyl-transférases, 3 familles de polysaccharide-lyases, 4 familles de carbohydre-estérases, et 7 familles de CBM (Site Web CAZy : www.cazy.org).

D'autre part, on compte également dans le génome de *P. atlantica* T6c **20** sulfatases de familles connues dont 19 appartiennent à la famille des sulfatases à formylglycine, et la dernière est une métallo- β -lactamase. Cela n'exclut pas qu'il puisse y avoir d'autres sulfatases, de familles inconnues, chez cette bactérie.

RESULTATS

Chapitre II

Identification d'une

4S-1-carraghénane-sulfatase :

La sulfatase Q15XH3 de P. atlantica

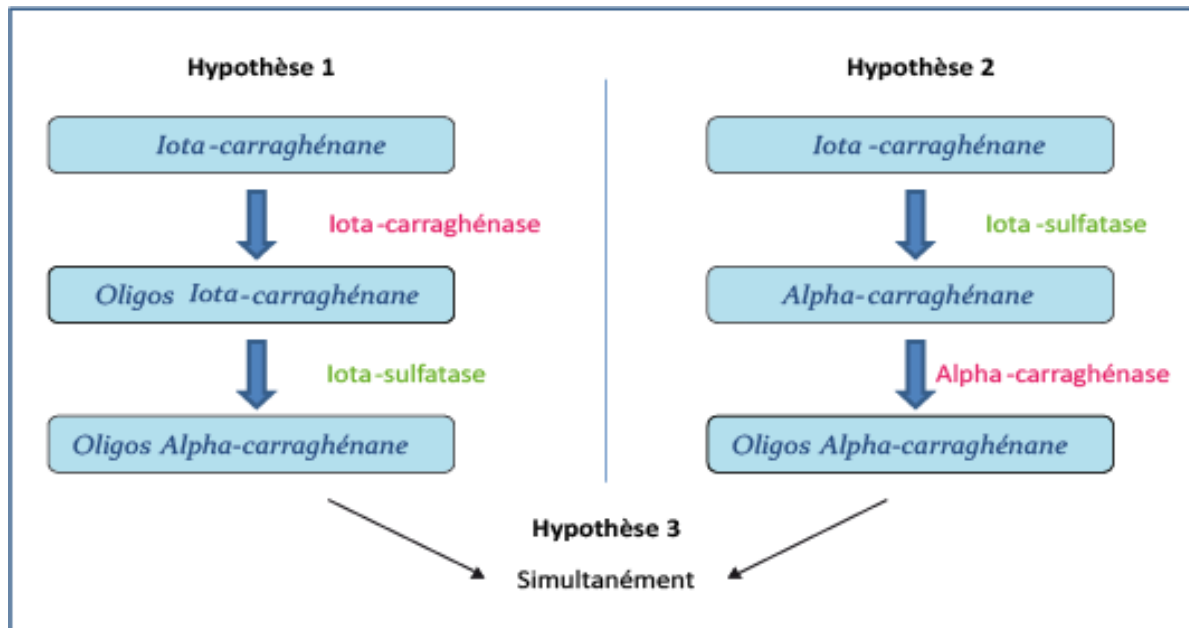


Figure 2-1 : Scénarios de dégradation du ι -carraghénane par le lysat de *P. atlantica*

CHAPITRE II :

IDENTIFICATION D'UNE 4S- ι -CARRAGHÉNANE-SULFATASE LA SULFATASE Q15XH3 DE *P. ATLANTICA*

INTRODUCTION

Le criblage d'activités carraghénane-sulfatases présenté au chapitre I a permis de mettre en évidence une ou plusieurs activité(s) de désulfatation à partir du polymère de ι -carraghénane par le lysat de *P. atlantica* induit au ι -carraghénane. La désulfatation observée étant nettement plus abondante que les autres, nous avons fait le choix de nous y intéresser en premier lieu. Les premiers spectres $^1\text{H-RMN}$ obtenus lors de la réalisation du criblage, puis par l'analyse de la désulfatation du ι -carraghénane par l'extrait brut, suggèrent qu'une sulfatase convertirait les unités ι -carrabiose en motifs α -carrabiose. La détection d'activité(s) carraghénolytique(s) amène cependant un doute quant à l'action de cette sulfatase sur des oligosaccharides ou sur du polymère (Figure 2-1). En effet, la mesure d'une activité de désulfatation sur le ι -carraghénane peut être induite aussi bien par une dégradation du polymère en oligo- ι -carraghénanes qui seraient ensuite désulfatés en oligo- α -carraghénanes (Hypothèse 1) que par une désulfatation directe du polymère (Hypothèse 2). La sulfatase mise en jeu dans ce processus aurait donc la même fonction que la carraghénane-sulfatase récemment isolée à partir de *P. carrageenovora* (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2009).

Un protocole de purification a été élaboré pour permettre de remonter à l'identification de la sulfatase. La surexpression de la protéine a permis de valider sa fonction et de lui attribuer son substrat. Nous avons caractérisé biochimiquement notre enzyme jusqu'à la détermination de son mode d'action. L'intérêt de cette sulfatase a pu être démontré par la production de nouvelles structures de carraghénanes.

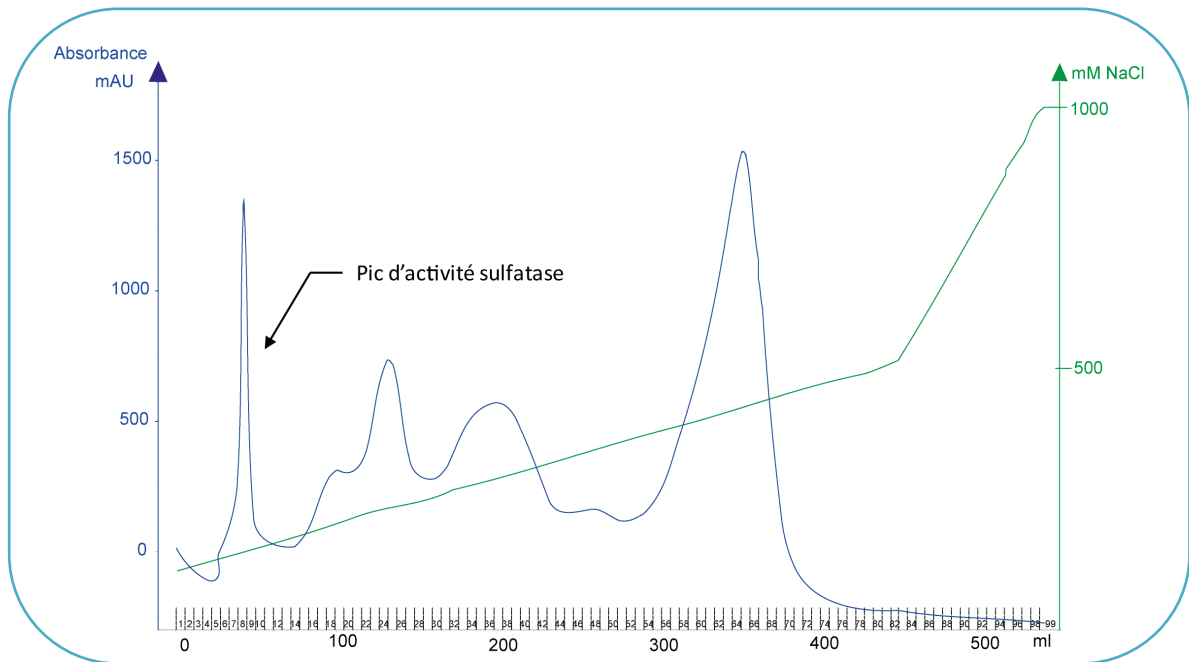


Figure 2-2 : Profil d'éluion des protéines du lysat de *P. atlantica* sur une DEAE-Sépharose

La courbe bleue représente l'absorbance mesurée à 280 nm.
La courbe verte représente la concentration en NaCl.

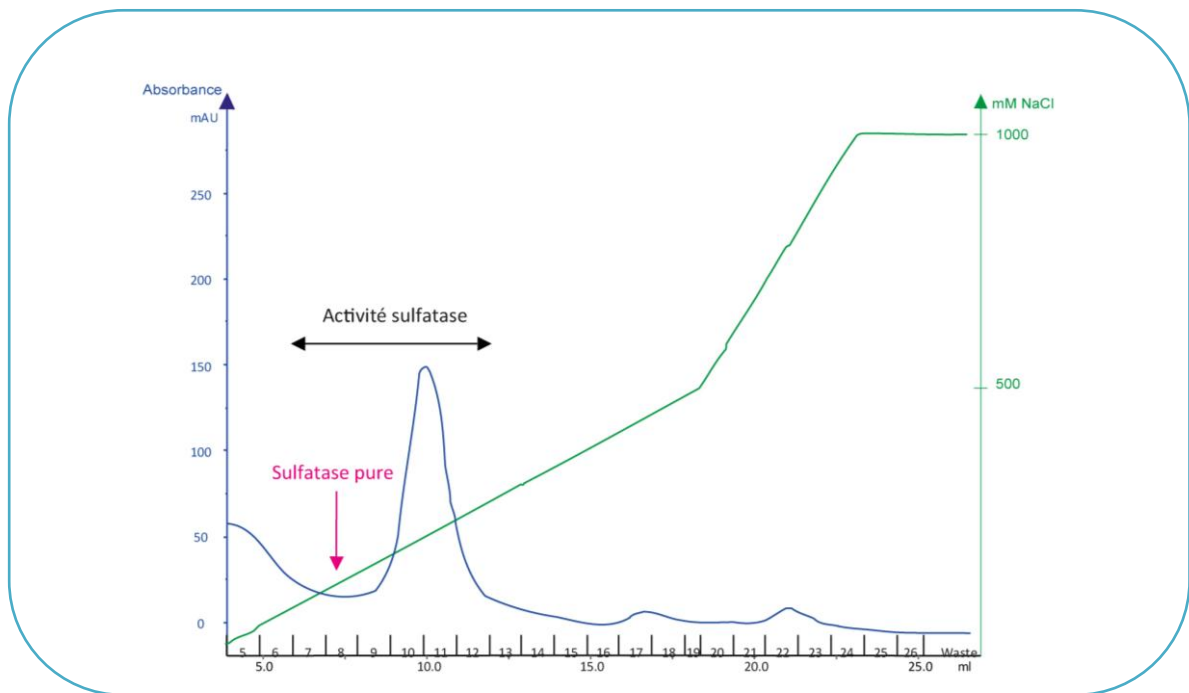


Figure 2-3 : Profil d'éluion des protéines du pool issu de la DEAE-Sépharose purifié sur une Q FF Sépharose

La courbe bleue représente l'absorbance mesurée à 280 nm.
La courbe verte représente la concentration en NaCl.

RESULTATS

A. Purification et identification d'une 4S- ι -carraghénane-sulfatase issue de *P. atlantica*

La production de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase par la bactérie *P. atlantica*, a été induite par la présence de ι -carraghénane dans le milieu de culture. Le protocole de purification mis en œuvre a été réalisé à partir de la fraction issue de la lyse cellulaire dans laquelle l'activité lors du criblage était la plus abondante. Une fois le culot bactérien lysé, l'extrait enzymatique a été dialysé contre le tampon sélectionné pour la purification. Le protocole mis en place repose sur deux étapes successives de chromatographie, basée sur les propriétés ioniques de l'enzyme. La première, une colonne échangeuse d'anions faible, DEAE Sépharose, éluée par un gradient croissant en NaCl, permet un premier fractionnement du lysat bactérien et d'éliminer un grand nombre de protéines de notre extrait. L'activité sulfatase mesurée contre le ι -carraghénane après cette étape dépasse les 1000 $\mu\text{g/ml}$ de sulfate libéré, dans le pic atteignant 1300 mAU d'absorbance élué vers 100 mM de NaCl (Figure 2-2). Les fractions de ce pic présentant une activité maximale sont rassemblées et dialysées pour en éliminer le NaCl. Ce nouvel extrait est alors soumis à une seconde étape de purification. Celle-ci consiste en un passage sur une colonne échangeuse d'anions forte, une Q Sépharose, éluée également par un gradient de NaCl (Figure 2-3). Cette élution permet d'obtenir la sulfatase pure (Figure 2-4) à 120 mM NaCl avec une activité de 800 $\mu\text{g/ml}$ de sulfate libéré après incubation avec le ι -carraghénane.

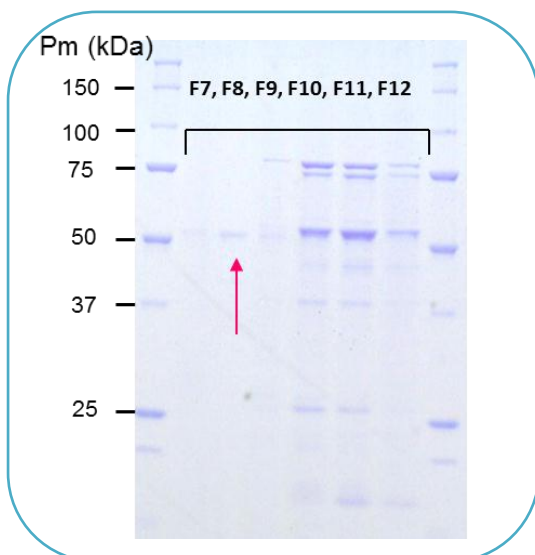


Figure 2-4 : Gel d'électrophorèse SDS de fractions collectées après la Q FF

La protéine pure est indiquée à l'aide de la flèche.

>Q15XH3

MTFNKKVSTLLWGTLIAISVGNASAADAGQSKADESNEKPNILFVLADDLGYNDVGFNGSTDIKTPNLDGLAKN
GMTFDAAYVAHPF**CGPSRAAIMTGR**YPHKIGAQFNLPEDNSNVGVSADLFIAQTMKSA**GYFTGAMGKWHL**
GEASEYHPNKHGFDEFYGFLGGGHNYFPEQFEAAYNKRVAQGMTNINMYLTPLEHNGKEVR**ETHEYTDGLSR**
EAVNFVDKAAAKKPPFLYLAYNAPHVPLQAKEEDMAMFSQIKDKKRRTYAGMVYAVDRGVGRIVEQLKK**NG**
QFDNTVIVFTSDNGGKLGQGANNYPLKEGKGSVQEGGFRTPMLVHWPKHMKAGSRFVSHVPLALDLYPTFAG
LGGAVLPEDKKLDGKDIWADIQANTAPHKDEFIYVLRHRNGYSDAARRNQFKAVKNHNDWKLNYIAQDISE
DNDISAQHPDILRDMVSSMESWSWNNQQPKWFHQSAEGAQWRLKAMPR**FDQTFQVGDNTR**SNSKKGH

Figure 2-5 : Séquence en acides aminés de la protéine Q15XH3 de *P. atlantica* T6c

En rose, les trois séquences peptidiques déterminées par spectrométrie de masse. **En bleu**, la signature de la modification post-traductionnelle de la cystéine et **en vert** les acides aminés du site catalytique dont la lysine (K) et l'histidine (H) qui sont les acides aminés catalytiques.

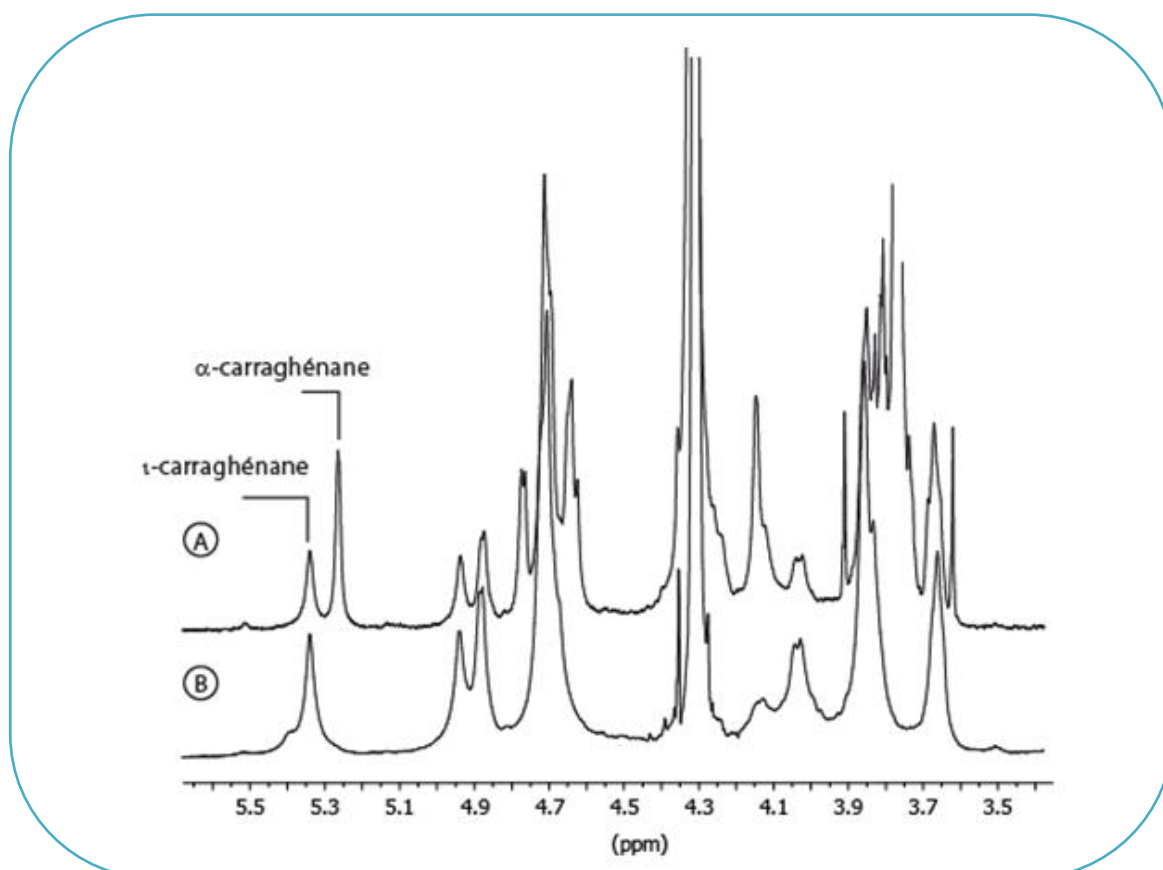


Figure 2-6 : Spectres ^1H -RMN du t-carraghénane (B) incubé avec la protéine Q15XH3 purifiée (A)

L'identification de la protéine responsable de l'activité sulfatase a été réalisée par la plateforme BIBS de l'INRA de Nantes. L'analyse en spectrométrie de masse de la bande purifiée a permis l'obtention de trois peptides : NGQFDNTVIVFTSDNGGK (SEQ_ID n°1), FDQTFQVGDNTR (SEQ_ID n°2), ETEYITDGLSR (SEQ_ID n°3). Ces derniers, confrontés à la banque TrEMBL, ont mis en évidence une correspondance avec la protéine Q15XH3 de *P. atlantica* T6c, dont le gène (Patl_0889) a été annoté comme une sulfatase (Protein_ID ABG39415.1 ; Copeland *et al.*, 2006). Le poids moléculaire de la bande obtenue sur le gel d'électrophorèse a été estimé à 55kDa (Figure 2-4), en accord avec la protéine séquencée. La sulfatase Q15XH3 présente la séquence consensus de 11 acides aminés (C/S-X-P-S/X-R-XXX-L/X-G/X-R/X) requise pour la conversion de la cystéine en résidu C α -Formylglycine, et les acides aminés présents dans la séquence conservée G-Y/V-X-S/T-XXX-G-K-X-X-H (Figure 2-5).

B. Etude enzymologique de la sulfatase Q15XH3 native

La désulfatation du polymère de *t*-carraghénane par la protéine Q15XH3 purifiée conduit à sa conversion en α -carraghénane (Figure 2-6). En effet, on observe sur le spectre RMN ^1H réalisé après incubation (Figure 2-6A), le signal du proton anomérique du *t*-carraghénane à 5,35 ppm, ainsi que l'apparition d'un nouveau signal à 5,27 ppm, caractéristique de l' α -carraghénane (van de Velde *et al.*, 2004). Ce déplacement chimique du proton anomérique correspond à la perte du groupement sulfate en position 4 de l'unité G qui provoque un léger blindage du noyau. On ne constate aucun dédoublement des signaux caractéristique des oligosaccharides, confirmant la désulfatation d'un substrat polymérique.

La caractérisation biochimique de la sulfatase a consisté à déterminer les conditions optimales à son activité. Dans un premier temps, une cinétique de désulfatation du *t*-carraghénane, par la sulfatase purifiée Q15XH3, a été suivie par dosage chromatographique du sulfate libéré dans le milieu d'incubation. Celle-ci a permis de déterminer le temps adéquat pour la mesure de l'activité en vitesse initiale (Figure 2-7). Une durée d'incubation de 8h a été

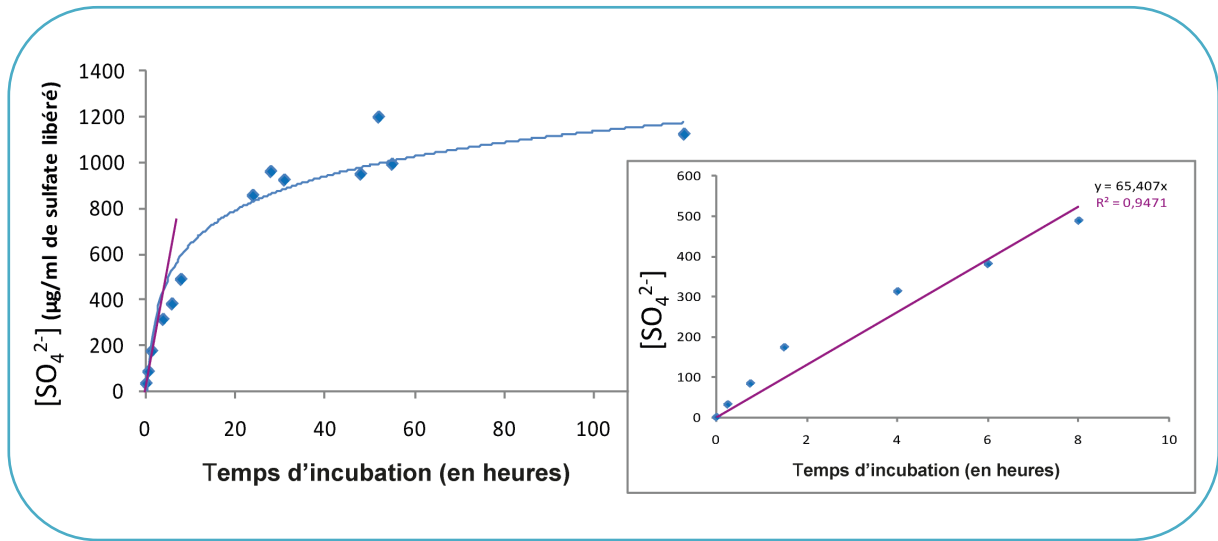


Figure 2-7 : Cinétique de désulfatation du ι -carraghénane (1%) par la 4S- ι -carraghénane-sulfatase purifiée

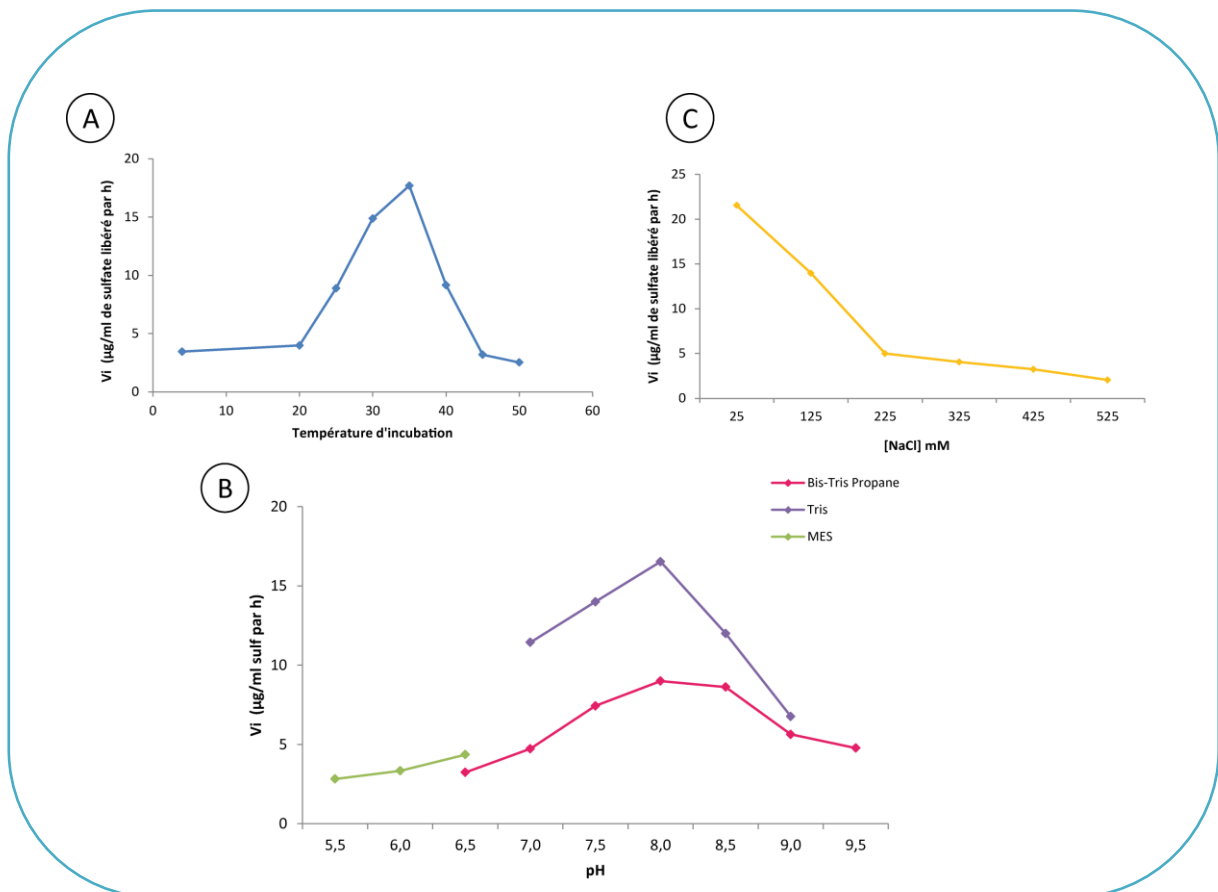


Figure 2-8 : Test de l'activité 4S- ι -carraghénane-sulfatase en fonction de la température d'incubation (A), du tampon et du pH (B) et de la concentration en NaCl (C)

retenue, car pour cette durée, l'activité de désulfatation est importante mais se situe toujours dans la partie linéaire de la courbe.

Un premier test d'incubations de ι -carraghénane en présence de la sulfatase Q15XH3, réalisé à différentes températures, a permis de révéler la température optimale de l'enzyme. Celle-ci se situe autour de 35°C (Figure 2-8A). Le pH optimal a été déterminé en incubant l'enzyme sur une gamme de pH de 5,5 à 9,5. Les résultats ont permis de situer le pH optimal d'activité de la sulfatase Q15XH3 entre 7,5 et 8,0 dans du tampon Tris-HCl (Figure 2-8B). L'effet de la concentration en NaCl sur l'activité sulfatase a été réalisé en ajoutant aux milieux d'incubation une gamme croissante en NaCl. Une concentration de 25 mM en NaCl, soit la concentration initiale en NaCl de l'enzyme purifiée diluée dans le milieu d'incubation, favorise l'activité de la sulfatase Q15XH3 (Figure 2-8C). Il n'est donc pas nécessaire d'ajouter du NaCl pour la réaction de désulfatation.

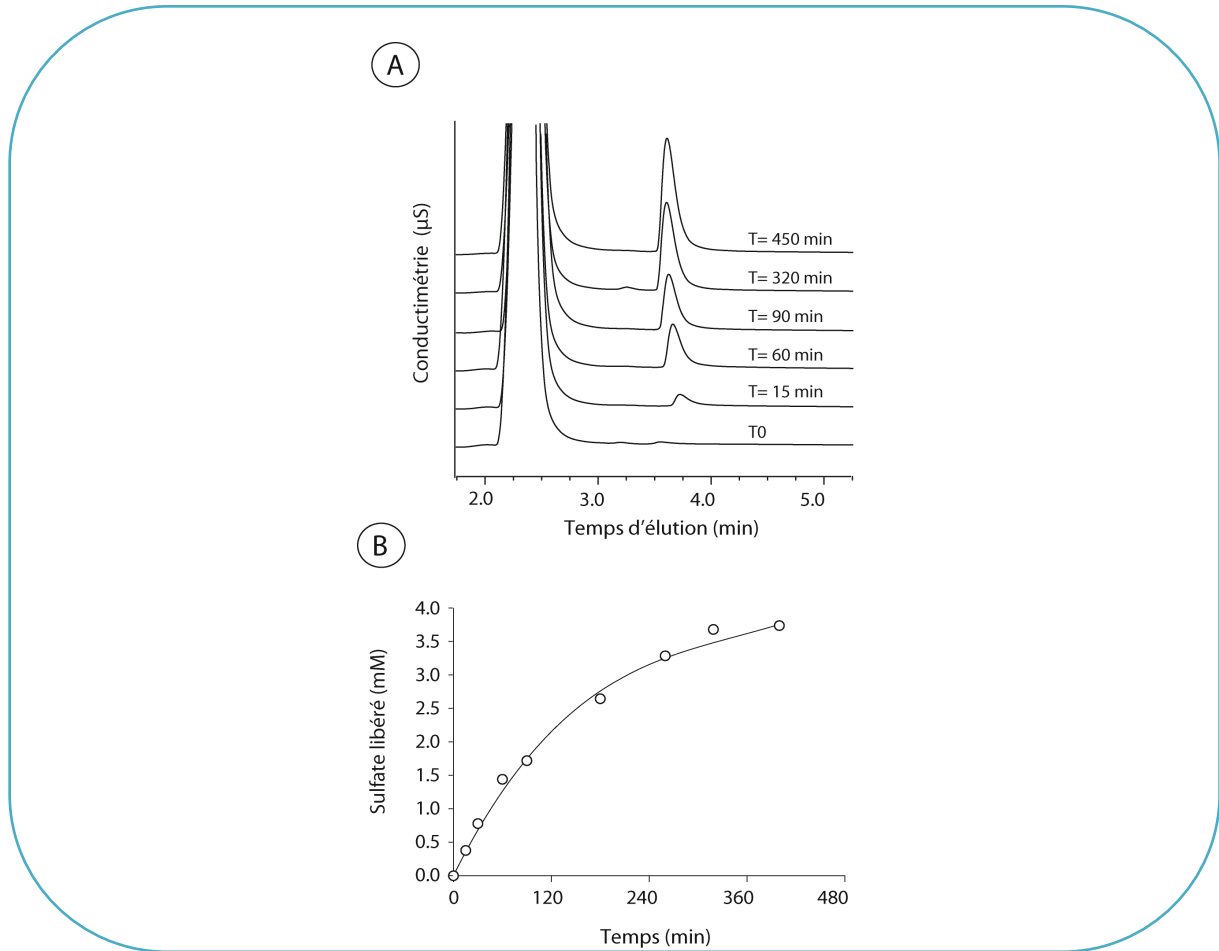


Figure 2-9 : Cinétiques de désulfatation

(A) Profils HPLC du sulfate libéré dans le milieu au cours de l'incubation du ι -carraghénane avec la 4S- ι -carraghénane-sulfatase purifiée.

(B) Conversion de l'intensité des pics mesurée en HPLC en concentration molaire et tracé en fonction du temps de cinétique.

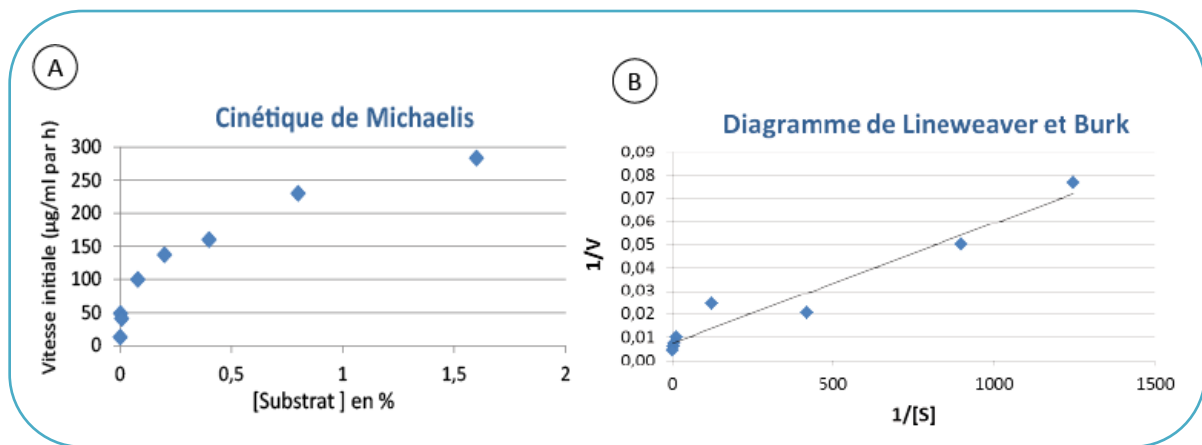


Figure 2-10 : Cinétique de Michaelis (A) et diagramme de Lineweaver et Burk (B) pour la détermination des paramètres K_m et V_m

Une estimation des paramètres de Michaelis-Menten (Michaelis & Menten, 1913) a été effectuée en réalisant des cinétiques de désulfatation avec des concentrations en ι -carraghénane de 0.0008, 0.0024, 0.008, 0.08, 0.2, 0.4, 0.8, et 1.6% (p/v) (Figure 2-9). Les incubations ont été conduites à 34°C en présence de sulfatase native purifiée et la vitesse initiale mesurée dans la partie linéaire de la cinétique, permettant ainsi le tracé de la cinétique de Michaelis en fonction de la concentration du substrat (Figure 2-10A). A partir de celle-ci, le diagramme de Lineweaver et Burk (Lineweaver & Burk, 1934) a pu être effectué (Figure 2-10B) et les paramètres Michaeliens déterminés. Les calculs ont été faits en utilisant la concentration en unités ι -carrabioses au lieu de la concentration en carraghénane (1% p/v de ι -carraghénane correspond à 22 mM en motifs ι -carrabioses). La constante de Michaelis, symbolisée par **K_m**, a été estimée à **3,2 μ M**. La vitesse initiale maximale, **V_m**, a été estimée à **1,95 μ M s⁻¹**. Néanmoins, ces données sont à prendre avec précaution car les propriétés physico-chimiques du polymère sont modifiées au cours du processus de désulfatation.

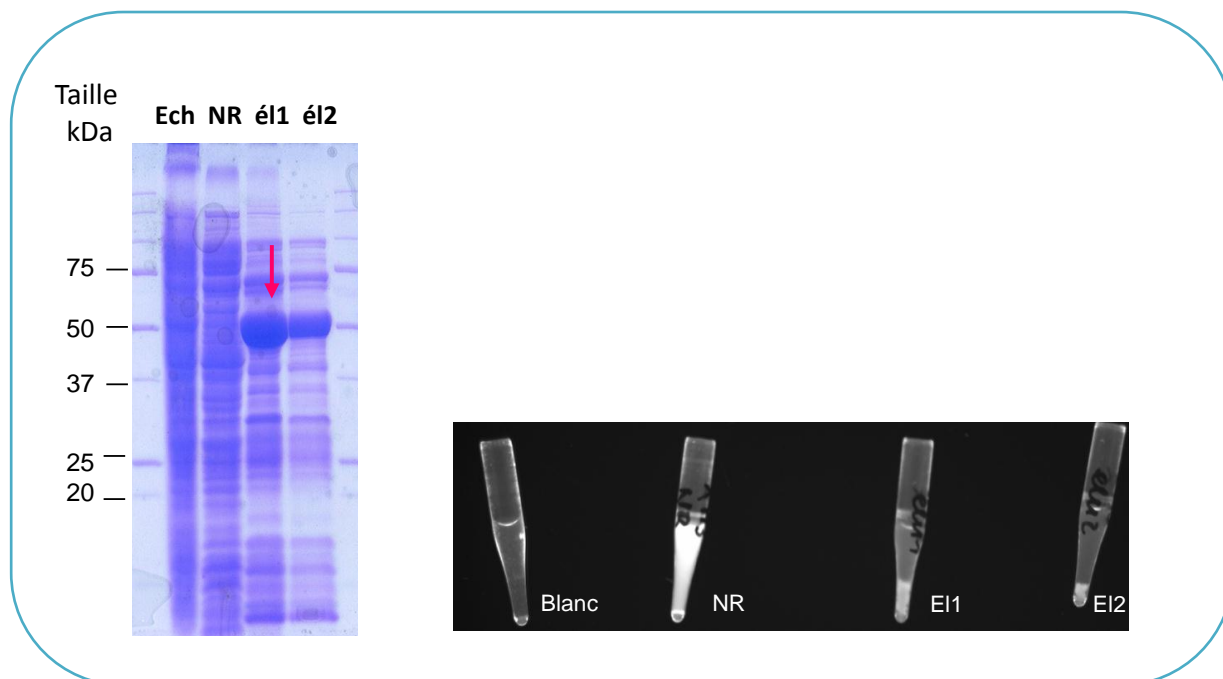


Figure 2-11 : Gel d'électrophorèse de la purification de la sulfatase Q15XH3 (A) et test d'activité sulfatase à la MUF-S sur les fractions correspondantes (B)

Ech : échantillon brut ; NR : non retenu ; él1 : fraction d'éluion n°1 ; él2 : fraction d'éluion n°2.

| Sulfatase | Polymères de carraghénanes | | | | | |
|-----------|----------------------------|----|---|---|-----|-----|
| | κ | ι | λ | α | κ/μ | ι/ν |
| Q15XH3 | 0 | 18 | 0 | 0 | 5 | 0 |

Tableau 2-1 : Mesure du sulfate libéré (en µg/ml) par HPAEC après incubation de la sulfatase Q15XH3 surexprimée en présence des différents carraghénanes

C. Surexpression de la sulfatase Q15XH3 de *P. atlantica*

La surexpression de la protéine identifiée par la purification, est indispensable pour confirmer sa fonction de désulfatation, et son action sur le ι -carraghénane. De plus, dans des perspectives d'utilisations biotechnologiques de l'enzyme, la surexpression de celle-ci est nécessaire pour son obtention en abondance.

C.1 Expression de la sulfatase Q15XH3 dans *E. coli*

La surexpression de la sulfatase Q15XH3 a été entreprise afin de confirmer son implication directe dans la désulfatation du ι -carraghénane en α -carraghénane. Le gène a été cloné dans le plasmide pFO4 et exprimé dans *E. coli* BL21 (DE3) selon les conditions décrites par Groisillier *et al.* (2010). Des cultures de petit volume réalisées en milieu Graffinity dans un premier temps, ont permis de faire des premiers tests. La purification sur colonne His-spin Trap a montré une bande abondante autour de 55 kDa dans l'élution (Figure 2-11A), en accord avec le poids moléculaire de la sulfatase Q15XH3. Le test effectué en présence du substrat synthétique MUF-S (méthylumbelliféryl-sulfate) sur le lysat bactérien, s'est révélé positif en montrant une fluorescence après incubation, mais essentiellement dans la fraction non retenue sur la colonne (Figure 2-11B). Cette expérience a permis de mettre en évidence une activité de désulfatation dans le lysat bactérien d'*E. coli* contenant notre sulfatase. Cependant, ce substrat synthétique n'est pas spécifique de la position du groupement sulfate éliminé et la désulfatation du carraghénane ne peut donc pas être confirmée par ce test. Par conséquent, l'activité de la sulfatase surexprimée a ensuite été testée contre six structures de carraghénanes : κ -, ι -, λ -, α -, κ -/ μ - et ι -/ ν -carraghénanes. Une activité de désulfatation significative, de 18 μ g/ml de sulfate libéré, a pu être mesurée par chromatographie, seulement sur le ι -carraghénane (Tableau 2-1). Ce premier test a donc permis de valider le gène de la protéine Q15XH3 de *P. atlantica* comme codant pour une 4S- ι -carraghénane-sulfatase.

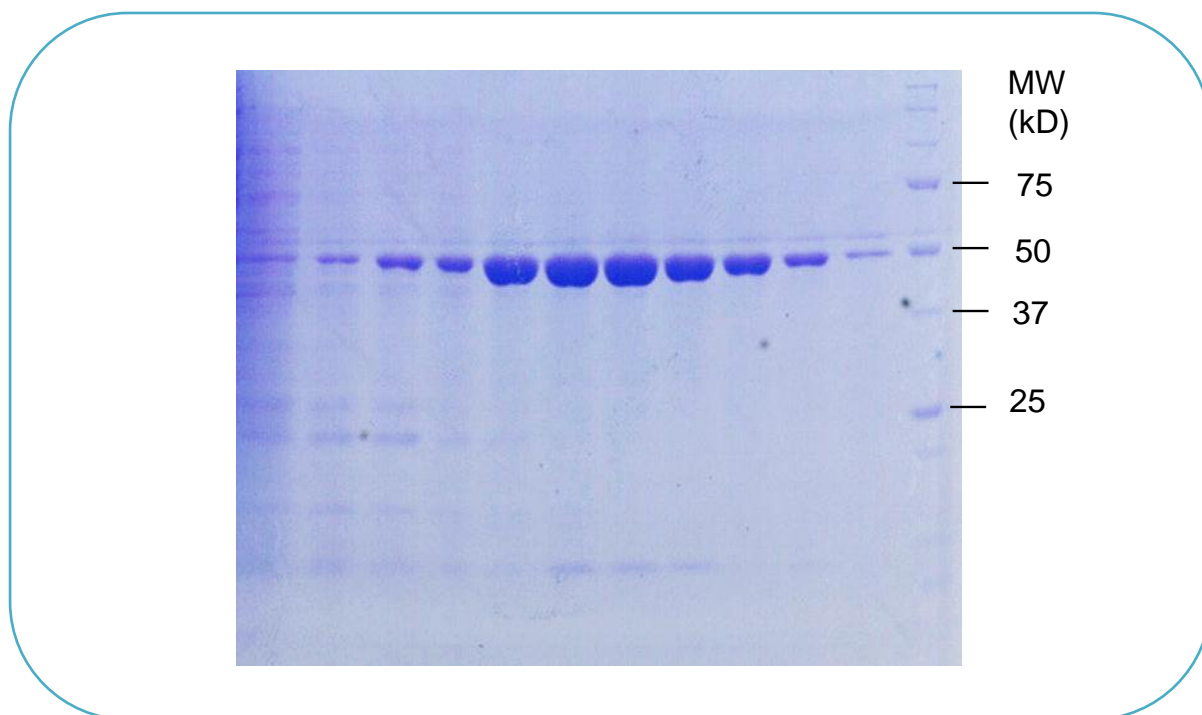


Figure 2-12 : Gels SDS de la sulfatase Q15XH3 après purification sur une colonne de nickel HisPrep FF 16/10

La sulfatase Q15XH3 a alors été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel HisPrep FF 16/10 (*GE Healthcare*). L'élution des protéines fut réalisée par un gradient croissant d'imidazole. Le gel d'électrophorèse obtenu fut très satisfaisant montrant la sulfatase isolée en quantité (Figure 2-12). En revanche, les tests d'activité sulfatase sur ces fractions se sont tous révélés négatifs sur le ι -carraghénane. L'hypothèse d'une interférence avec l'imidazole fut émise, toutefois après une étape de dialyse contre le tampon de lyse pour l'éliminer, l'activité ne fut pas restaurée.

C.2 Co-expression de la sulfatase Q15XH3 en présence d'enzymes de maturation

Malgré l'expression soluble en grande quantité, l'activité sulfatase de l'enzyme exprimée de façon hétérologue s'est montrée nettement moins forte que pour la protéine native. En effet, bien que *E. coli* puisse catalyser la modification post-traductionnelle de la cystéine du site actif en résidu C α -formylglycine, les taux de modification sont généralement très limités. Dans notre cas, en raison des faibles quantités de sulfate libéré, la conversion du carraghénane n'a pas pu être visualisée par les analyses RMN. Une stratégie de co-expression des sulfatases en présence d'enzymes de maturation, récemment développée par [Berteau et al.](#), fut donc entreprise afin de tenter d'augmenter les activités de désulfatation. Les deux enzymes de maturation connues dans la littérature furent testées : la **FGE** (**F**ormylglycine-**G**enerating **E**nzyme) ([Dierks et al., 2003](#)), spécifique des sulfatases « Cys-type » et dépendante de l'oxygène pour effectuer la maturation, et l'**AnSME** (**A**naerobic **S**ulfatase **M**aturing **E**nzyme) ([Berteau et al., 2006](#)), capable d'hydrolyser l'oxydation des résidus sérines comme cystéines. Parallèlement, les conditions de culture et d'induction ont été optimisées pour la production d'enzyme active.

La co-expression a consisté à exprimer le plasmide pFO4 contenant la sulfatase et le plasmide pRSFDuet-1 contenant l'enzyme de maturation (FGE ou AnSME) dans la même souche d'*E. coli* BL21 (DE3). Les enzymes de maturation dans leur plasmide nous ont été gracieusement fournies par le [Dr O. Berteau](#) et son équipe, et la co-expression a été effectuée en suivant le protocole qu'ils ont mis en place. Après la réalisation de premières cultures en

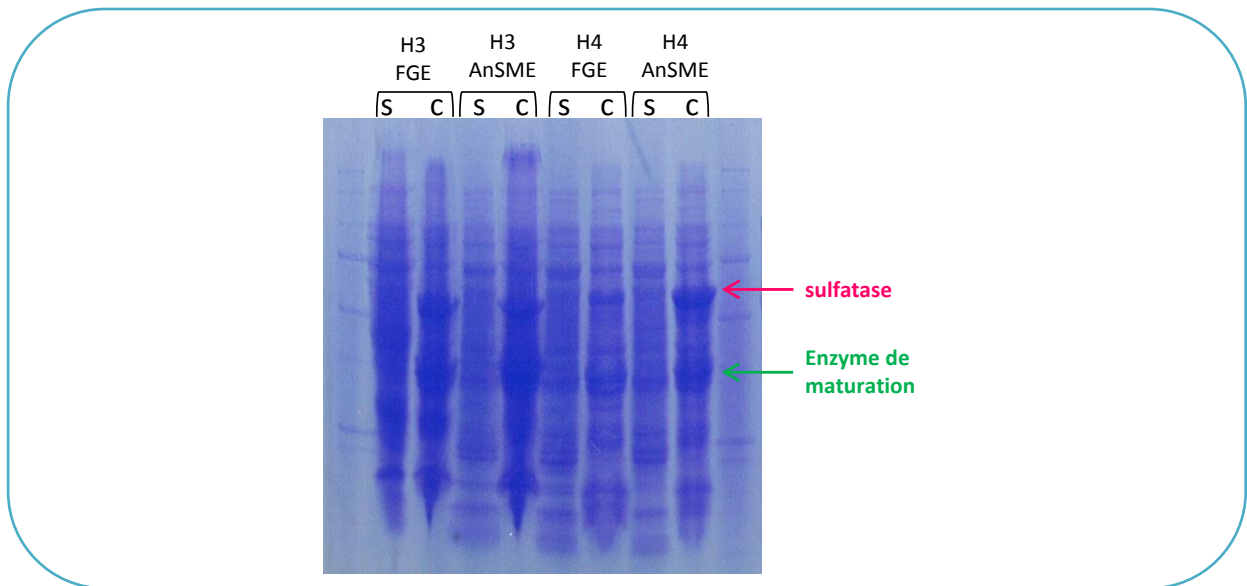


Figure 2-13 : Gel SDS-PAGE des fractions solubles (S) et insolubles (C) des sulfatases Q15XH3 et Q15XH4 co-exprimées avec les enzymes de maturation FGE et AnSME

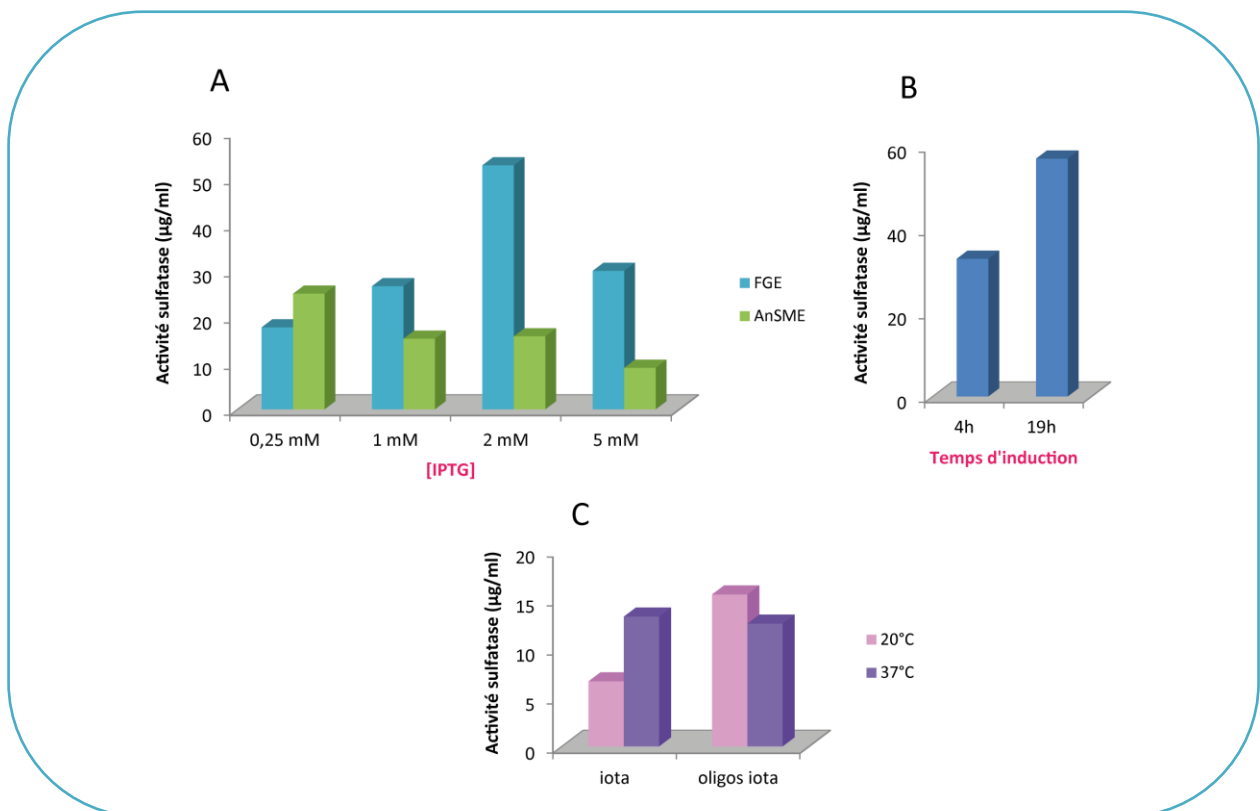


Figure 2-14 : Optimisation de l'activité de la sulfatase Q15XH3 en fonction de l'enzyme de maturation et de la concentration en IPTG (A), en fonction du temps d'induction (B), et en fonction du substrat et de la température d'induction (C)

milieu LB, le dépôt du culot et du surnageant de culture sur gel d'électrophorèse a mis en évidence que nos protéines surexprimées n'étaient que partiellement solubles. Certes, la co-expression était effectuée mais les enzymes d'intérêt étaient majoritaires dans les fractions insolubles, c'est-à-dire dans les culots obtenus après la lyse des cellules (Figure 2-13). Les activités de chacun des extraits déposés sur le gel furent testées contre différents carraghénanes, mais toutes se sont révélées négatives ou négligeables. Nous avons alors cherché les conditions optimales à la solubilité de notre sulfatase. L'ajout de NaCl dans le tampon de lyse, à une concentration de 200 mM, a finalement permis d'améliorer la solubilité de notre protéine et par conséquent les activités détectées.

Les variations des conditions d'induction de la culture furent les paramètres les plus déterminants. Des cultures de la sulfatase Q15XH3 dans *E. coli* en présence de la FGE ou de l'AnSME ont été effectuées en utilisant différentes concentrations d'IPTG. Une condition a permis d'augmenter significativement l'activité de désulfatation du ι -carraghénane. Il s'agit de la culture de la sulfatase co-exprimée avec la FGE et induite par 2 mM d'IPTG (Figure 2-14A). Malgré l'augmentation non-négligeable de l'activité (55 μ g/ml de sulfate libéré), il faut cependant souligner qu'elle demeure extrêmement faible au regard de l'activité moyenne de la sulfatase native (~1000 μ g/ml de sulfate libéré). La durée de l'induction a également son importance et la prolonger sur la nuit permet d'accroître la quantité de sulfatase active (Figure 2-14B). Enfin, dans le cas de la sulfatase Q15XH3, la température d'induction n'a pas montré une grande incidence. Quelque soit la température à laquelle est incubée la culture après l'ajout d'IPTG, les activités détectées sont du même ordre de grandeur, sur le polymère comme sur les oligosaccharides (Figure 2-14C). Néanmoins, ce test a permis de mettre en évidence la capacité de notre sulfatase à agir sur les oligosaccharides. Malgré toutes les expériences réalisées, il ne fut pas possible d'obtenir une conversion suffisante du ι -carraghénane détectable en RMN.

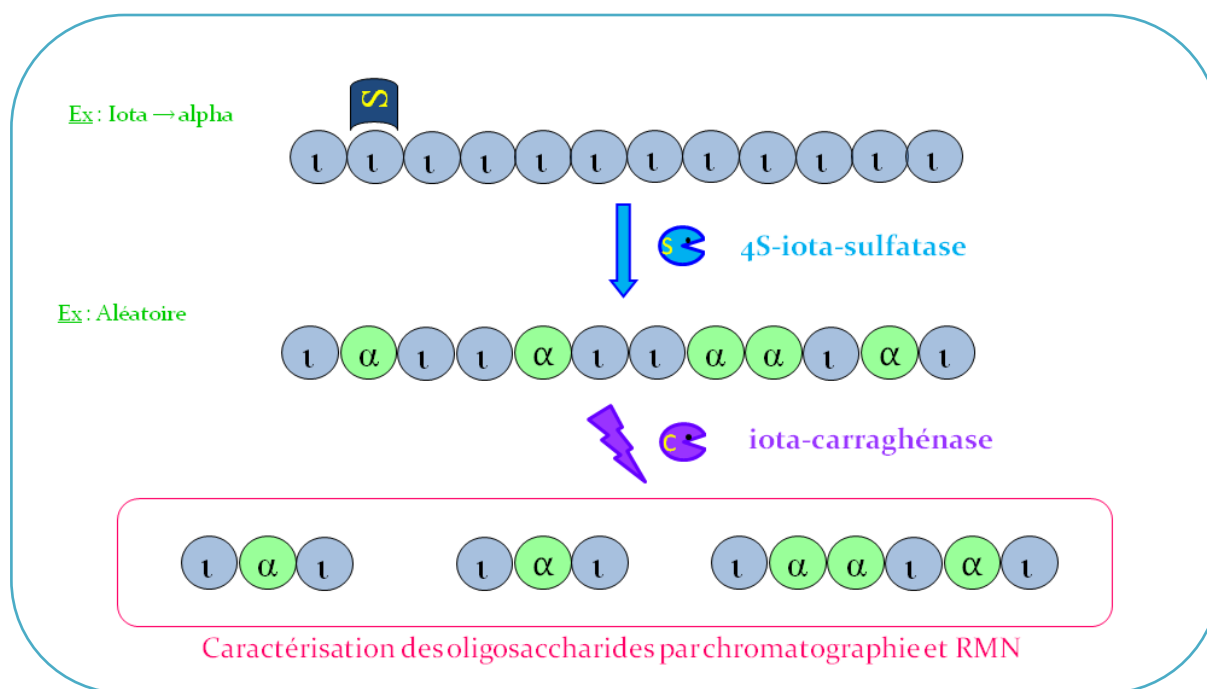


Figure 2-15 : Principe de détermination du mode d'action de la 4*S*-*t*-carraghénane-sulfatase

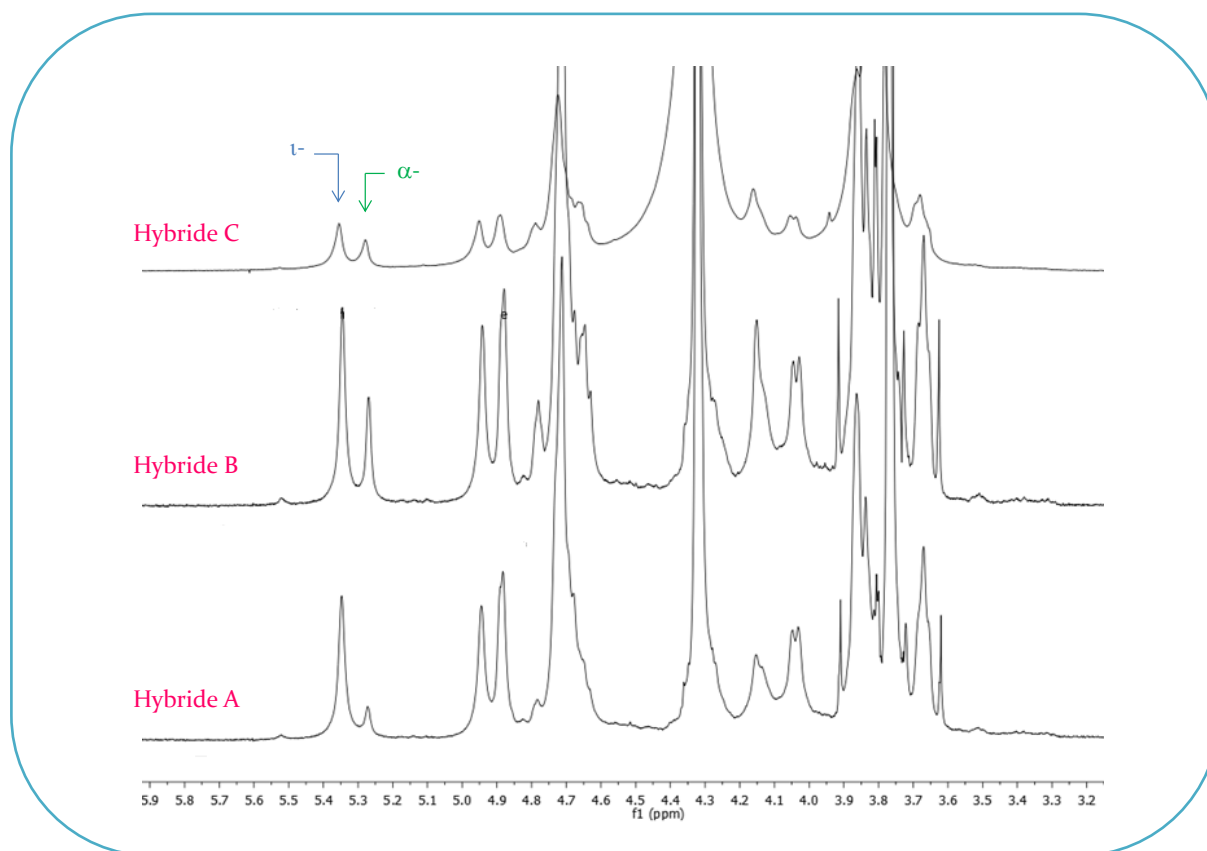


Figure 2-16 : Spectres ^1H -RMN des hybrides *t*-/ α -carraghénane produits par la 4*S*-*t*-carraghénane-sulfatase

D. Détermination du mode d'action de la sulfatase Q15XH3

Le mode d'action de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase, purifiée sous sa forme native à partir de *P. atlantica*, a été étudié pour savoir si elle agissait selon un mode endo avec une désulfatation aléatoire des motifs ι -carrabiose, ou avec un mode d'action processif entraînant une désulfatation progressive des motifs le long de la chaîne polymérique. La stratégie entreprise est schématisée à la figure 2-15. Dans un premier temps, un polymère de ι -carraghénane pur a été partiellement désulfaté pour obtenir des hybrides ι -/ α -carraghénanes avec différents ratios en motifs ι - et α -carrabioses. Ces hybrides ont ensuite été dégradés par la ι -carraghénase d'*A. fortis* afin de les fragmenter. Celui produisant la plus grande quantité d'oligosaccharides hybrides a été sélectionné pour entreprendre leur purification. Ces oligosaccharides obtenus lors de la coupure enzymatique ont ensuite été analysés par chromatographie et par RMN, et leur identification a permis de déterminer la distribution des motifs du polymère désulfaté, et d'en déduire le mode d'action de la sulfatase.

D.1 Production des hybrides ι -/ α -carraghénane

Trois hybrides ι -/ α -carraghénanes ont été produits à l'échelle du gramme. L'analyse RMN ^1H de ces produits a permis de connaître le taux de conversion du ι - en α -carraghénane et d'en déduire la teneur en chacun des motifs disaccharidiques (Figure 2-16). L'intégration des signaux des protons anomériques du ι -carraghénane (5,35 ppm) et de l' α -carraghénane (5,27 ppm) nous permet de connaître la proportion relative des motifs α -carrabiose par rapport aux motifs ι -carrabiose. Ainsi, l'hybride A est un hybride ι -/ α -carraghénane de composition 85/15 (mol/mol), l'hybride B présente une teneur de 68/32 (mol/mol), et enfin l'hybride C a une structure de 63/37 (mol/mol) (Figure 2-16). Bien que le suivi de la libération du sulfate par la réaction permette d'estimer la conversion du polymère, seule la RMN nous permet de caractériser avec précision les produits formés.

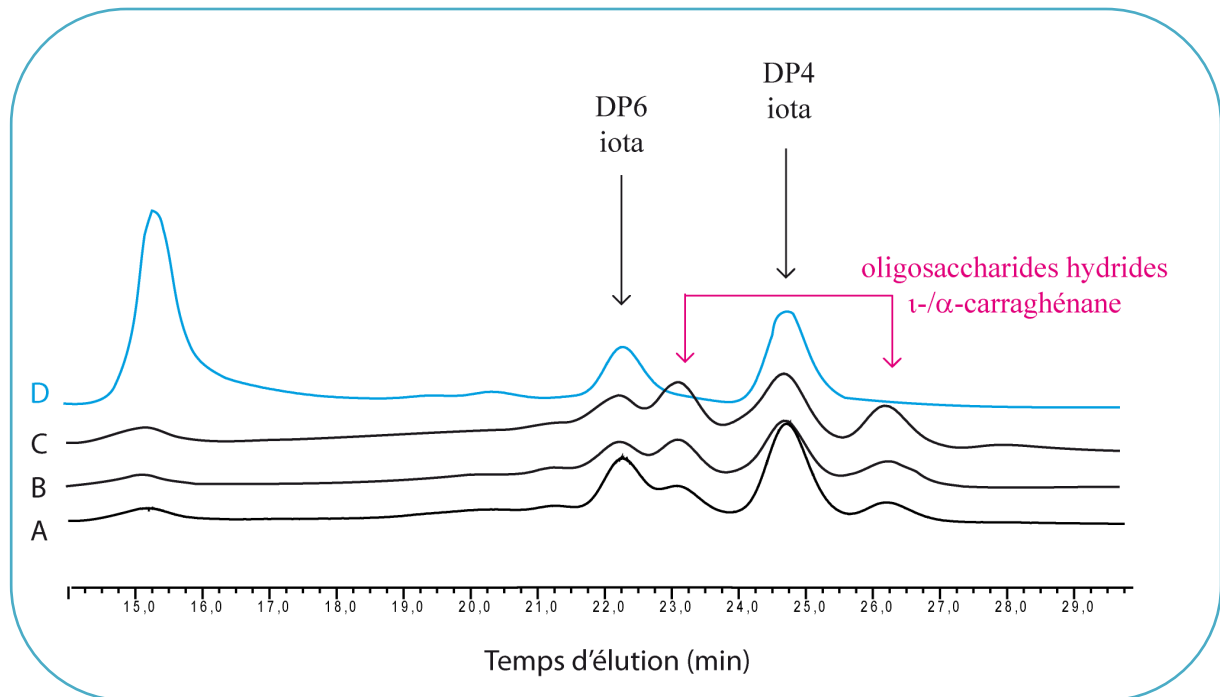


Figure 2-17 : Profils HPSEC des produits de dégradation des hybrides A, B et C et de l'hybride synthétique par la ι -carraghénase d'*A. fortis*

D.2 Dépolymérisation des hybrides ι -/ α -carraghénanes

La dégradation des hybrides a été réalisée avec la ι -carraghénase d'*Alteromonas fortis*. Les produits limites de cette glycoside-hydrolase sont le néo- ι -carratétraose (DP4) et le néo- ι -carrahexaose (DP6) (Greer & Yaphe, 1984). Les chromatogrammes obtenus après la dégradation des hybrides A, B et C sont présentés à la figure 2-17. Sur ce même chromatogramme, est présenté à titre de comparaison, le profil de dégradation obtenu pour un mélange de 50% de ι -carraghénane pur avec 50% d' α -carraghénane pur, mimant ainsi un polymère de ι -/ α -carraghénane avec une distribution en bloc des motifs disaccharidiques. On observe pour ce mélange d'homopolymères, une fraction résistante importante autour de 15 min d'élution correspondant à l' α -carraghénane pur, qui n'est pas dégradé par la ι -carraghénase. On obtient également deux oligosaccharides différents, les oligo- ι -carraghénanes standards produits par la ι -carraghénase d'*A. fortis*, attribués à du néo- ι -carrahexaose (DP6) et du néo- ι -carratétraose (DP4). Les chromatogrammes obtenus par la dégradation des hybrides se distinguent nettement de celui présenté pour le mélange d'homopolymères de ι - et α -carraghénane. En effet, on constate de très faibles fractions résistantes, indiquant que les polymères ont été presque entièrement dégradés. Les oligosaccharides observés sont les oligo- ι -carraghénanes standards de DP6 et DP4, à 22,2 et 24,7 min d'élution respectivement, auxquels s'ajoutent deux nouveaux pics, à 23,1 et 26,2 min d'élution, pouvant être attribués à des oligo-hybrides de ι -/ α -carraghénane. On note aussi une variation de l'aire des pics de ces oligosaccharides en fonction du ratio de motifs ι - et α -carrabioses dans le polymère. En effet, plus il y a de motifs α -carrabioses, plus ces signaux sont importants au détriment des oligo- ι -carraghénanes standards. L'hybride C fut donc choisi pour entreprendre la purification des oligosaccharides hybrides ι -/ α -carrabioses.

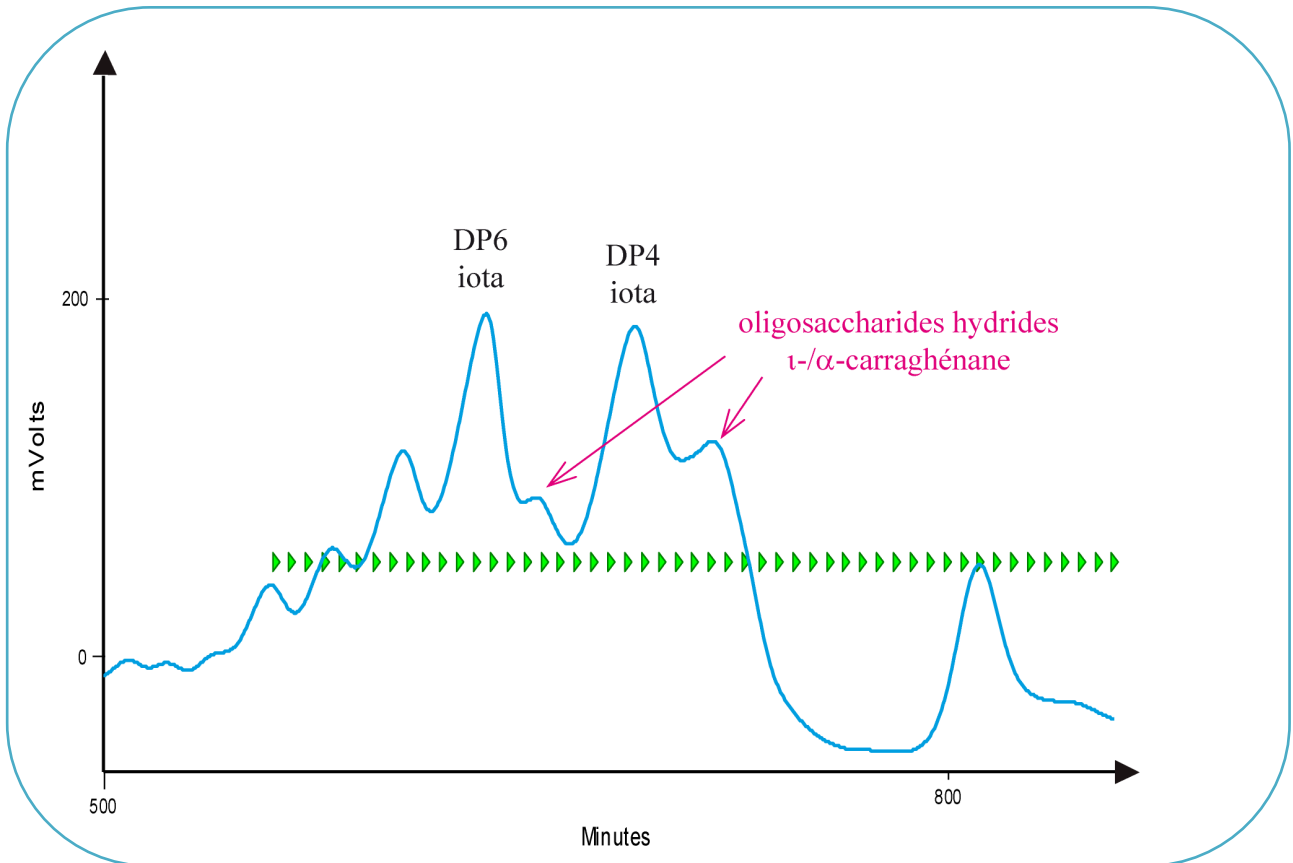


Figure 2-18 : Purification sur chromatographie d'exclusion stérique des oligosaccharides issus de la dégradation des hybrides ι -/ α -carraghénane avec *A. fortis*

Les flèches vertes correspondent au fractionnement réalisé : une flèche = une fraction.

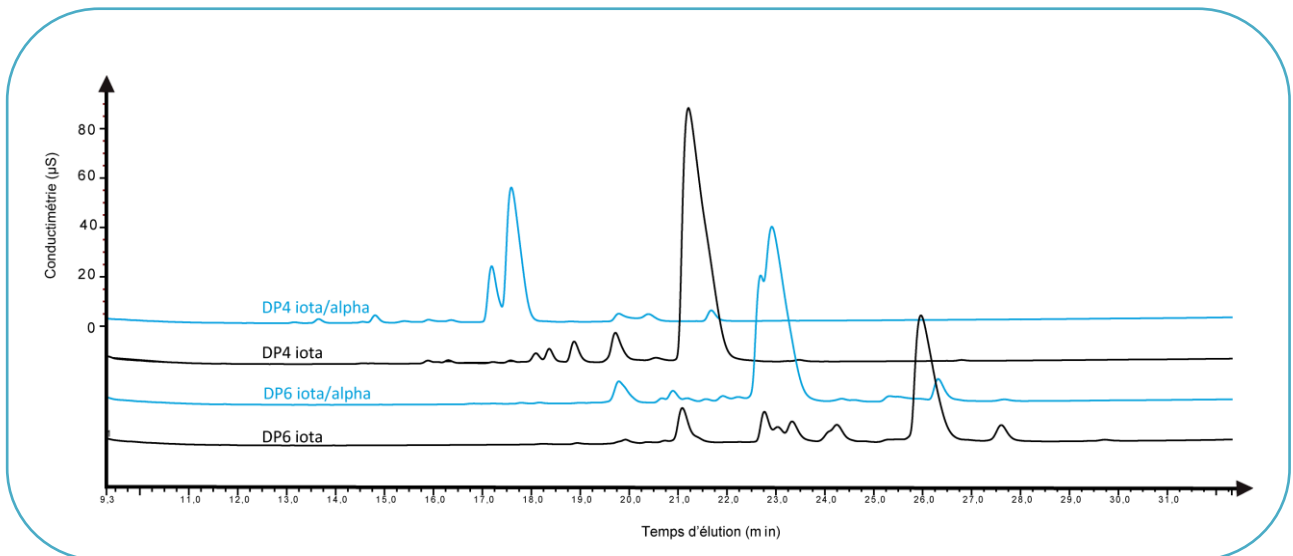


Figure 2-19 : Chromatogramme HPAEC des oligosaccharides produits à partir de l'hybrides ι -/ α -carraghénane dégradé par la ι -carraghénase d'*A. fortis*

D.3 Purification des oligosaccharides hybrides ι -/ α -carraghénane

Une production d'oligosaccharides hybrides à plus grande échelle a été entreprise en incubant 1g d'hybride C en présence de la ι -carraghénase d'*A. fortis*. Les produits de dégradation obtenus ont été purifiés par chromatographie sur une série de trois colonnes de gel filtration. Cette purification a pour but de séparer les oligosaccharides selon leur volume hydrodynamique, et prend donc en compte le degré de polymérisation et les motifs de sulfatation. Le profil obtenu ne montre pas une séparation nette des oligosaccharides. En effet, les pics se superposent et il n'y a pas de retour du signal au niveau de la ligne de base entre chaque pic. Par conséquent, on obtient plutôt un massif d'oligosaccharides (Figure 2-18). Cependant, il faut souligner que dans le cas présent, les oligosaccharides peuvent différer seulement d'un sulfate, ce qui peut expliquer une séparation plus difficile. Néanmoins, les fractions obtenues à l'issue de cette purification ont toutes été analysées par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC) afin d'en sélectionner les plus pures (Figure 2-19). Ces dernières ont été analysées par RMN pour déterminer la structure précise des oligosaccharides.

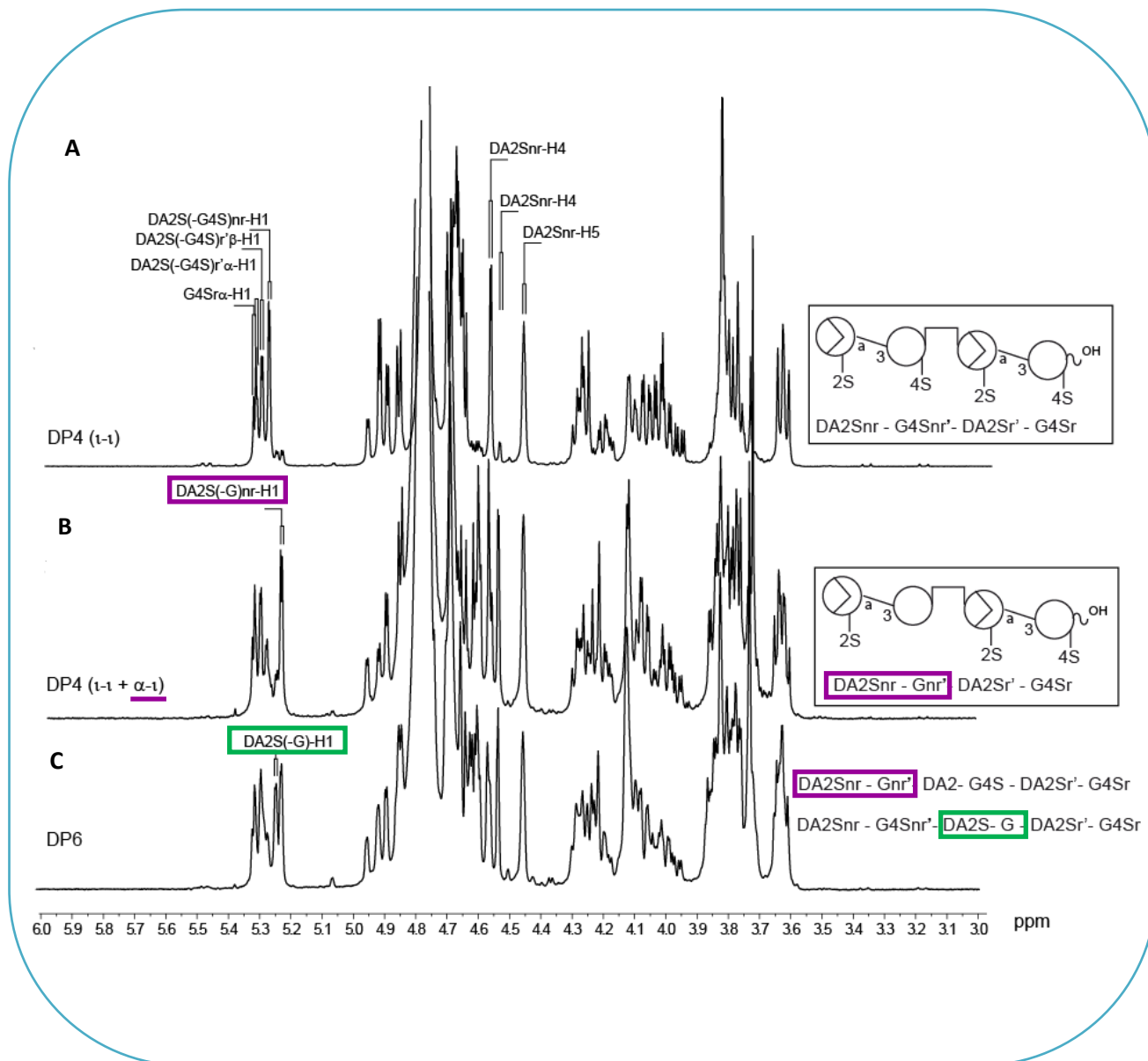


Figure 2-20 : Spectres ^1H -RMN des oligosaccharides hybrides DP4 et DP6 en comparaison avec le néo-*t*-carratetraose (DP4)

D.4 Analyses RMN ^1H des oligosaccharides hybrides ι - α -carraghénane

L'analyse RMN ^1H des oligosaccharides a permis d'identifier les pics élués à 585 et 665 min comme les oligo- ι -carraghénanes DP6 et DP4 respectivement (Figures 2-18) en s'appuyant sur les données déjà connues de ces oligosaccharides (van de Velde *et al*, 2004 ; Jouanneau *et al*, 2010). L'analyse des deux spectres des fractions correspondant aux pics élués à 625 et 685 min respectivement, a confirmé pour chacun une structure hybride de type ι - α -. En effet, si l'on compare le spectre RMN ^1H du DP4 ι -carrabiose (Figure 2-20A) avec celui du DP4 ι - α -carrabiose (Figure 2-20B), on observe un déplacement du signal du proton anomérique de l'unité anhydrogalactose sulfatée (conversion du DA2S(-G4S)nr-H1 en DA2S(-G)nr-H1). Ce déplacement est dû au retrait du groupement sulfate en position 4 de l'unité galactose (Gnr') du côté non-réducteur. Ainsi, l'oligosaccharide purifié est un DP4 avec une unité α -carrabiose du côté non-réducteur attenante à une unité ι -carrabiose du côté non réducteur (Figure 2-20B). De façon similaire, on observe sur le spectre RMN ^1H du DP6 hybride (C), ce même signal attribué à une unité anhydrogalactose désulfatée positionnée du côté non-réducteur (DA2S(-G)nr-H1). Cependant, on observe également un signal additionnel légèrement plus blindé correspondant à la perte du groupement sulfate sur une autre unité G (DA2S(-G)-H1). On peut donc en conclure qu'on observe deux DP6 hybrides ι - α -carraghénane. Un premier dont l'unité α -carrabiose est du côté non réducteur, et un second où elle se trouve en position interne (Figure 2-20C). Toutefois, on ne peut pas exclure que l'on produise un troisième oligosaccharide DP6 hybride, qui aurait une structure avec deux unités α -carrabioses attenantes à une unité ι -carrabiose du côté réducteur. Néanmoins, il est important de souligner qu'aucun spectre ne montre le galactose désulfaté, c'est-à-dire de motif α -carrabiose, du côté réducteur ; résultat lié à la spécificité de la carraghénase.

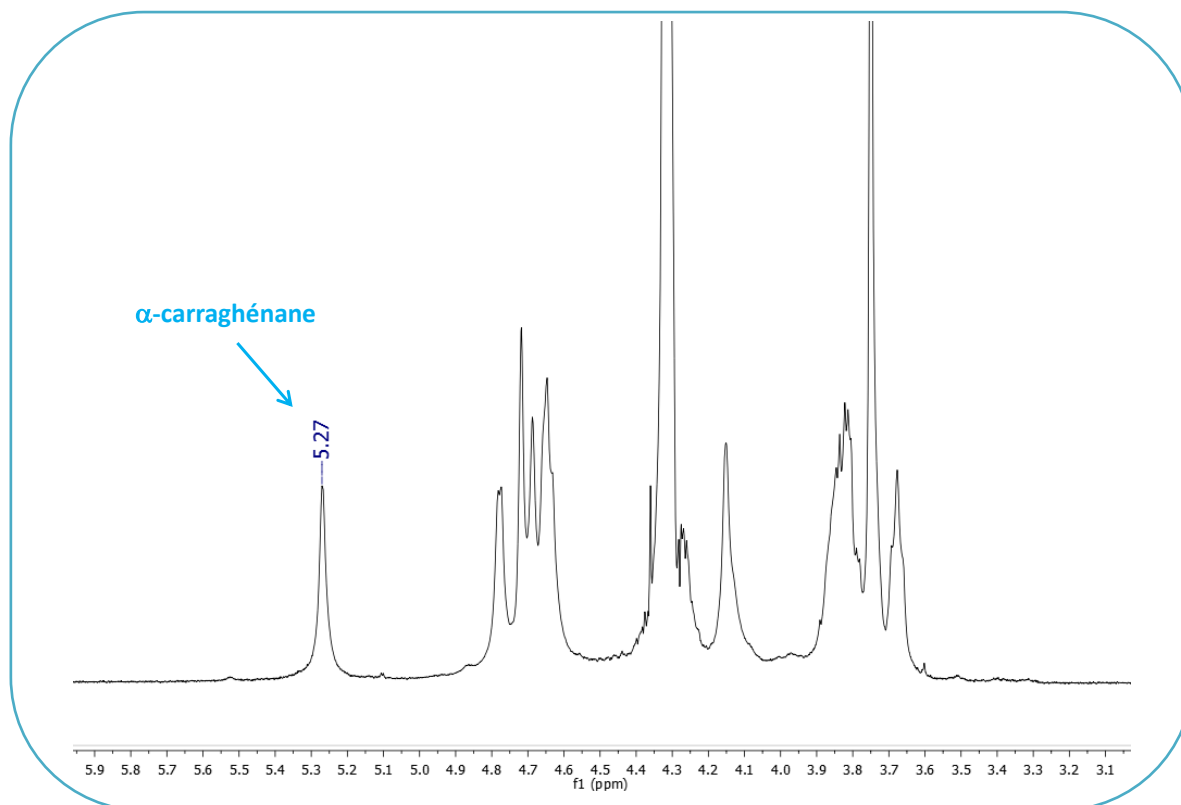


Figure 2-21 : Spectre RMN ^1H d' α -carraghénane pur produit grâce à la sulfatase native Q15XH3

| | <i>P. atlantica</i> | <i>P. carrageenovora</i> |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| Famille | Formylglycine | Nouvelle |
| Poids moléculaire | 55 kDa | 110 kDa |
| T° optimale | 35°C | 45°C |
| pH optimal | 7,5 | 8-8,5 |
| [NaCl] optimale | 25 mM | 200 mM |
| Km | 3,2 μM | - |
| Vm | 1,95 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ | - |

Tableau 2-2 : Comparaison des deux 4S-t-carraghénane-sulfatases

DISCUSSION

A. Identification de la sulfatase Q15XH3 de *P. atlantica*

Le protocole mis en place pour la purification de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase découverte par le criblage, a conduit à l'obtention d'une protéine pure et à son identification. En effet, l'analyse des peptides en spectrométrie de masse a mis en évidence une homologie avec la protéine Q15XH3 de *P. atlantica* T6c, dont le gène (Patl_0889) a été annoté comme une sulfatase (Protein_ID ABG39415.1 ; Copeland *et al.*, 2006). Malgré les faibles activités de désulfatation obtenues, la surexpression de la protéine Q15XH3 de *P. atlantica* a permis de valider que son gène codait pour une 4S- ι -carraghénane-sulfatase. Cependant l'optimisation de la surexpression hétérologue de la sulfatase reste encore à faire. La nécessité de la présence de protéines de maturation rend la mise au point des conditions d'expression particulièrement difficile. La sulfatase identifiée, dont le poids moléculaire est de 55 kDa, présente dans sa séquence la signature de la modification post-traductionnelle de la cystéine en C α -formylglycine. Nous avons ainsi identifié la première carraghénane-sulfatase appartenant à la famille des sulfatases à formylglycins. Cette grande famille rassemble la majorité des sulfatases connues à ce jour, mais surtout toutes les sulfatases agissant sur des carbohydrates. En effet, aucune sulfatase active sur des carbohydrates n'a été répertoriée dans la famille des sulfatases dioxygénases Fe(II)- α -kétoglutarate dépendantes, ni chez les métallo- β -lactamases. La sulfatase Q15XH3 catalyse la désulfatation du ι -carraghénane et conduit à sa conversion en α -carraghénane (Figure 2-21). Son appartenance à la famille des sulfatases à formylglycine la distingue de la précédente 4S- ι -carraghénane-sulfatase purifiée au laboratoire, d'un poids moléculaire de 110 kDa (Tableau 2-2) qui appartient à une nouvelle famille, encore non répertoriée (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2009). On note également une différence des optima de température et de pH entre les deux enzymes. Bien que présentant la même fonction, les sulfatases de *P. carageenovora* et de *P. atlantica* nécessitent également des concentrations en NaCl différentes pour une efficacité maximale de la réaction de désulfatation. La sulfatase Q15XH3 a été biochimiquement caractérisée. La purification ayant conduit à l'identification de la sulfatase Q15XH3 n'exclut pas la présence d'autres sulfatases

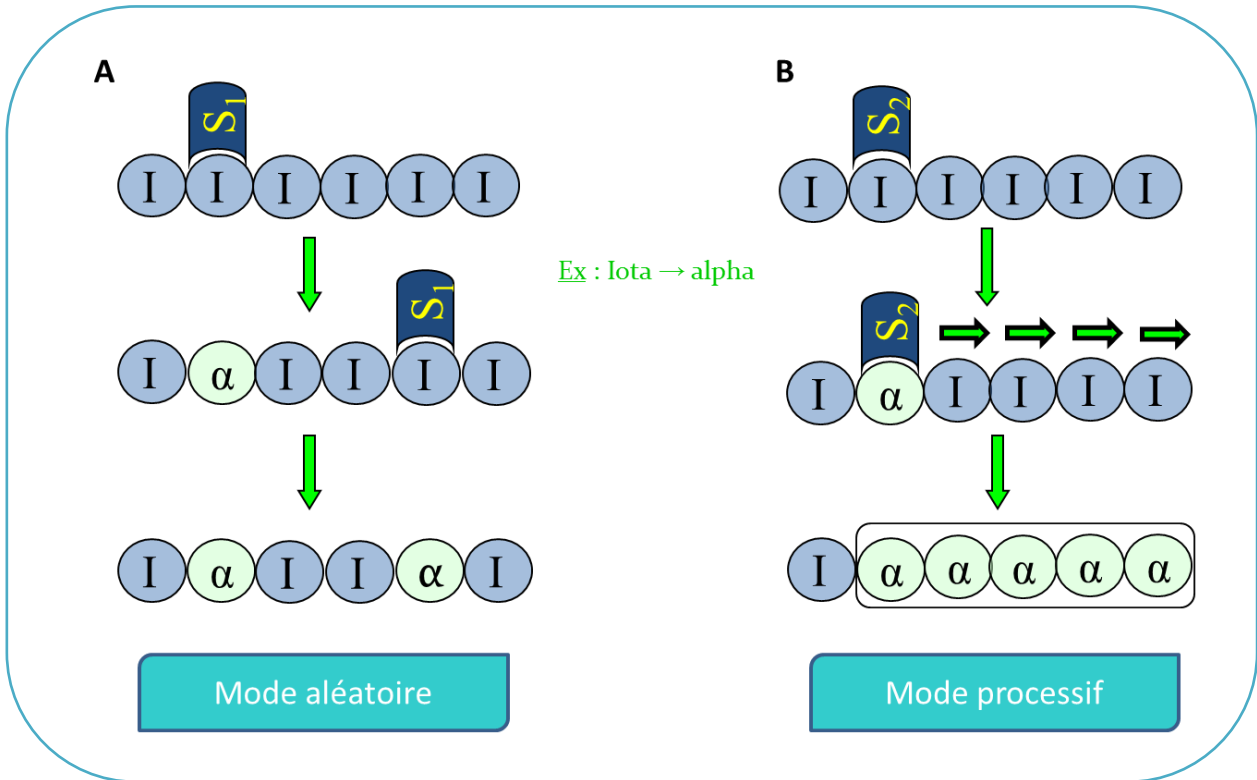


Figure 2-22 : Exemples de modes d'action des sulfatases

de même fonction chez *P. atlantica*, comme c'est déjà le cas chez cette bactérie qui montre une redondance dans ses activités agarases (www.cazy.org).

B. Mode d'action de la sulfatase Q15XH3 de P. atlantica

Dans le cas des enzymes de désulfatation, plusieurs modes d'action peuvent être envisagés. Le mode d'action aléatoire (Figure 2-22A), décrit la situation dans laquelle la sulfatase se fixe aléatoirement le long de la chaîne polysaccharidique, et après désulfatation spécifique du disaccharide, se décroche pour aller se fixer à un autre motif ι -carrabiose. Ce mode d'action peut induire rapidement un changement d'état du polysaccharide en solution (influence du nouveau motif disaccharidique sur la viscosité). Il en résulte un polymère hybride présentant une distribution aléatoire des différents motifs le long de la chaîne. Le second mode d'action envisageable est le mode processif (Figure 2-22B). Dans ce cas, la sulfatase se fixe à l'extrémité de la chaîne polymérique, et convertit les motifs successivement le long de la chaîne en glissant sur celle-ci. On obtient alors un polymère hybride avec une distribution en bloc des différentes unités carrabioses. Si l'on dégrade ces polymères désulfatés, on s'attend à des fragments différents suivant le mode d'action de l'enzyme : un mode processif entraînerait une fraction résistante de polymère non désulfaté et des oligosaccharides standards spécifiques à la carraghénase utilisée, tandis qu'un mode d'action aléatoire, entraînerait la production d'oligosaccharides hybrides.

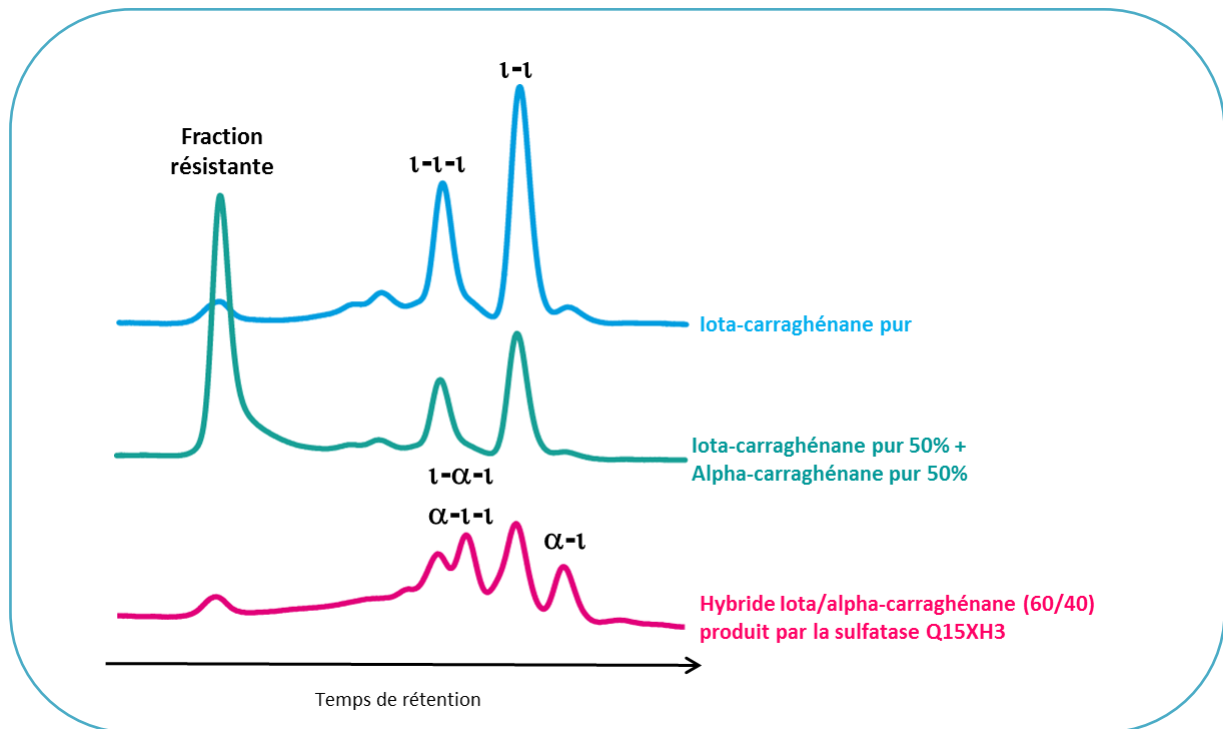


Figure 2-23 : Comparaison des profils de dégradation par la ι -carraghénase d'*A. fortis* de ι -carraghénane (A), d'un mélange de ι - et α -carraghénane (50/50) (B) et d'un hybride ι -/ α -carraghénane produit par la sulfatase (C)

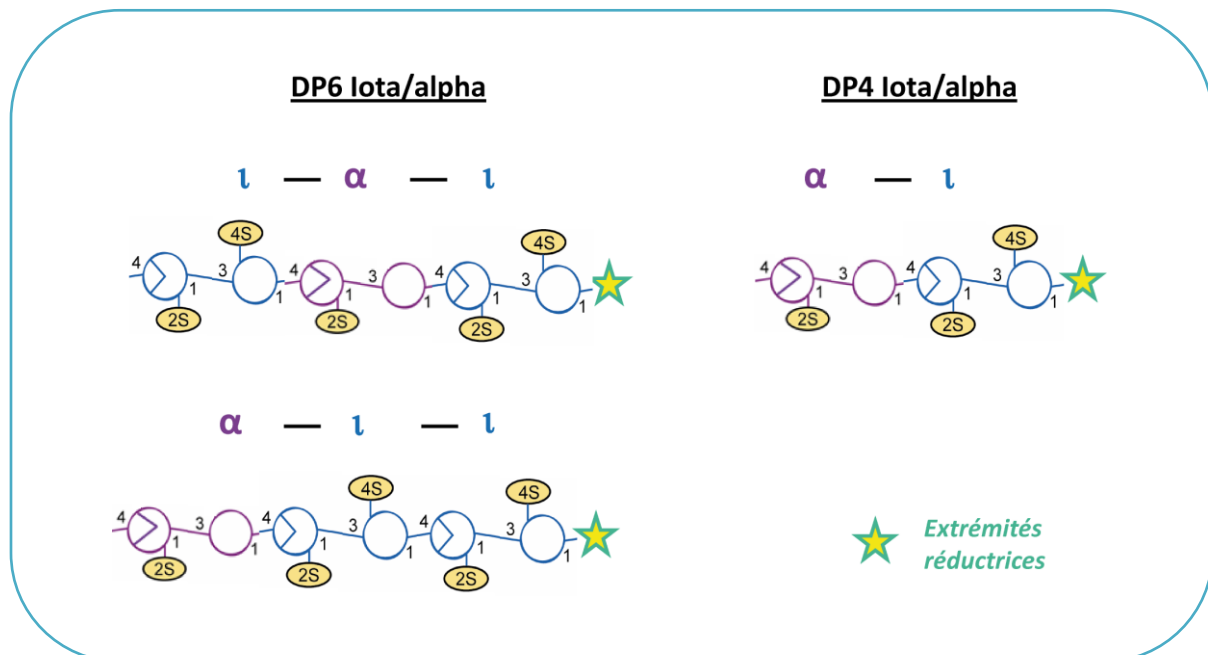


Figure 2-24 : Oligosaccharides obtenus après action de la sulfatase Q15XH3 de *P. atlantica* puis de la ι -carraghénase d'*A. fortis* sur un polymère de ι -carraghénane

La détermination du mode d'action de la sulfatase Q15XH3 a été entreprise à partir de l'enzyme native en raison des difficultés rencontrées pour obtenir une activité de désulfatation avec la protéine surexprimée. Les expériences réalisées ont permis de révéler que la sulfatase Q15XH3 agissait selon un mode d'action endo (Figure 2-23). En effet, la très forte dégradation des polymères désulfatés par la ι -carraghénase d'*A. fortis* (observation d'une fraction résistante à l'enzyme très faible), de même que l'obtention d'oligosaccharides hybrides, suggèrent des attaques enzymatiques à divers endroits de la chaîne, et probablement de façon aléatoire. Malgré la difficulté rencontrée à purifier les oligosaccharides, l'identification des structures a pu être effectuée grâce à la RMN ^1H . La distribution des motifs a montré que les unités α -carrabioses n'étaient jamais positionnées du côté réducteur (Figure 2-24). La structure des oligosaccharides produits reflète la structure du polymère désulfaté. Par conséquent, nous avons pu affirmer que celui-ci présentait une distribution aléatoire des unités ι - et α -carrabioses, caractéristique d'un mode d'action endo-aléatoire de la sulfatase.

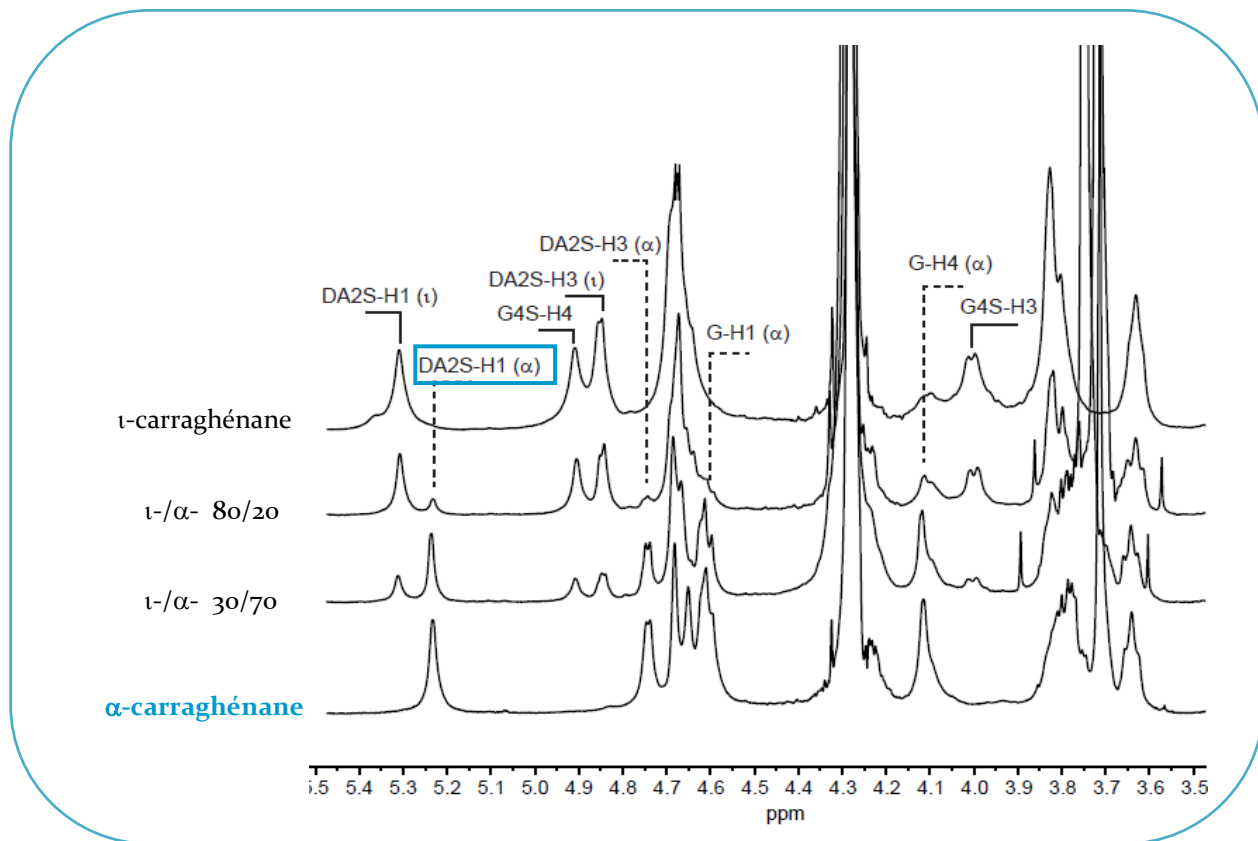


Figure 2-25 : Spectres RMN ^1H montrant la conversion du ι -carraghénane en α -carraghénane

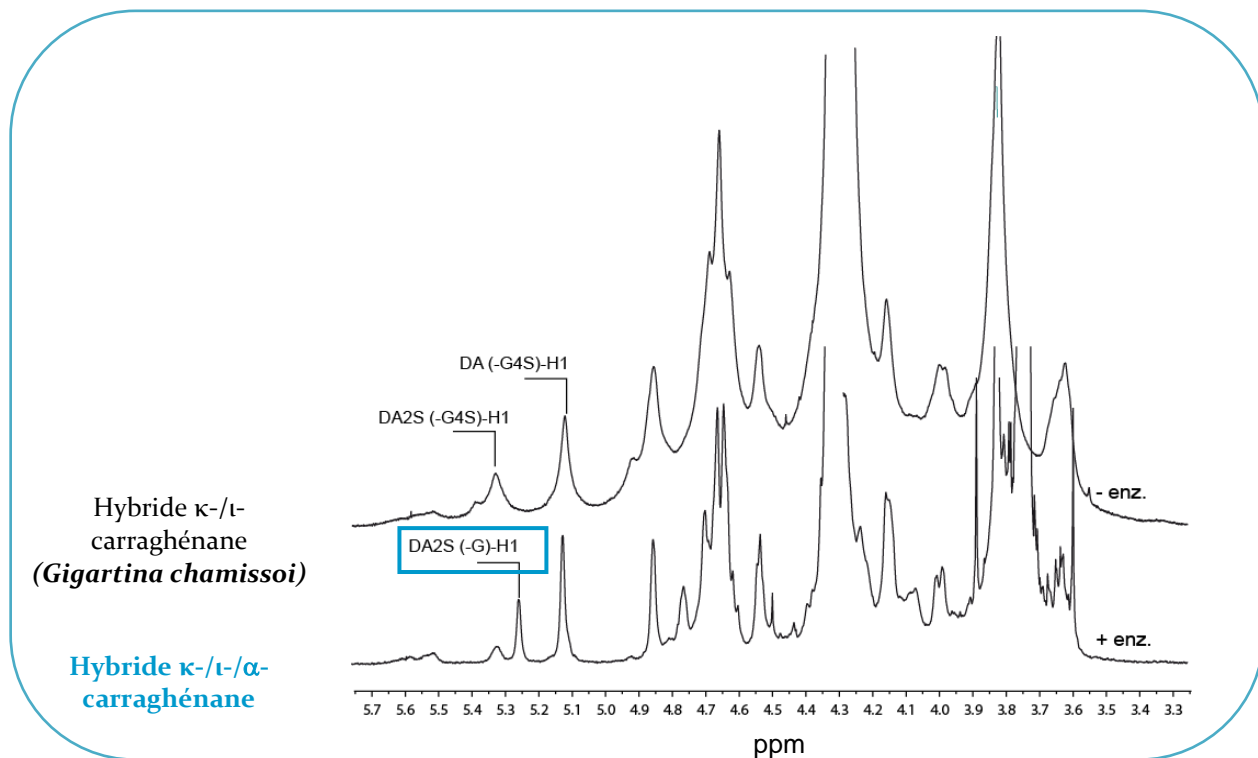


Figure 2-26 : Spectres RMN ^1H montrant la conversion du κ -/ ι -carraghénane en κ -/ ι -/ α -carraghénane

C. Intérêt de la sulfatase Q15XH3 de *P. atlantica*

La spécificité et le caractère endo de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase de *P. atlantica* permet de produire des hybrides ι -/ α -carraghénanes avec des ratios contrôlés (Figure 2-25). Les hybrides ι -/ α -carraghénanes ont été décrits dans très peu d'espèces d'algues rouges (Zablackis *et al.*, 1986 ; Chiovitti *et al.*, 1997 et 1998), et la teneur en unités α -carrabioses n'excède jamais 30 à 40% (mol/mol). La sulfatase purifiée permet également de produire de l' α -carraghénane pur (Figure 2-25), dont l'existence n'a jamais été mise en évidence dans la nature. De plus, nous avons observé que les unités ι -carrabioses pouvaient être converties en α -carrabioses, même lorsqu'elles étaient localisées entre deux motifs κ -carrabioses (Figure 2-26). Grâce à cette propriété originale, nous avons été en mesure de produire des hybrides κ -/ ι -/ α -carraghénanes (Figure 2-26) et même avoisiner du κ -/ α -carraghénane, dont l'existence n'a jamais été démontrée jusqu'à ce jour. Il est également possible d'envisager la production de nouvelles séries d'oligosaccharides hybrides comme des oligosaccharides κ -/ ι -/ α -carraghénanes et κ -/ α -carraghénanes, par utilisation de ι - et κ -carraghénases.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La purification de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase a permis de démontrer que la sulfatase détectée sur le criblage agissait bien sur le polymère de ι -carraghénane, bien qu'elle soit également capable d'agir sur les oligo- ι -carraghénanes avec une réactivité plus faible. Dans ce contexte, les carraghénane-sulfatases ouvrent de nouvelles voies biotechnologiques pour contrôler et synthétiser de nouvelles structures de carraghénanes, dont les propriétés n'ont pas encore fait l'objet d'investigations. En se basant sur les études préliminaires effectuées sur un hybride ι - α -carraghénane, extrait directement de l'algue *Catenella nipae* Zanardini, qui ont permis de révéler le potentiel de cet hybride (gel fort, bonne capacité à suspendre les particules de cacao dans le lait...), on peut aisément penser que les nouvelles structures de carraghénanes apporteront de nouvelles propriétés fonctionnelles d'intérêt.

La purification et l'identification de cette nouvelle 4S- ι -carraghénane-sulfatase a conduit à un dépôt de brevet (Préchoux *et al.*, Brevet FR 10/58420, 2010) ainsi qu'à une publication dans le journal « *Marine Biotechnology* » (Préchoux *et al.*, 2012).

ANNEXE CHAPITRE II :

Production et caractérisation d'oligo- α -carraghénanes par analyses RMN (*Travaux en cours de réalisation*)

INTRODUCTION

L' α -carraghénane, comme nous l'avons déjà évoqué, n'existe pas dans la nature à l'état pur. Il est uniquement présent dans des structures hybrides de ι -/ α -carraghénane, mais la teneur en unités α -carrabiose dépasse rarement les 30 à 40 %. La structure des disaccharides α -carrabiose a été reportée à l'origine chez l'espèce *Catenella nipae* Zanardini (Zablackis & Santos, 1986). A ce jour, aucune α -carraghénase n'a été décrite dans la littérature, sans doute en raison de la nécessité de produire au préalable un polymère d' α -carraghénane pur. Grâce à notre 4S- ι -carraghénane-sulfatase (Q15XH3), purifiée à partir de *P. atlantica*, nous sommes en mesure de produire de l' α -carraghénane pur, mais aussi, en raison de la flexibilité du site actif et du caractère endo de notre enzyme, de convertir des oligo- ι -carraghénanes en oligo- α -carraghénanes. Nous avons donc entrepris la production d'oligo- α -carraghénanes pour en faire leur caractérisation par analyses RMN. Des expériences de RMN du proton et du carbone en 1D ont été menées ainsi que des analyses en 2D COSY, HMQC et HMBC pour caractériser ces oligo- α -carraghénanes de façon la plus approfondie. Bien que toutes les analyses RMN aient été effectuées, l'interprétation des spectres est quant à elle toujours en cours, et donnera lieu à une publication dans les mois qui viennent. Par conséquent, seuls les principaux spectres seront présentés dans cette annexe afin de rendre compte du travail en cours de réalisation.

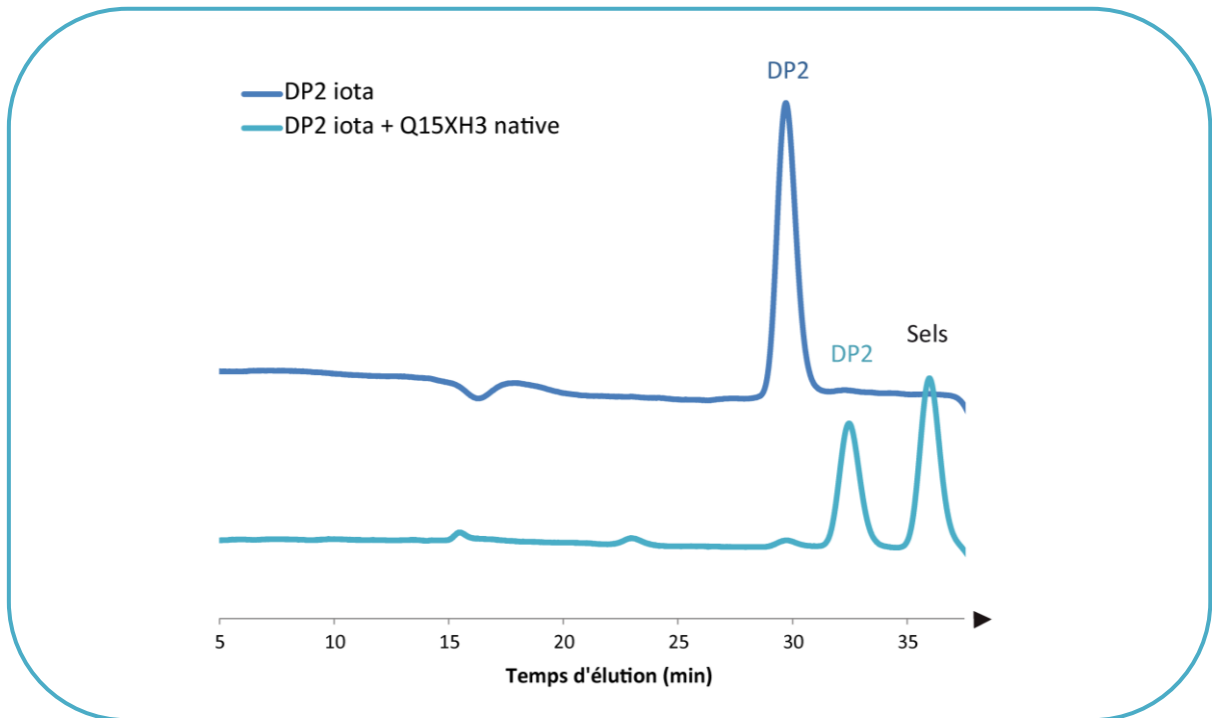


Figure 2-27 : Conversion du ι -carrabiose en α -carrabiose par la sulfatase Q15XH3 native

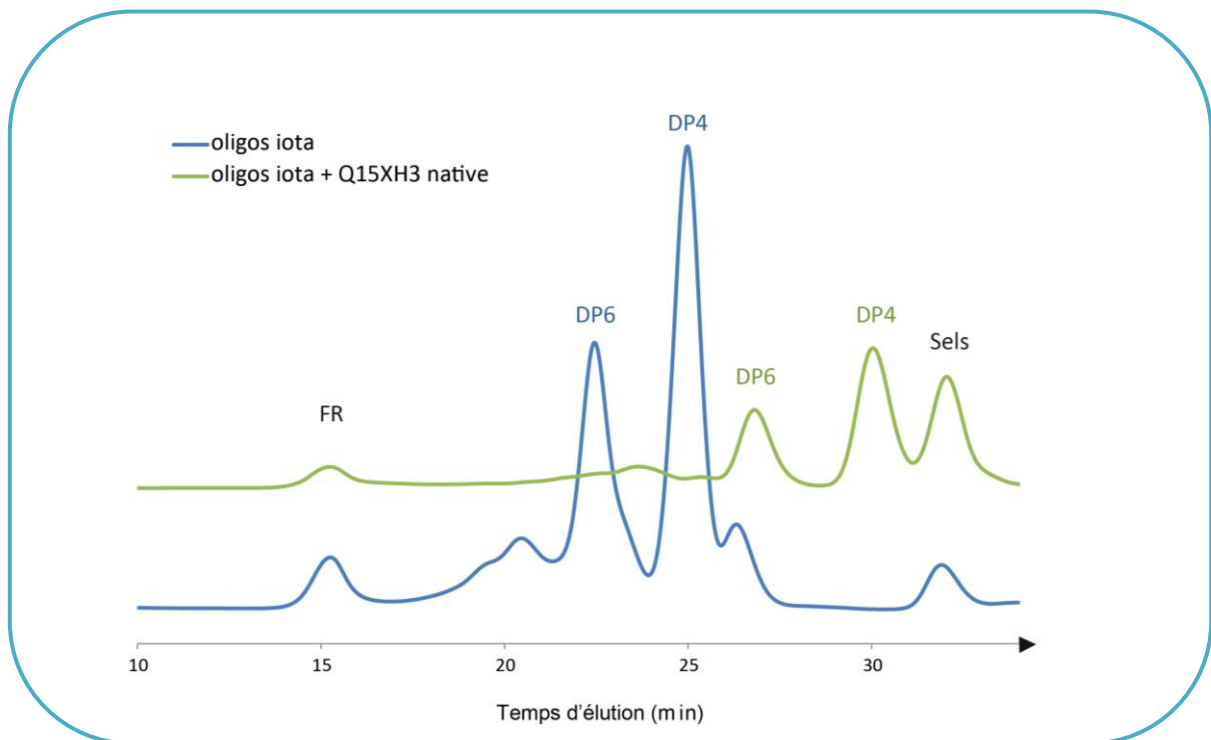


Figure 2-28 : Conversion des néo- ι -carratétraose et -hexaose respectivement, par la sulfatase Q15XH3 native.

RESULTATS

A. Production des oligo- α -carraghénanes

Dans un premier temps, des oligo- ι -carraghénanes ont été produits, à partir de la ι -carraghénase d'*A. fortis* pour le néo- ι -carrahexaose (DP6) et le néo- ι -carratétraose (DP4), et à partir de la ι -carraghénase de *P. atlantica* pour le néo- ι -carrabiose (DP2). Ces différents oligosaccharides ont été incubés en présence de la sulfatase native Q15XH3 purifiée. La conversion a été suivie par mesure du sulfate libéré par HPAEC. La fin de la réaction a été évaluée par analyse du milieu d'incubation par HPSEC. Ainsi, on a pu observer le déplacement des pics des oligosaccharides convertis (Figures 2-27 et 2-28). En effet, le poids de ces derniers est plus faible en raison de la perte du groupement sulfate, ils sont donc élués plus tard de la colonne de gel filtration. Après s'être assuré de la conversion des oligosaccharides en oligo- α -carraghénanes, les échantillons ont été dessalés par collecte manuelle sur le système HPLC à l'aide d'une colonne S200 peptide.

B. Analyses RMN des oligo- α -carraghénanes

Les oligo- α -carraghénanes présentés ici possèdent une structure de la série néo- α -carrabiose en raison de leur production à partir d'oligo- ι -carraghénanes de la série néo- ι -carrabiose.

B.1 Analyses par RMN 1D du proton (1H)

B.1.1 Le néo- α -carrabiose (DP2)

Les spectres RMN 1H présentés à la figure 2*-30 ont été réalisés à 25°C. Le spectre RMN 1H du néo- α -carrabiose est présenté avec celui du néo- ι -carrabiose pour rendre compte du déplacement des différents signaux induit par la perte du sulfate de l'unité G (Figure 2-

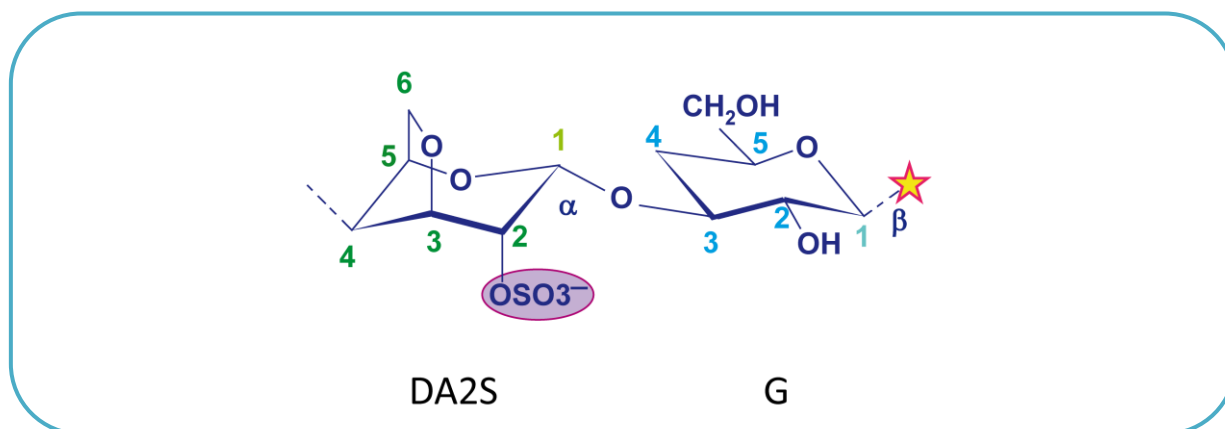


Figure 2-29 : Structure chimique du néo- α -carrabiose

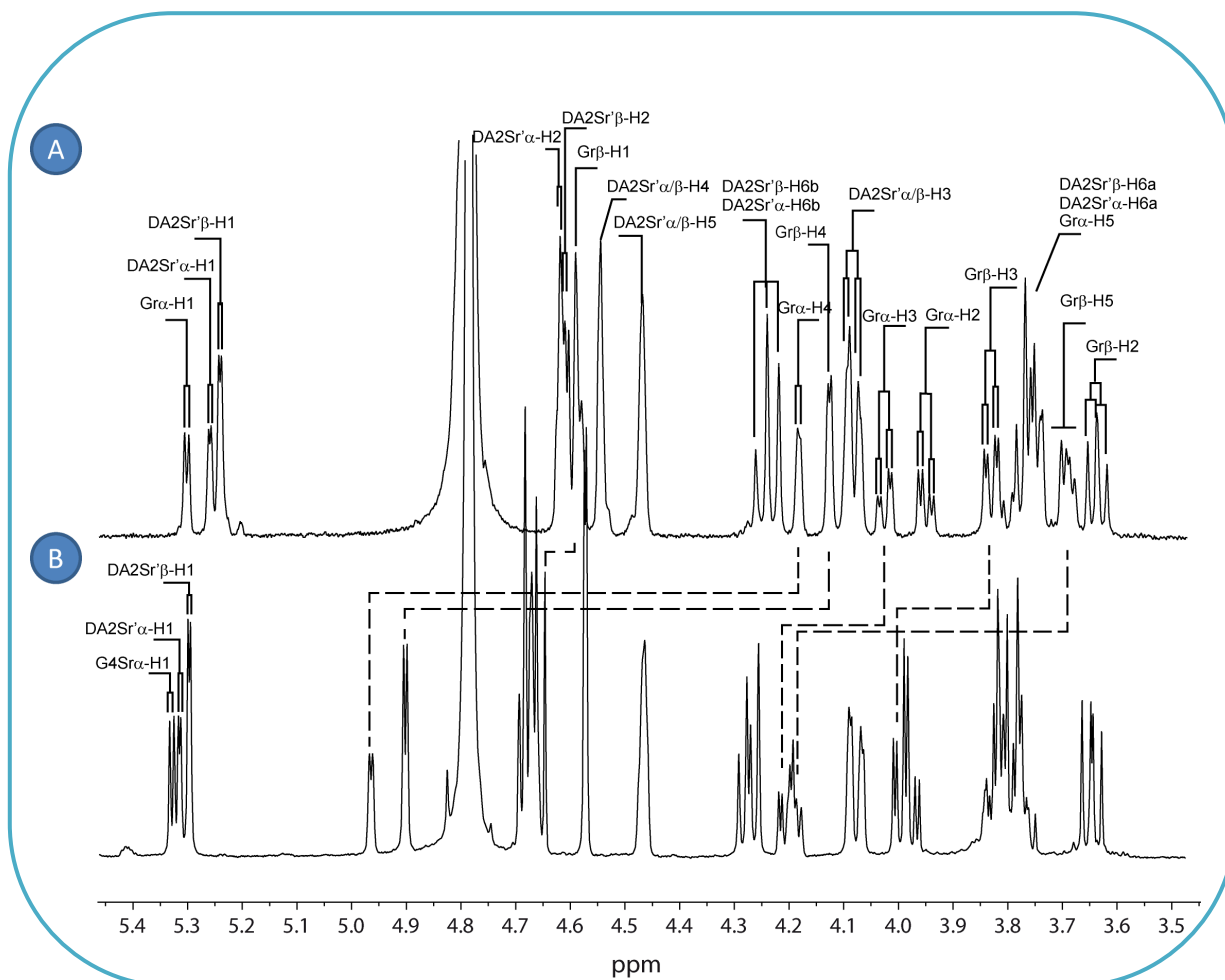


Figure 2-30 : Spectres RMN ¹H à 25°C du néo- α -carrabiose (DP2) (A) et néo- β -carrabiose (DP2) (B) sous leurs formes anomériques α et β

29). Les signaux anomériques sont en effet légèrement plus blindés dans le cas des oligo- α -carraghénanes. Le spectre ^1H -RMN obtenu pour l'oligo- α -carraghénane DP2 (Figure 2-30A) est la superposition de deux spectres, celui du (DA2Snr' α -Gr α) et celui du (DA2Snr' α -Gr β) résultant de l'équilibre anomérique α/β . Les spectres RMN d'un disaccharide présentent des signaux que l'on ne retrouve pas sur les spectres des oligo-carraghénanes de plus haut degré de polymérisation (Knutsen *et al.*, 1992b). En effet, l'unité DA2Snr (dans le cas d'un néo- α -carrabiose) du disaccharide possède un environnement unique, à la fois d'unité non réductrice et d'unité voisine de l'extrémité réductrice Gr.

B.1.2 Les néo- α -carratétraose et néo- α -carrahexaose

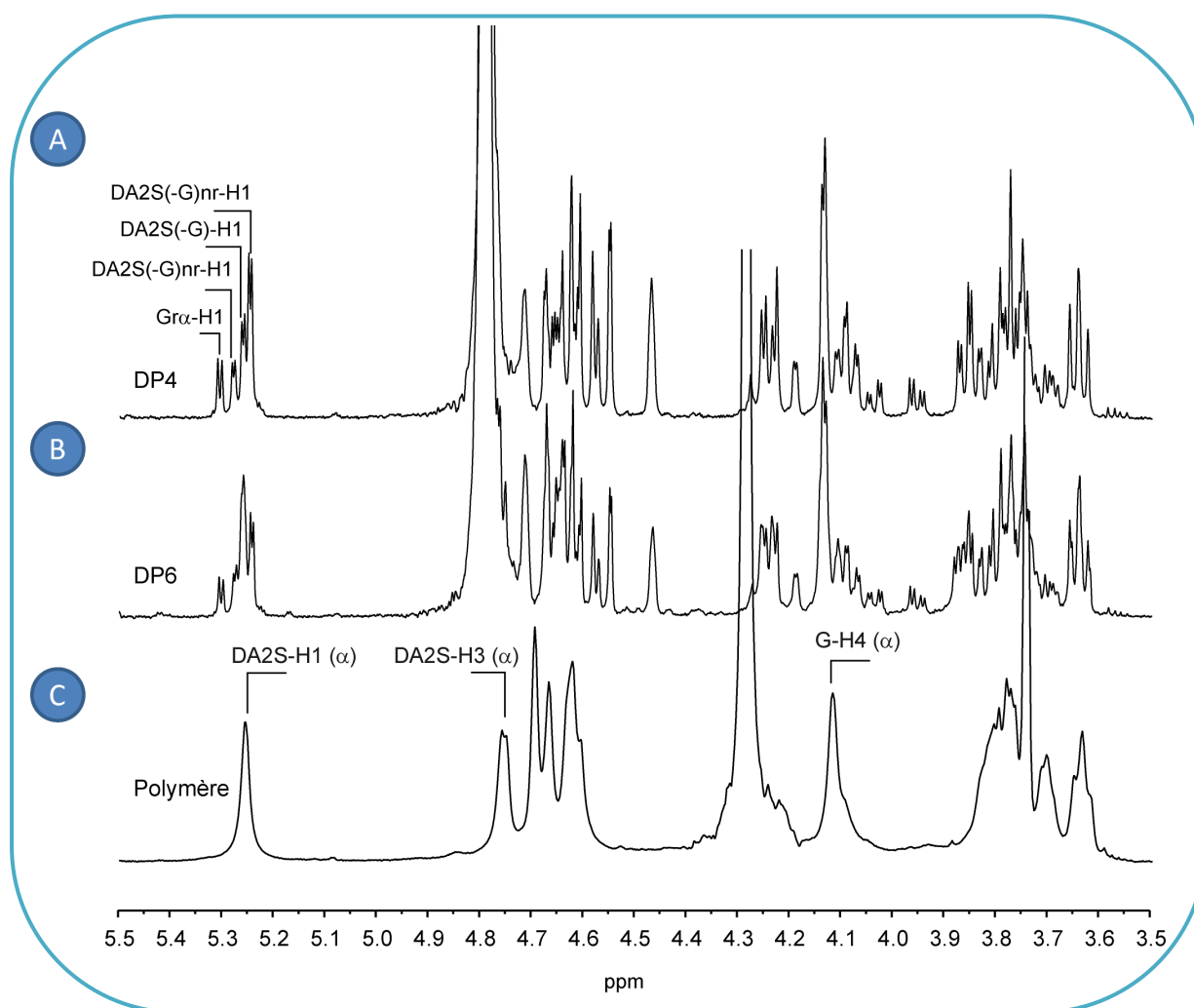


Figure 2-31 : Spectre RMN ^1H du néo- α -carratétraose DP4 (A), du néo- α -carrahexaose DP6 (B) et du polymère d' α -carraghénane (C)

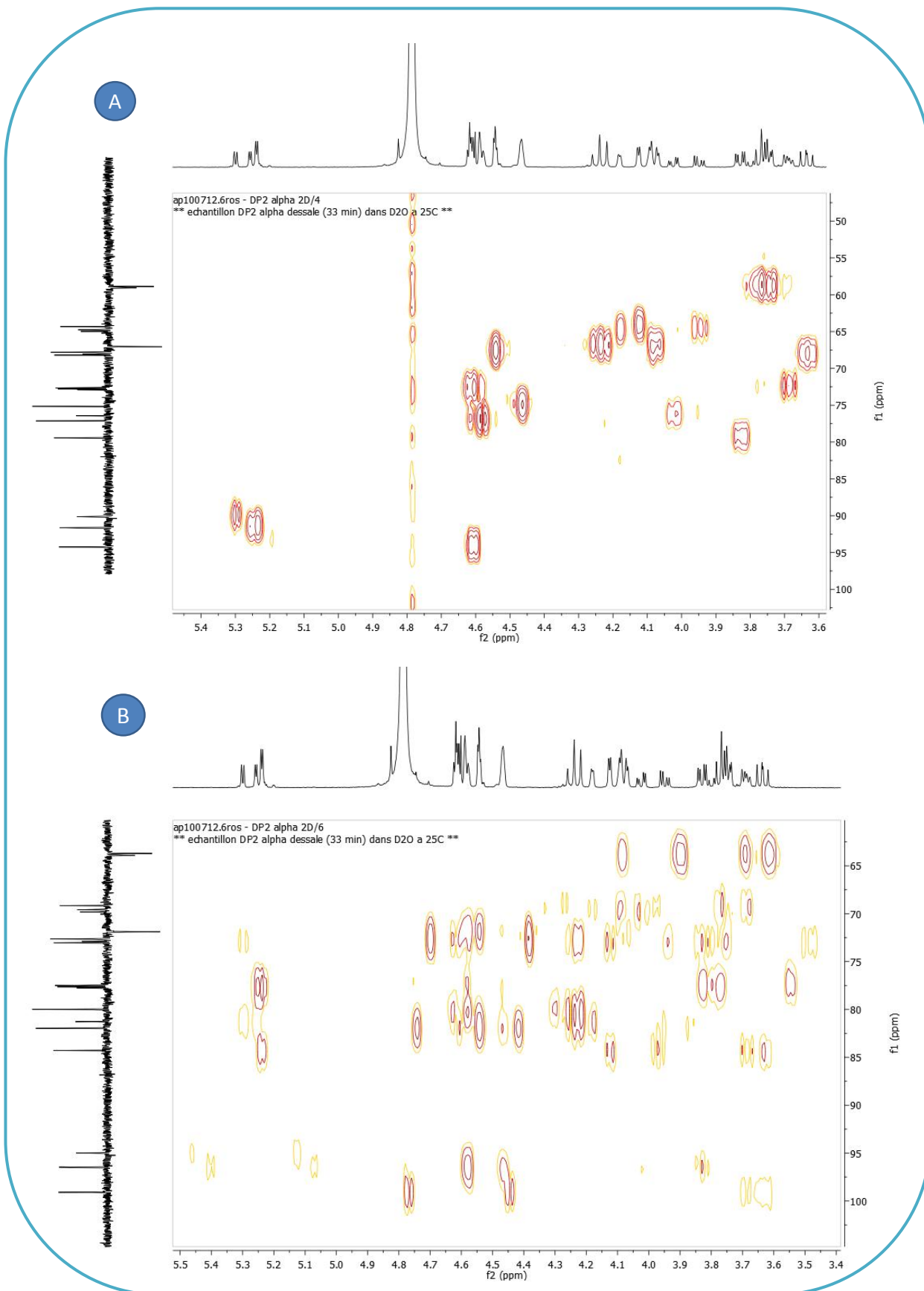


Figure 2-32 : Spectres hétéronucléaires $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC (A) et HMBC (B) à 25°C du néo- α -carrabiose

B.2 Analyses par RMN 2D

L'enchaînement des différentes unités peut être déterminé par des expériences RMN en 2 dimensions. En effet, les analyses HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) permettent d'établir, à travers les couplages 2J et 3J , la relation entre les protons et les carbones séparés par 2 ou 3 liaisons. Ainsi, des taches de corrélation entre le H1 (C1) de l'unité G et le C4 (H4) de l'unité D, confirment la liaison $\beta(1-4)$ des carraghénanes. De la même façon, des taches de corrélation entre le H1 (C1) de l'unité D et le C3 (H3) de l'unité G, confirment la liaison $\alpha(1-3)$. Les analyses HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) en revanche, ne permettent pas la détermination des liaisons des structures de carraghénanes, car elles représentent uniquement les couplages 1J , soit une seule liaison entre le proton et le carbone (C1 et H1 par exemple).

Les spectres HMQC et HMBC des différents oligo- α -carraghénanes ont été réalisés (Figures 2-32 à 2-35). Cependant les analyses n'ayant été obtenues qu'en fin de thèse, les interprétations n'ont pas encore été faites par manque de temps. Ces spectres seront analysés dans les semaines à venir afin de finaliser la caractérisation des oligo- α -carraghénanes de DP2, DP4 et DP6. Ces résultats feront l'objet d'une publication.

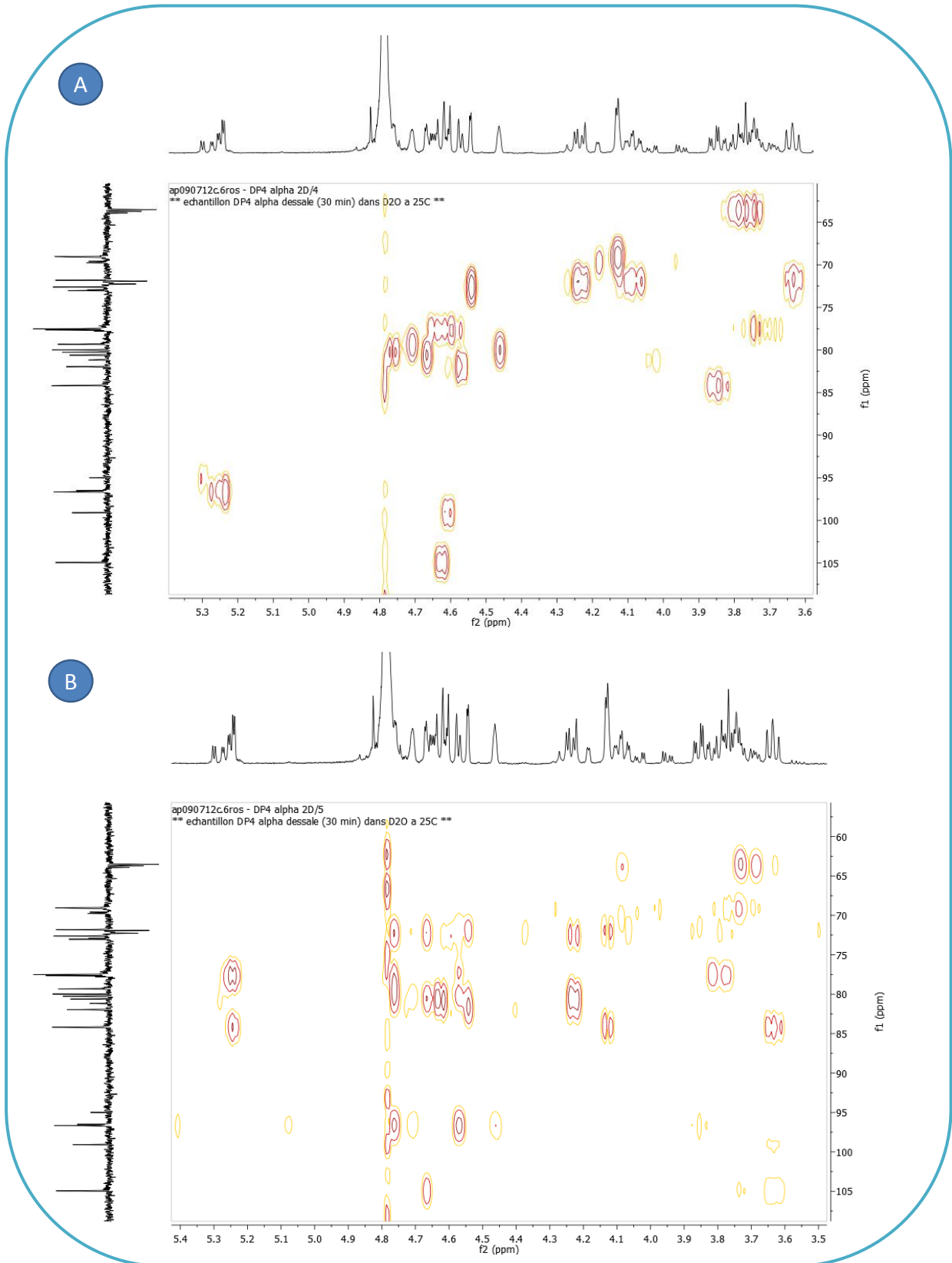


Figure 2-33 : Spectres hétéronucléaires $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC (A) et HMBC (B) à 25°C du néo- α -carratétraose

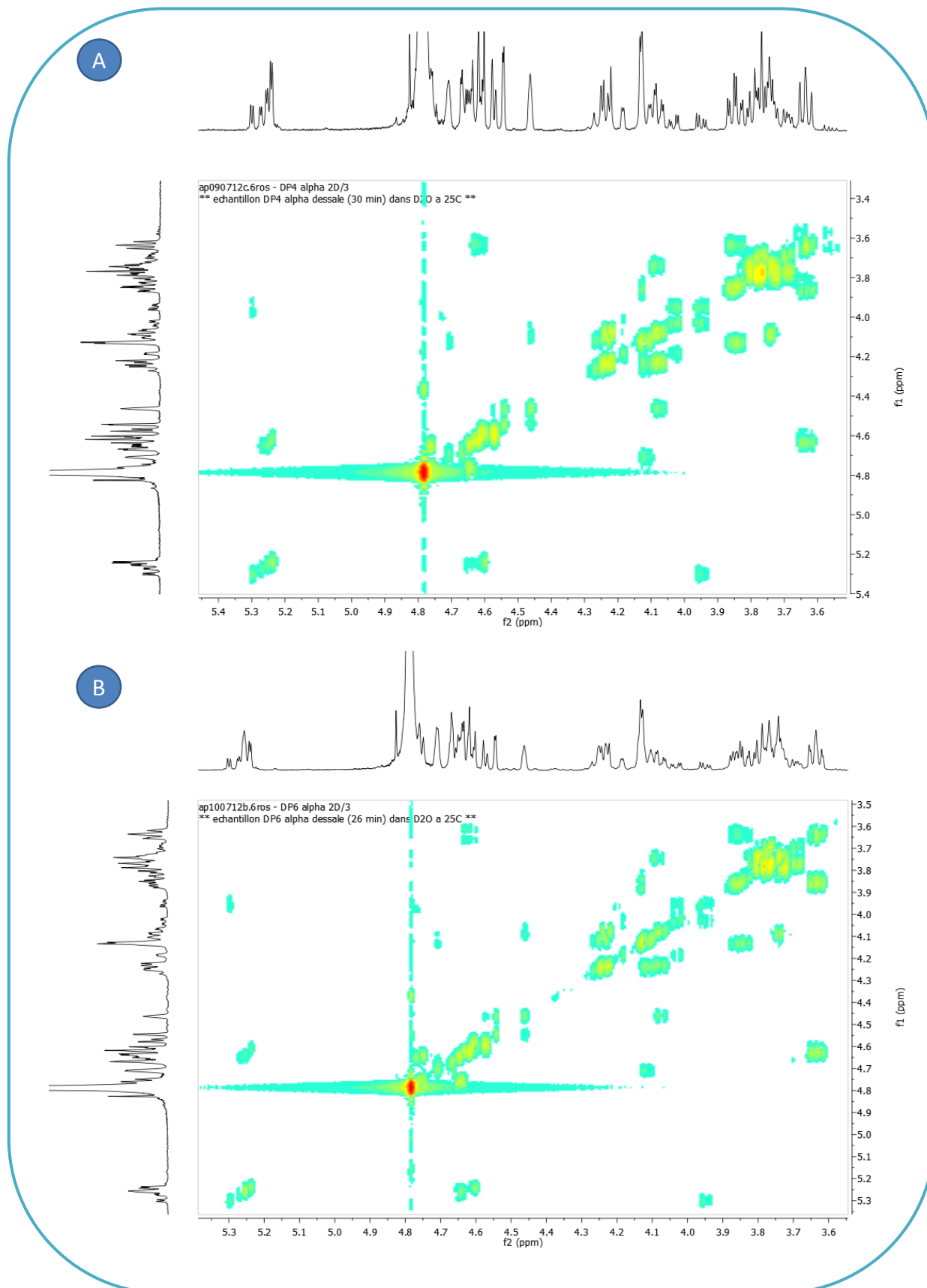


Figure 2-34 : Spectres ^1H COSY à 25°C du néo- α -carratétraose (A) et du néo- α -carrahexaose (B)

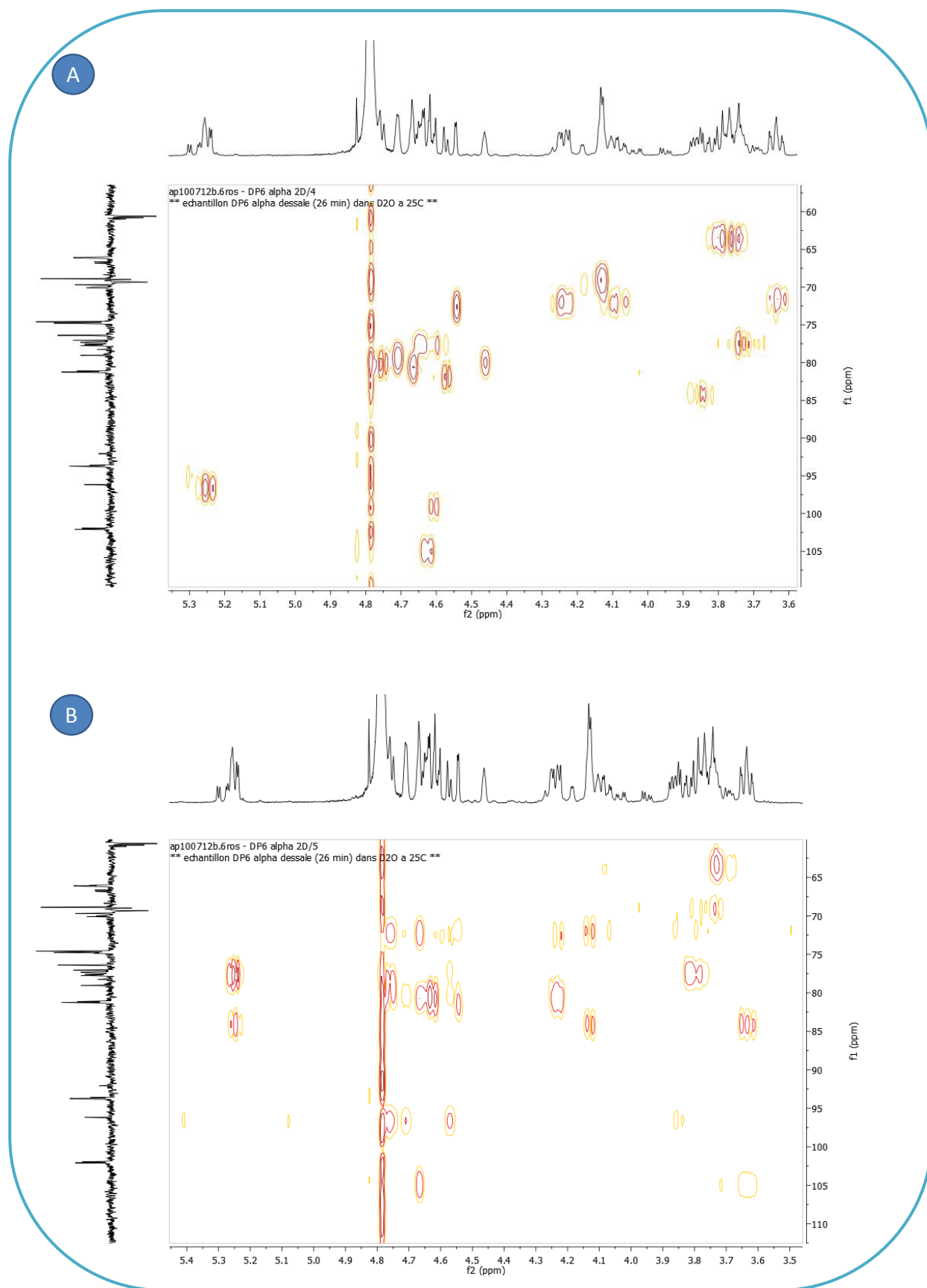


Figure 2-35 : Spectres hétéronucléaires $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC (A) et HMBC (B) à 25°C du néo- α -carrhexaose

RESULTATS

Chapitre III

Identification d'une

4S-k-carraghénane-sulfatase :

La sulfatase Q15XH1 de P. atlantica

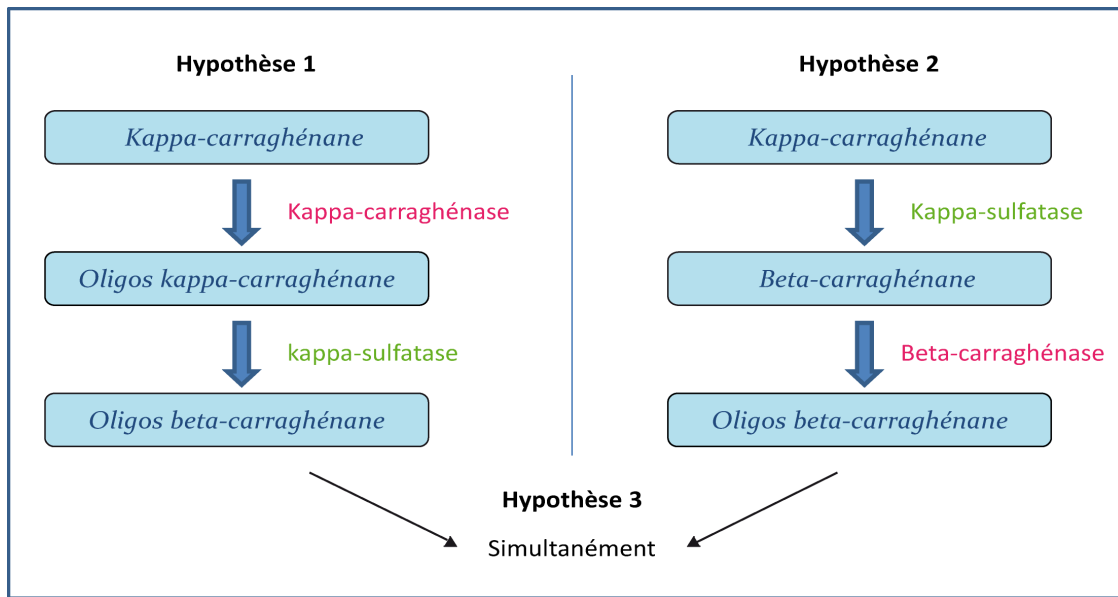


Figure 3-1 : Scénarios de dégradation du κ -carraghénane par le lysat de *P. atlantica*

CHAPITRE III :

IDENTIFICATION D'UNE 4S-K-CARRAGHÉNANE-SULFATASE LA SULFATASE Q15XH1 DE *P. ATLANTICA*

INTRODUCTION

La première activité sulfatase décrite dans la littérature à propos des carraghénanes, fut la glycosulfatase de *P. carrageenovora* permettant la conversion des oligo- κ -carraghénanes en oligo- β -carraghénanes (McLean & Williamson, 1979). L'activité de désulfatation des motifs κ -carrabioses n'avait cependant jamais été démontrée sur du polymère.

Lors du criblage d'activités sulfatases réalisé au début de cette thèse, nous avons mis en évidence une désulfatation du κ -/ μ -carraghénane par le surnageant de culture de *P. atlantica*, et dans une moindre mesure par le culot bactérien (Chap I, § I). Il s'est finalement avéré que l'activité de désulfatation était nettement plus abondante dans la fraction issue de la lyse cellulaire (Chap I, § II). Lors de la confirmation de l'activité de désulfatation par analyse RMN, nous avons mis en avant la présence d'une activité carraghénolytique. A ce stade, aucun élément ne permettait de dire si la dépolymérisation avait lieu avant ou après la désulfatation, et par conséquent si la sulfatase mise en jeu agissait sur du polymère ou sur des oligosaccharides. Toutefois plusieurs indices nous laissaient entrevoir que la dépolymérisation avait lieu après la désulfatation. En effet, dans l'hypothèse que la sulfatase agirait comme celle précédemment décrite par McLean & Williamson (1979) sur des oligosaccharides, cela supposerait la présence d'une κ -carraghénase dans *P. atlantica* (Figure 3-1). L'analyse bioinformatique des protéines de la famille GH16, qui regroupe toutes les κ -carraghénases connues à ce jour (Site web CAZy : <http://www.cazy.org>), n'a montré aucune séquence homologue dans *P. atlantica* à l'une des κ -carraghénases décrites, soutenant notre hypothèse

d'une sulfatase active sur le polymère. Un autre indice suggérant que la sulfatase serait active sur le polymère, fut révélé lors des analyses des extraits bactériens de *P. atlantica*. En effet, le β -carraghénane produit par la double désulfatation du ι -carraghénane par incubation avec le lysat brut de *P. atlantica*, était dégradé. Par conséquent, le β -carraghénane produit par la désulfatation du ι -carraghénane et celui produit par celle du κ -carraghénane ont chaque fois été visualisés en RMN sous une forme dépolymérisée. La mise en commun de toutes ces informations suggérait donc fortement que la sulfatase concernée par la désulfatation du κ -carraghénane agirait sur le polymère pour le convertir en β -carraghénane, avant que celui-ci ne soit dégradé par une β -carraghénase encore non identifiée dans *P. atlantica*.

L'intérêt que nous avons porté à cette enzyme était tant pour la compréhension de la biodégradation des carraghénanes, afin de déterminer s'il existait plusieurs voies de dégradation possibles, qu'à des fins biotechnologiques. En effet, l'objectif de la purification d'une κ -carraghénane-sulfatase réside dans la capacité à préparer, de façon contrôlée, des analogues du furcellaran, un hybride de κ -/ β -carraghénane, dont l'exploitation a fortement décru, en raison notamment de la diminution de la ressource de *F. lumbricallis* causée par son exploitation intensive.

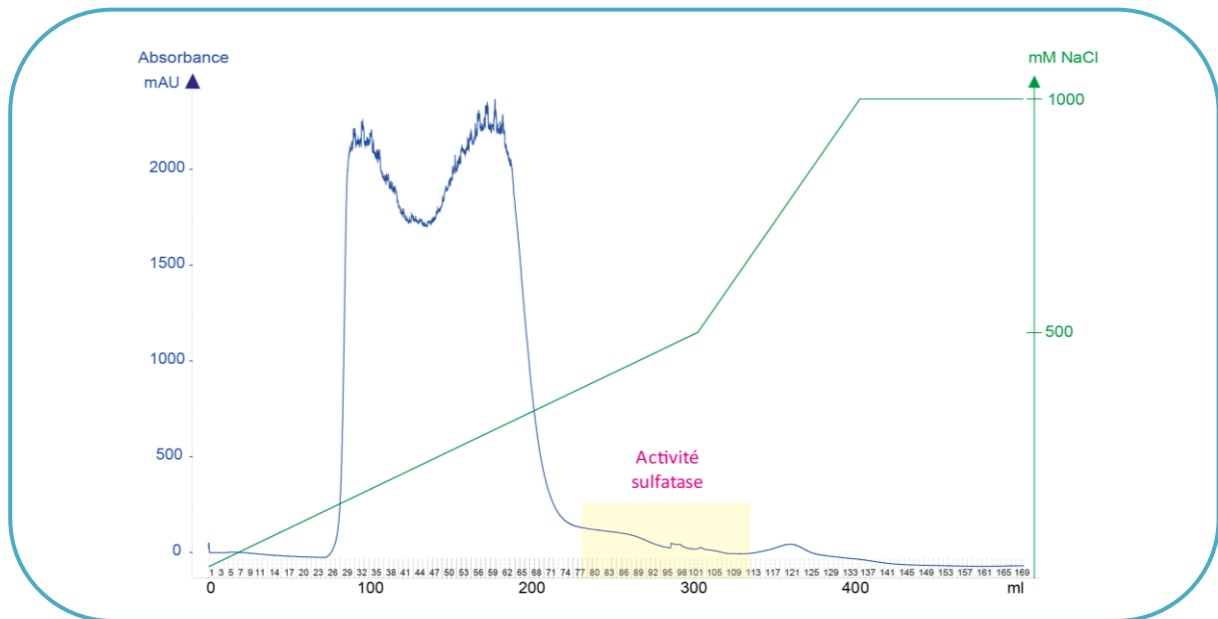


Figure 3-2 : Profil d'élution des protéines du lysat de *P. atlantica* sur colonne d'héparine

La courbe bleue représente l'absorbance mesurée à 280nm. La courbe verte représente le gradient de concentration en NaCl apporté pour éluer les protéines retenues sur la colonne. Les fractions contenant l'activité sulfatase sont colorées en jaune.

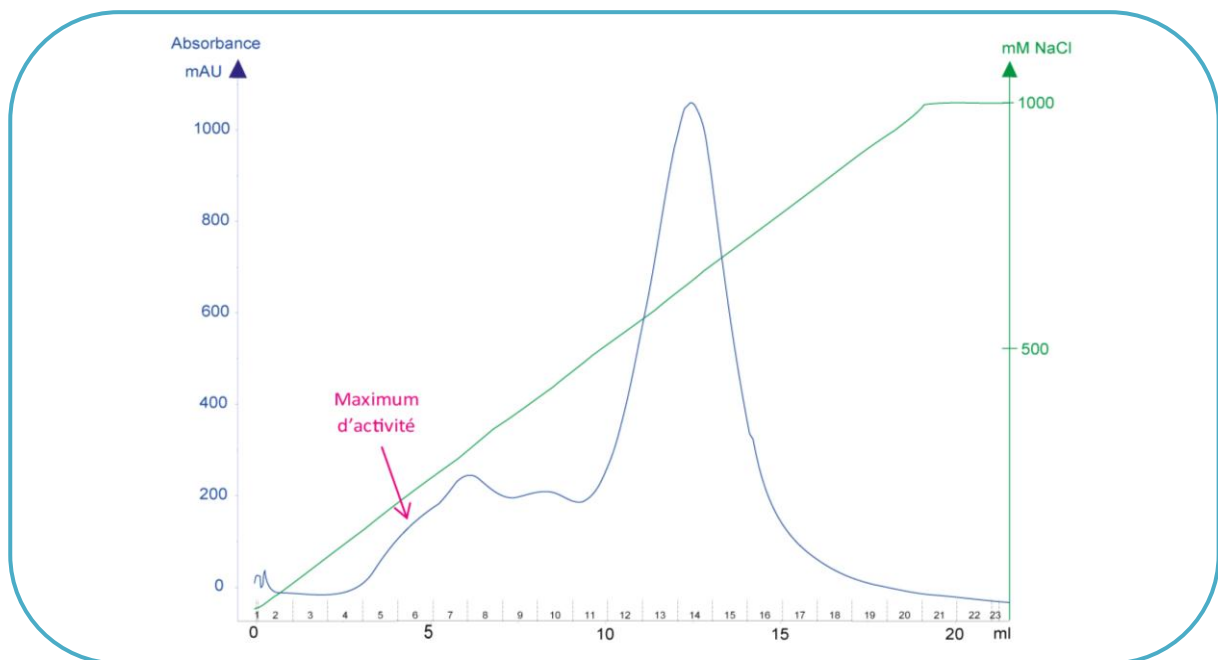


Figure 3-3 : Profil d'élution des protéines du pool issu de la colonne d'héparine sur une Q FF Sépharose

La courbe bleue représente l'absorbance mesurée à 280nm. La courbe verte représente le gradient de concentration en NaCl apporté pour éluer les protéines retenues sur la colonne. La zone présentant l'activité sulfatase est indiquée à l'aide de la flèche.

RESULTATS

A. Purification partielle d'une 4S- κ -carraghénane-sulfatase issue de *P. atlantica*

La purification de l'enzyme a été entreprise à partir du culot bactérien, sur la base des données obtenues sur les tests comparatifs des deux extraits de *P. atlantica* (**Chap I § II**). La production de la 4S- κ -carraghénane-sulfatase a été induite par l'ajout de ι -carraghénane dans le milieu de culture. Le protocole de purification mis en œuvre repose sur différentes étapes de chromatographie. La première consiste à fractionner l'extrait sur une colonne d'affinité, Héparine *Fast Flow*, par élution avec un gradient croissant en NaCl. Cette étape permet d'éliminer la majorité des protéines contenues dans notre extrait. En effet, l'activité sulfatase est éluée entre 400 et 500 mM NaCl, alors que la majorité des protéines élue entre 100 et 300 mM NaCl (Figure 3-2). L'activité n'est pas très forte (280 μ g/ml de sulfate libéré au maximum), cependant elle est présente sur une trentaine de fractions. Ces dernières ont donc été rassemblées pour effectuer la deuxième étape de chromatographie, en exploitant cette fois les propriétés ioniques de l'enzyme. Une colonne échangeuse d'anions forte, Q Sépharose, à nouveau éluée par un gradient de NaCl, conduit au quasi-isolement de la 4S- κ -carraghénane-sulfatase, à la concentration approximative de 160 mM NaCl (Figure 3-3). En effet, seulement deux bandes sont visibles sur le gel d'électrophorèse (Figure 3-4). Ces dernières ont été excisées pour la réalisation d'analyses en spectrométrie de masse.

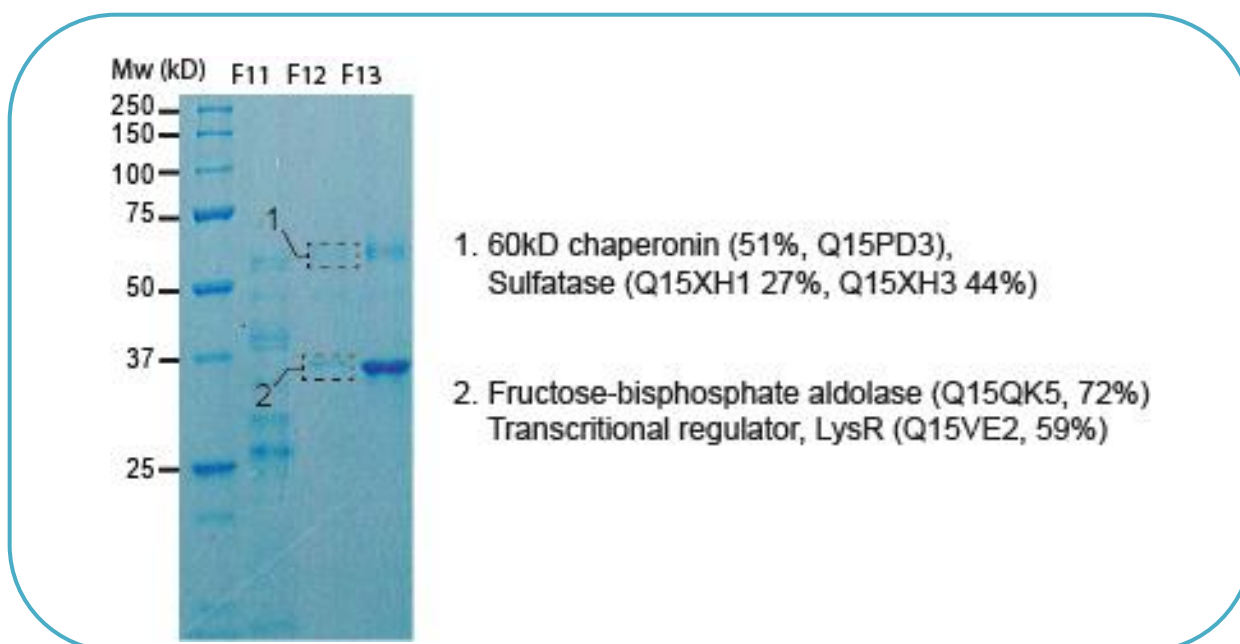


Figure 3-4 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de fractions collectées après la purification sur colonne Q FF

Séquence Q15XH1

```

MRKYLIMLLI LAGCSPVLAD VPKNTAVAAS KAAPTCKPNV LFISIDDLRP ELGSYGSDIA
ITPNLDALAK RGVQFNQAHA QQAIQGPSA SILTGIRPDS LDVHHNYQLF RHKLEDVVTL
PQHFANNGYE AFYVGKIFHH TDKDEALSWN VEPAYHKLPP GLAKPKRYAL KANQKIQQDN
RKAMFAKYGE QAKFGLGSGP AYESADVPDT AYHDGYNTEL AIATMKEQLN NRDKPLFIGF
GMMKPHLPWI APQKYWDLYN PDDITLAEND TAPIDGAAMG LHASFELRTF SNIPKKGPIA
PTLARTLKHA YLANISYVDA QIGKMLAALE EQGILDNTIV IVWSDHGWHL GEMGIWKGAT
NYDIATRVPL IIATPDMKKD IQGQKTDALV ELVDIYPTLS ALAGLNNLPQ WEGQSMVPLL
TNPASWKPA VFSQFPTPAL REWGAYPLRS GMRETYFGPL IKRVEQRIKD QQKDKWDREL
FEQHLMGNAI RTERYRLVAW QDTRLAKNSR PLYLELYDHQ HDPNESINVA KQHPKQVAKL
LKQLYAGWQI SKASLREPSI AGQTR
    
```

Figure 3-5 : Séquence d'acides aminés de la protéine Q15XH1 (Uniprot) de *P. atlantica* T6c

Les séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse sont indiquées en rose. La séquence consensus requise pour la conversion en C α -formylglycine est surlignée en vert, et les acides aminés présents dans la séquence conservée sont surlignés en jaune.

La fraction migrant avec un poids moléculaire apparent de 30 kDa est composée d'une fructose-bisphosphate aldolase (Q15QK5), d'un régulateur de transcription (Q15VE2) mais pas de protéines ressemblant à une sulfatase (Figure 3-4). En revanche, la bande migrant à 60 kDa contient la protéine Q15XH1 (Uniprot) de *P. atlantica* dont le gène (Patl_0891) a été annoté comme une sulfatase (Copeland *et al.*, 2006). Neuf peptides couvrant 27% de la séquence de la protéine ont été identifiés (Figure 3-5). L'enzyme Q15XH1 présente toutes les caractéristiques des sulfatases à Formylglycine : elle contient la séquence consensus de 12 acides aminés (C/S-X-P-S/X-R-XXX-L/X-G/X-R/X) requise pour la conversion de la cystéine en résidu C α -Formylglycine, et les acides aminés présents dans la séquence conservée G-Y/V-X-S/T-XXX-G-K-X-X-H (Figure 3-5). Dans une moindre mesure, d'autres protéines étaient également présentes dans la fraction de 60 kDa, telle que la protéine Q15PD3 correspondant à une chaperonine. Le poids moléculaire de la sulfatase Q15XH1 est de 63 kDa (Protein_ID ABG39417.1 ; Copeland *et al.*, 2006) et concorde avec la taille expérimentale de la bande excisée.

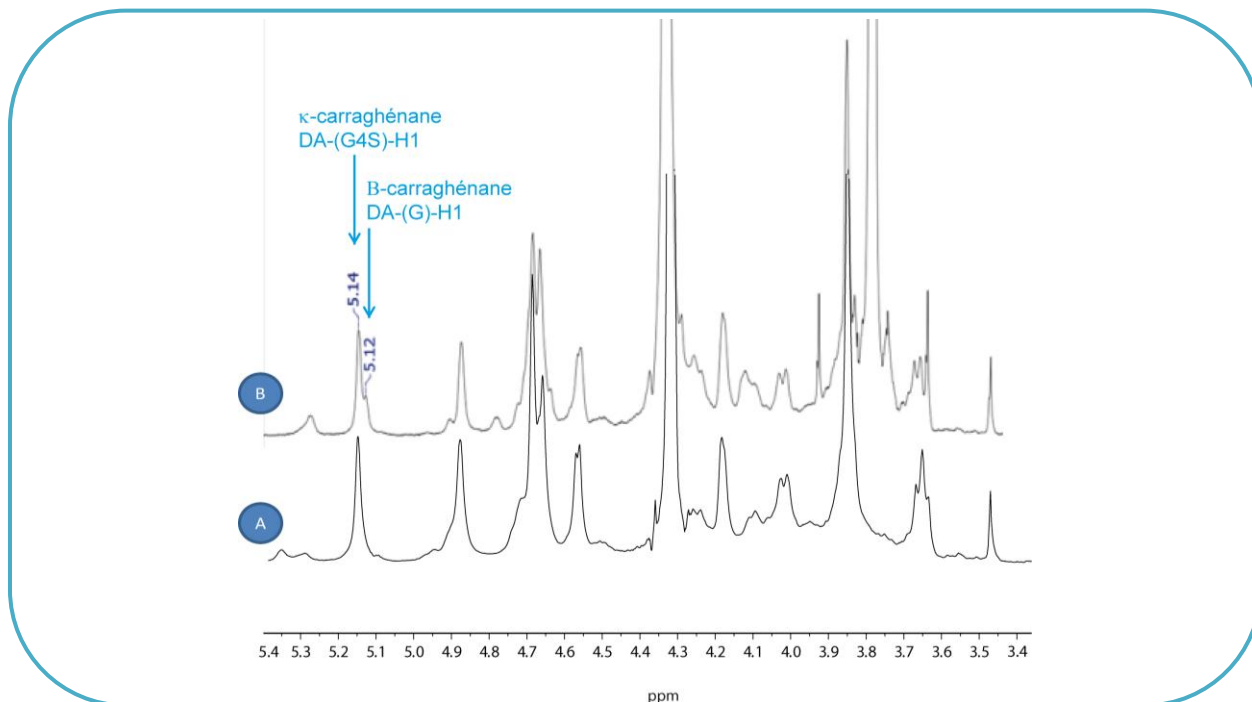


Figure 3-6 : Spectres ¹H-RMN du κ-/μ-carraghénane (A) incubé avec la protéine Q15XH1 purifiée (B)

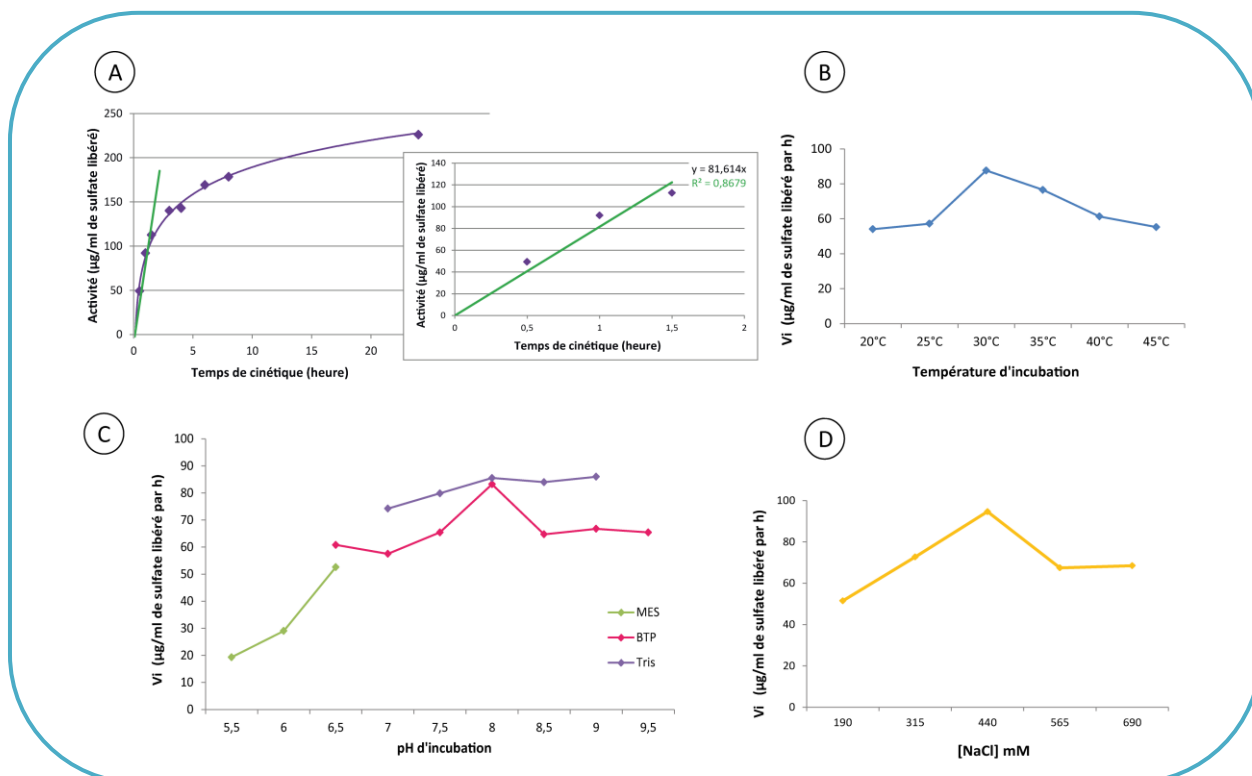


Figure 3-7 : Cinétique de désulfatation du κ-/μ-carraghénane (1%) par la 4S-κ-carraghénane-sulfatase purifiée (A). Test de l'activité 4S-κ-carraghénane-sulfatase en fonction de la température d'incubation (B), du tampon et du pH (C) et de la concentration en NaCl (D)

B. Etude enzymologique de la sulfatase Q15XH1 native

Au cours de ces travaux, le polymère de κ -/ μ -carraghénane a souvent été utilisé en remplacement du κ -carraghénane, car il présente notamment l'avantage d'être moins gélifié en solution. Il est composé approximativement de 90% de motifs κ -carrabioses et de 10% de μ -carrabioses. La désulfatation du κ -/ μ -carraghénane comme celle du κ -carraghénane, par la fraction purifiée de la Q15XH1, conduit à la conversion des unités κ -carrabiose en β -carrabiose (Figure 3-6). En effet, les motifs κ -carrabiose ne présente qu'un seul groupement sulfate par unité disaccharidique, situé en position 4 de l'unité G. Par conséquent, la théorie suggère automatiquement la formation de β -carraghénane par clivage du sulfate. Le spectre RMN ^1H obtenu après incubation confirme cette conversion puisqu'on observe le signal du proton anomérique caractéristique du β -carraghénane à 5,12 ppm, en accord avec la littérature (van de Velde *et al.*, 2004).

La caractérisation des paramètres biochimiques de la sulfatase native a été effectuée avec la fraction contenant les deux bandes sur gel d'électrophorèse. Dans un premier temps, une cinétique de désulfatation du κ -/ μ -carraghénane à 1% (p/v) par la fraction purifiée de la Q15XH1, a été réalisée par suivi chromatographique du sulfate libéré au cours de la réaction (Figure 3-7A). La courbe obtenue montre une croissance linéaire pendant les trois premières heures de l'incubation, puis s'incurve jusqu'à atteindre un plateau. Les paramètres biochimiques de la sulfatase ont été réalisés avec des incubations de 2h car, pour cette durée, l'activité de désulfatation est importante mais se situe toujours dans la partie linéaire de la courbe. Un premier test d'incubation de la sulfatase Q15XH1 en présence de κ -/ μ -carraghénane, réalisé à différentes températures, a permis de révéler la température optimale de l'enzyme. Celle-ci se situe autour de 30°C (Figure 3-7B). Le pH optimal a été déterminé en incubant l'enzyme sur une gamme de pH de 5,5 à 9,5. Les résultats ont permis de situer le pH optimal d'activité de la sulfatase Q15XH1 autour de 8,0 (Figure 3-7C). L'effet de la concentration en NaCl sur l'activité sulfatase a été réalisé en ajoutant aux milieux d'incubation une gamme croissante en NaCl. Une concentration de 450 mM en NaCl, soit la concentration en NaCl à laquelle l'enzyme est éluée de la colonne d'héparine, favorise l'activité de la sulfatase Q15XH1 native (Figure 3-7D). Il est donc nécessaire d'ajouter la

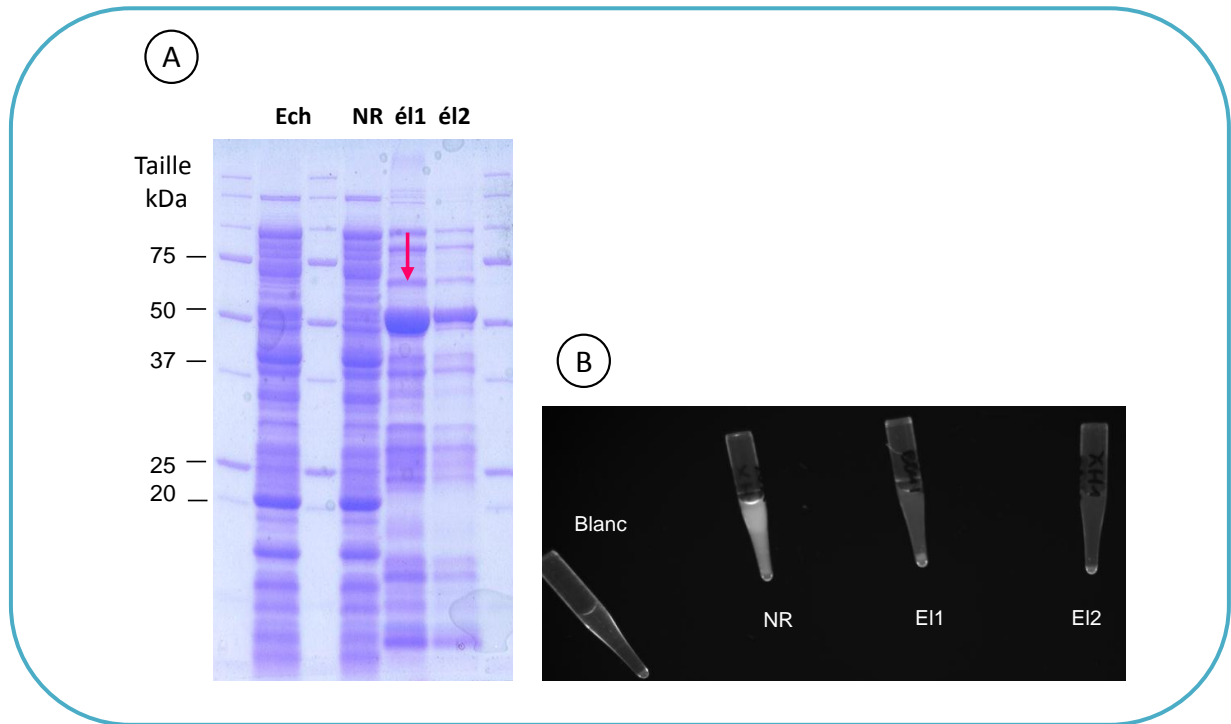


Figure 3-8 : Gel d'électrophorèse de la purification de la sulfatase Q15XH1 (A) et test d'activité sulfatase à la MUF-S sur les fractions correspondantes (B)

Ech : échantillon brut ; NR : non retenu ; é11 : fraction d'élution n°1 ; é12 : fraction d'élution n°2.

| Sulfatase | Polymères de carraghénanes | | | | | |
|-----------|----------------------------|---------|-----------|----------|--------------|-------------|
| | κ | ι | λ | α | κ/μ | ι/ν |
| Q15XH1 | 12 | 0 | 0 | 0 | 29 | 0 |

Tableau 3-1 : Mesure du sulfate libéré (en $\mu\text{g/ml}$) par HPAEC après incubation de la sulfatase Q15XH1 surexprimée en milieu LB, en présence des différents carraghénanes

même concentration de NaCl au substrat pour obtenir une réaction de désulfatation optimale.

L'estimation des paramètres de Michaelis-Menten n'a pas pu être réalisée pour cette enzyme, car nous ne sommes pas parvenus à purifier la sulfatase à l'homogénéité. La présence des autres protéines aurait sans doute faussé les résultats cinétiques et induit des erreurs sur l'estimation de ces paramètres enzymatiques.

C. Surexpression de la sulfatase Q15XH1 de *P. atlantica*

C.1 Expression de la sulfatase Q15XH1 dans *E. coli*

La surexpression de la sulfatase Q15XH1 a été entreprise afin de confirmer son implication directe dans la désulfatation du κ -carraghénane en β -carraghénane, et dans le but d'avoir une enzyme pure en quantité pour la caractérisation biochimique. Le gène a été cloné dans le plasmide pFO4 et exprimé dans *E. coli* BL21 (DE3) selon les conditions décrites par Groisillier *et al.* (2010). Des cultures de petit volume réalisées en milieu Graffinity dans un premier temps, ont permis de faire des premiers tests. La purification sur colonne His-spin Trap a montré une bande abondante autour de 55 kDa dans la première fraction d'élution (Figure 3-8A), proche du poids moléculaire de 63 kDa de la sulfatase Q15XH1. Le test contre le substrat synthétique méthylumbelliféryl-sulfate (MUF-S) réalisé sur les différentes fractions d'élution s'est révélé positif essentiellement dans la fraction non retenue et légèrement dans la première fraction d'élution (Figure 3-8B). La MUF-S n'étant pas spécifique, un criblage à petite échelle contre les 6 carraghénanes usuels (κ -, ι -, λ -, α -, κ -/ μ - et ι -/ ν -carraghénanes) a ensuite été réalisé. Il s'est révélé négatif pour l'ensemble des substrats.

C.2 Optimisations des conditions de cultures dans *E. coli*

Les conditions de surexpression de la sulfatase Q15XH1 ont été optimisées dans *E. coli*. Des extraits obtenus à partir d'une culture réalisée en milieu LB (en remplacement du

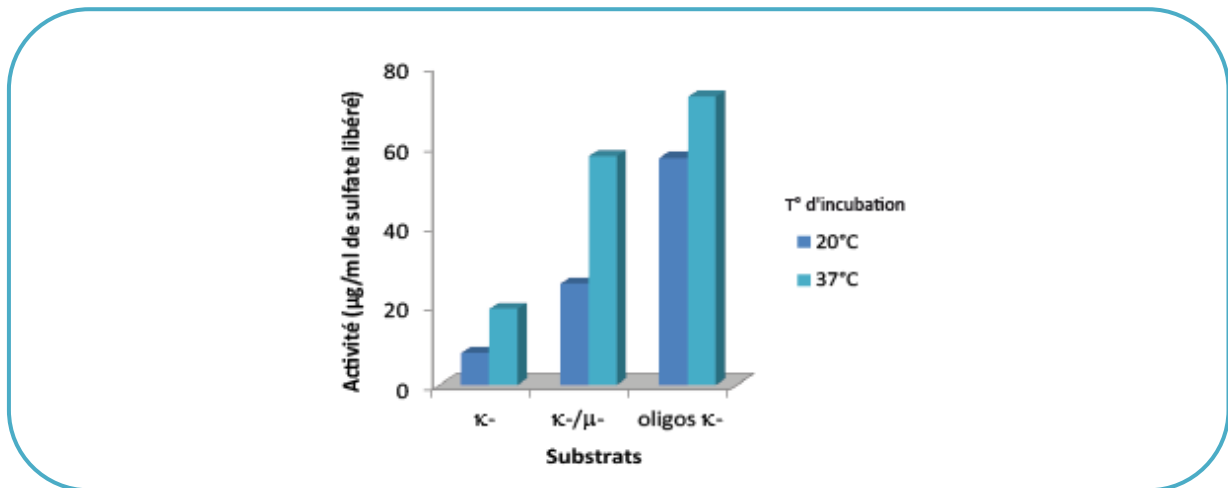


Figure 3-9 : Optimisation de l'activité de la sulfatase Q15XH1 en fonction du substrat et de la température d'induction

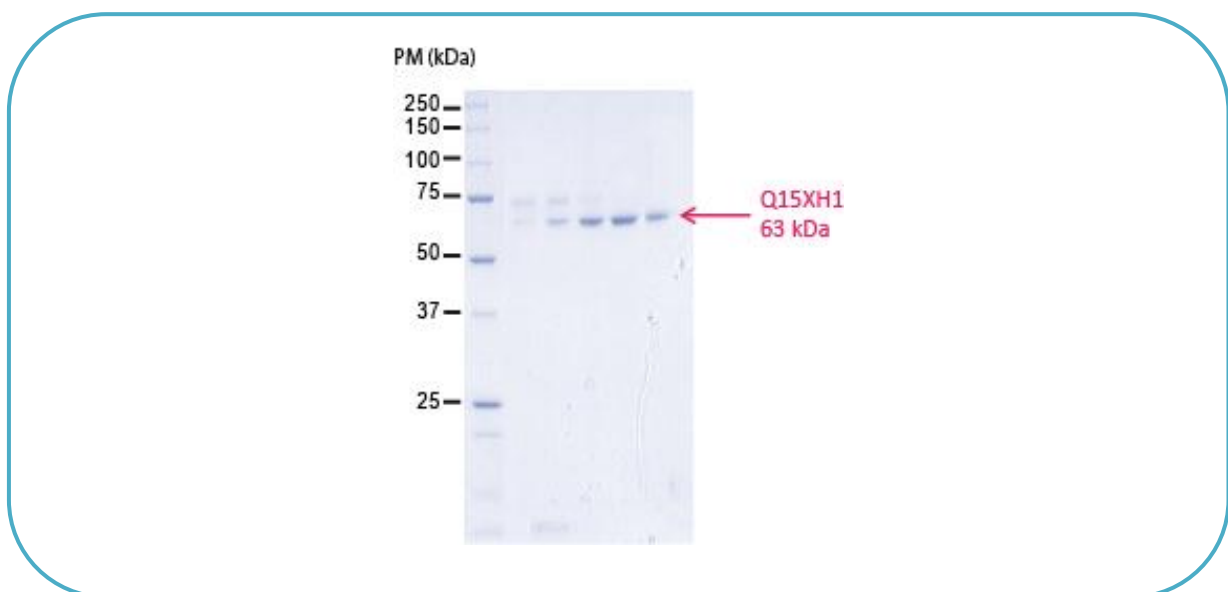


Figure 3-10 : Gel SDS de la purification de la sulfatase Q15XH1 surexprimée

milieu Graffinity utilisé précédemment) ont été testés contre les différentes structures de carraghénanes (Tableau 3-1). Bien que faibles, les activités de désulfatation obtenues sur le κ - et le κ -/ μ -carraghénane suggèrent l'hydrolyse du groupement sulfate des unités κ -carrabioses.

Quelques résultats d'optimisation obtenus pour la sulfatase Q15XH3 ont été étendus pour la sulfatase Q15XH1. Ainsi, la concentration en IPTG a été amenée à 2 mM et l'induction effectuée sur 19h. Le lysat bactérien contenant la sulfatase a été préparé dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5 avec 200 mM NaCl pour favoriser la solubilité de la protéine. Dans ces conditions, il a ainsi été possible d'augmenter significativement l'activité de désulfatation. Les tests réalisés par la suite ont été focalisés sur des substrats porteurs d'unités κ -carrabioses.

La température de l'induction a montré davantage d'incidence sur la désulfatation dans le cas de la sulfatase Q15XH1 que pour la Q15XH3. Une induction réalisée à 37°C au lieu de 20°C dans les conditions classiques, permet en effet d'augmenter les activités de désulfatation, quel que soit le degré de polymérisation du substrat (Figure 3-9). L'activité est la plus abondante sur les oligo- κ -carraghénanes, suivie par l'hybride κ -/ μ -carraghénane et le κ -carraghénane. Ceci peut s'expliquer par l'accessibilité de l'enzyme au substrat. Toutefois, nous avons constaté que la réactivité du κ -carraghénane pouvait être différente en fonction des lots de carraghénanes et des distributeurs commerciaux (CP-Kelco, Danisco,...). Il est donc important de bien caractériser au préalable les substrats utilisés.

La sulfatase Q15XH1 surexprimée dans *E. coli* a été purifiée sur colonne de nickel toujours dans le but d'augmenter la détection de l'activité. Cette étape ne fut pas suffisante et a donc été suivie par une étape de purification sur une colonne d'exclusion de taille afin d'obtenir la protéine pure (Figure 3-10). Bien que l'imidazole ait été éliminé par le biais de cette étape, la sulfatase purifiée s'est révélée inactive.

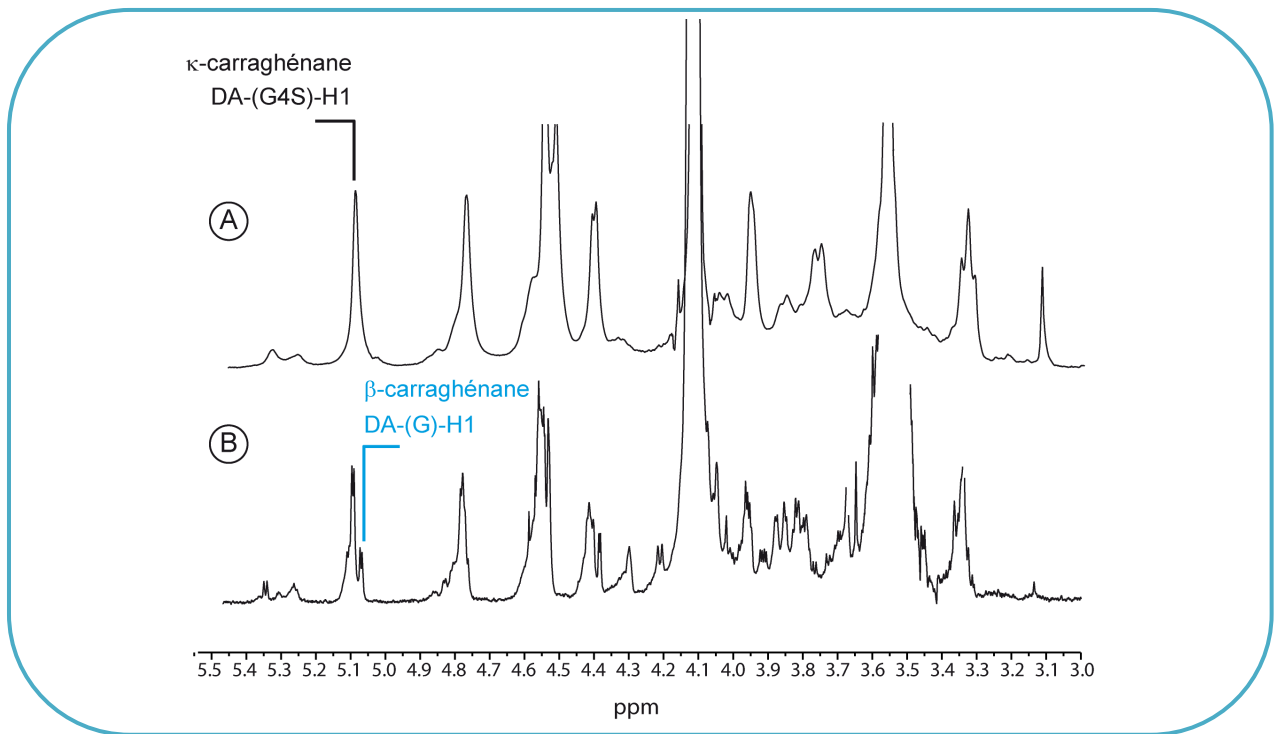


Figure 3-11 : Spectres ^1H -RMN du κ - μ -carraghénane (A) incubé avec la protéine Q15XH1 surexprimée (B)

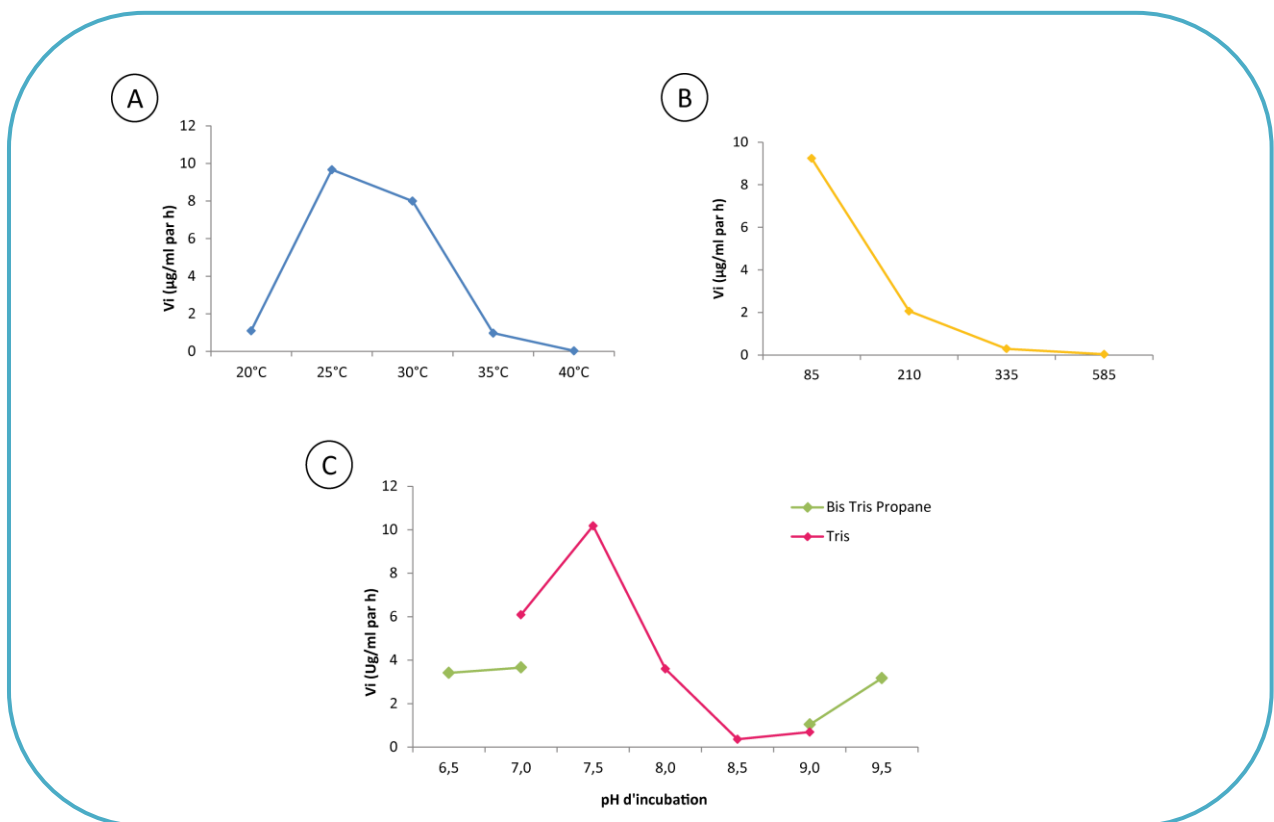


Figure 3-12 : Activité de la sulfatase Q15XH1 surexprimée en fonction de la température d'incubation (A), du tampon et du pH (B) et de la concentration en NaCl (C)

C.3 Caractérisation biochimique de la sulfatase Q15XH1 surexprimée

Les premières analyses RMN réalisées sur du carraghénane incubé avec les sulfatases surexprimées montrèrent des spectres de très mauvaise qualité où il était même difficile de voir les signaux anomériques caractéristiques des carraghénanes. En effet, n'ayant pas d'activité après la purification de la sulfatase surexprimée, nous avons tenté de travailler avec l'extrait brut d'*E. coli* contenant notre sulfatase. Mais les sucres d'*E. coli* étaient plus abondants que le carraghénane, masquant les signaux de ce dernier. Pour cette raison, nous avons mis en place un protocole de préparation de l'extrait bactérien impliquant deux étapes de filtration entre 30 et 100 kDa.

En utilisant l'extrait ainsi préparé, la conversion des unités κ -carrabiose a pu être confirmée par des analyses RMN ^1H à partir du polymère de κ -/ μ -carraghénane. Ainsi, on a pu observer l'apparition d'un pic avoisinant celui du κ -carraghénane, autour de 5,15 ppm (Figure 3-11). Ce nouveau signal correspond à la conversion des unités κ -carrabiose en β -carrabiose. Cependant, on observe également un dédoublement des signaux, synonyme de l'apparition d'un couplage entre les différents protons, et révélant par conséquent une dégradation de notre polymère. Ce phénomène pourrait être dû à une dégradation causée par les lyophilisations répétées du substrat lors des échanges D_2O nécessaires aux analyses RMN.

Une fois que l'activité de désulfatation des unités κ -carrabiose fut détectée de façon significative, une caractérisation biochimique de l'enzyme surexprimée a été entreprise. La température optimale a été déterminée à 25°C, et le pH optimal à 7,5 (Figure 3-12A et B). La concentration en NaCl la plus favorable à l'activité a été relevée à 85 mM (Figure 3-12C), bien loin de l'optimum de la sulfatase native évalué à 450 mM.

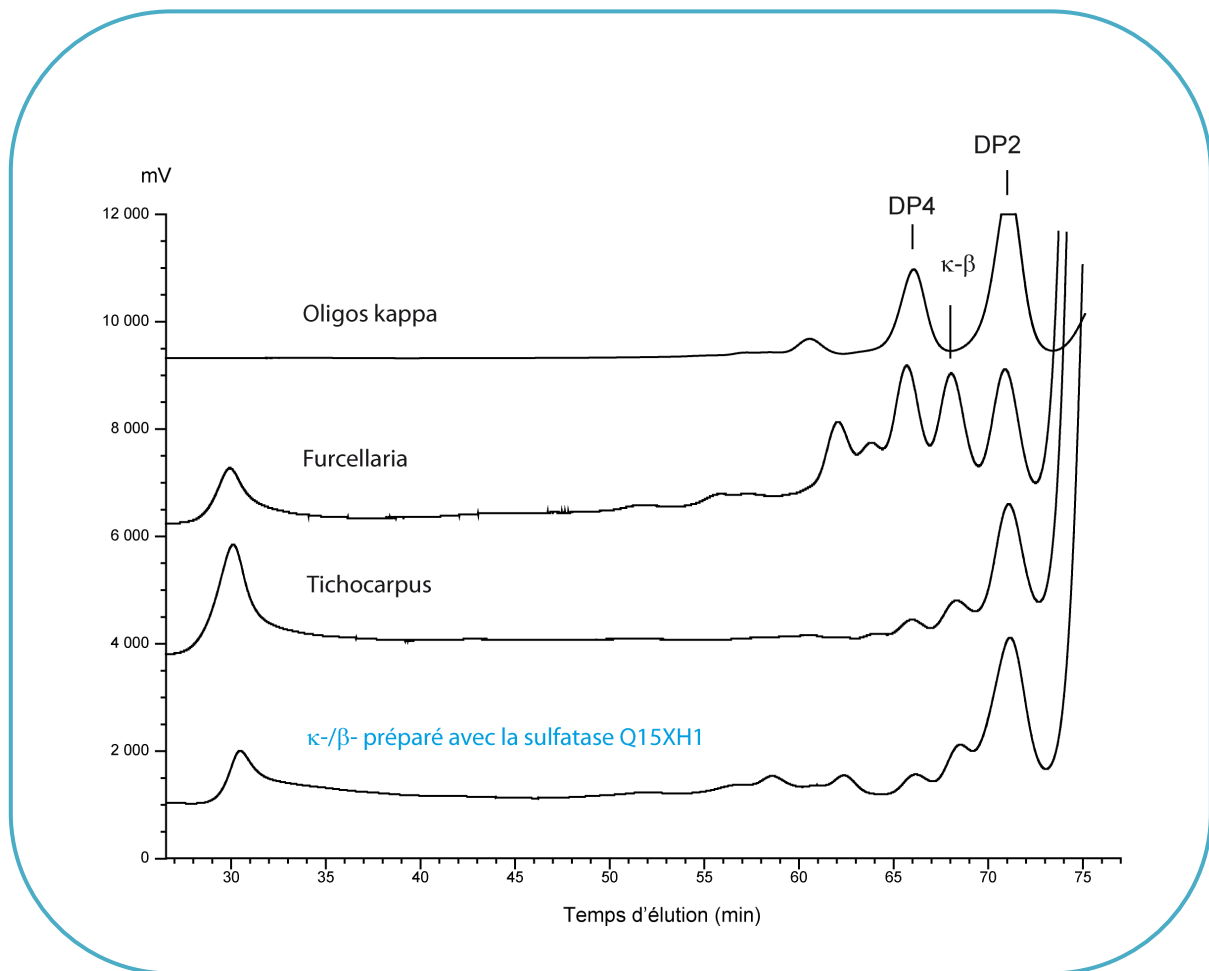


Figure 3-13 : Oligosaccharides produits par la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* à partir de l'hybride κ -/ β -carraghénane obtenu par la sulfatase Q15XH1, et des hybrides κ -/ β -carraghénane naturels issu des algues *Furcellaria lumbricalis* et *Tichocarpus crinitus*

D. Détermination du mode d'action de la sulfatase Q15XH1

La détermination du mode d'action de la sulfatase Q15XH1 a été entreprise avec la sulfatase native en raison des faibles activités de désulfatation obtenues avec la sulfatase surexprimée. La stratégie de cette étude repose sur l'analyse comparative des oligosaccharides produits, après dégradation par une κ -carraghénase, à partir de l'hybride κ -/ β -carraghénane préparé à l'aide de la sulfatase, avec les hybrides κ -/ β -carraghénane extraits des algues *Furcellaria lumbricalis* et de *Tichocarpus crinitus*. Ces deux derniers polymères ont déjà fait l'objet d'analyses auparavant, démontrant une structure en bloc pour l'hybride κ -/ β -carraghénane extrait de *Tichocarpus crinitus* et une répartition aléatoire des motifs dans le cas du furcellaran de *Furcellaria lumbricalis* (Correc *et al.*, 2012). Nous les avons donc utilisés comme structures de référence pour déterminer la distribution des motifs κ - et β -carrabiose au sein de l'hybride préparé par la sulfatase Q15XH1.

Nous avons préparé un hybride de κ -/ β -carraghénane constitué d'environ 30% d'unités β -carrabiose. Il a été dégradé, comme ceux de *F. lumbricalis* et de *T. crinitus* par la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*. Les produits de dégradation ont été comparés par chromatographie d'exclusion de taille HPSEC. Ainsi, on a pu observer que l'hybride préparé avec la sulfatase présentait un profil similaire à celui de *T. crinitus* (Figure 3-13). En effet, pour ces deux hybrides, on constate une proportion importante de motifs κ -carrabiose (DP2) et une faible quantité d'unités tétracarrabioses hybrides κ -/ β -carraghénane (DP4). Ces oligosaccharides hybrides sont plus abondants dans la dégradation du furcellaran, révélant une distribution aléatoire des différents motifs le long de la chaîne polymérique. Pour cette raison, l'hybride préparé par la sulfatase Q15XH1 semble présenter davantage une distribution en bloc, tout comme l'hybride issu de *T. crinitus*. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution car, bien que les hybrides de *T. crinitus* et celui préparé par la sulfatase présentent approximativement le même ratio d'unités κ - et β -carrabioses, l'hybride de *F. lumbricalis* est composé, quant à lui, d'un ratio de 50/50. Or, le ratio des polymères influence probablement les profils de dégradation observés.

| | Q15XH3 | Q15XH1 |
|-------------------|---------------------|----------------------|
| Famille | Formylglycine | Formylglycine |
| Motif désulfaté | ι -carrabiose | κ -carrabiose |
| Poids moléculaire | 55 kDa | 63 kDa |
| T° optimale | 35°C | 30°C |
| pH optimal | 7,5 | 8 |
| [NaCl] optimale | 25 mM | 440 mM |

Tableau 3-2 : Comparaison des deux carraghénane-sulfatases identifiées chez *P. atlantica*

DISCUSSION

A. Identification de la sulfatase Q15XH1 de *P. atlantica*

Bien que nous ne soyons pas parvenus à obtenir une protéine pure, le protocole mis en place pour la purification de la 4S- κ -carraghénane-sulfatase couplé aux données de génomiques, a permis d'identifier la protéine Q15XH1, à l'origine de l'activité de désulfatation. L'analyse en spectrométrie de masse de la bande d'une taille approximative de 60 kDa a effectivement montré neuf peptides couvrant 27% de la séquence de la protéine Q15XH1. Le gène (Patl_0891) de cette protéine d'un poids moléculaire de 63 kDa, a été annoté comme une sulfatase (Copeland *et al.*, 2006), et présente dans sa séquence, comme la plupart des sulfatases répertoriées dans le génome de *P. atlantica*, la signature de la modification post-traductionnelle des sulfatases à formylglycines. La surexpression de la protéine Q15XH1 a permis de valider que son gène codait pour une 4S- κ -carraghénane-sulfatase. Par l'identification de cette enzyme, nous avons ainsi mis en évidence une deuxième carraghénane-sulfatase active sur du polymère chez *P. atlantica* (Préchoux & Helbert, 2012 – Brevet EP 12/306384) Elle se distingue des précédentes, identifiées chez *P. atlantica* (Préchoux *et al.*, 2012) et *P. carrageenovora* (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2009) puisqu'elle désulfate les unités κ -carrabioses et non les unités ι -carrabioses.

La sulfatase Q15XH1 native a été biochimiquement caractérisée. Elle a montré des optima d'activité différents de la sulfatase Q15XH3, issue également de *P. atlantica*. On souligne notamment que la concentration en NaCl favorisant l'activité de désulfatation est presque vingt fois supérieure dans le cas de la sulfatase Q15XH1 (Tableau 3-2).

B. Mode d'action de la sulfatase Q15XH1 de *P. atlantica*

Le furcellaran désigne le carraghénane extrait de l'algue rouge *Furcellaria lumbricalis* (Danish moss). Ce carraghénane est composé d'unités κ - et β -carrabiose distribuées aléatoirement le long de la chaîne du polysaccharide. Cette distribution se distingue d'une organisation plutôt en bloc des unités κ - et β -carrabiose observée dans le cas des κ -/ β -carraghénanes d'*Eucheuma gelatinae* et de *Tichocarpus crinitus* (Greer & Yaphe, 1984 ; Correc *et al.*, 2012). Le furcellaran permet de former des gels qui présentent des propriétés de rigidité proches de celle du κ -carraghénane mais en raison du plus faible taux de sulfatation, les concentrations salines nécessaires à la gélification sont plus faibles (Bjerre-Petersen *et al.* 1973 ; Zhang *et al.* 1994). Ce carraghénane est donc très intéressant d'un point de vue industriel. La forte exploitation de *Furcellaria lumbricalis* pour extraire ce carraghénane a entraîné une diminution importante de la ressource. Suivant leur mode d'action, les sulfatases préparant des hybrides κ -/ β -carraghénane pourraient donc être une alternative à ce problème, en produisant de façon contrôlée des analogues du furcellaran. L'hybride κ -/ β -carraghénane extrait de *Tichocarpus crinitus*, en raison d'une distribution en bloc des unités κ - et β -carrabioses dans la chaîne polymérique, forme quant à lui des gels moins rigides (Barabanova *et al.*, 2008).

Les premières analyses comparatives des oligosaccharides produits par l'hybride de la sulfatase Q15XH1, avec ceux issus des hybrides naturels de *F. lumbricalis* et *T. crinitus*, semble montrer que la structure de notre hybride se rapproche davantage de celle de l'hybride extrait de *Tichocarpus crinitus* que du furcellaran. La distribution des motifs κ - et β -carrabioses se rapprocherait donc d'une structure en bloc. On peut donc supposer que la sulfatase Q15XH1 agirait selon un mode endo-processif. Toutefois, notre polymère ne contient que 30% d'unités β -carrabioses et la production d'oligo- κ -carraghénanes peut donc être majoritaire pour cette raison.

C. Surexpression de la sulfatase Q15XH1 de *P. atlantica*

Comme nous l'avons déjà évoqué, la surexpression de la protéine identifiée par la purification, est indispensable pour confirmer sa fonction de désulfatation, et son action sur le ι -carraghénane. Toujours dans des perspectives d'utilisations biotechnologiques de l'enzyme, la surexpression de celle-ci est nécessaire pour son obtention en abondance.

Afin d'obtenir une activité de désulfatation significative avec la sulfatase Q15XH1 surexprimée, de nombreux tests furent réalisés, et notamment des essais de co-expression avec les enzymes de maturation FGE et AnSME (résultats non présentés). Ces derniers avaient pour but d'augmenter la maturation de la sulfatase en améliorant la modification post-traductionnelle insuffisante avec *E. coli*. Ces résultats ne furent malheureusement pas très concluants. Par conséquent, il fut décidé de plutôt optimiser la détection de l'activité à partir de l'extrait brut, et de continuer ainsi à travailler sur la surexpression de l'enzyme sans la co-expression des protéines de maturation dans *E. coli*. Plusieurs milieux de culture ont été testés pour cultiver *E. coli* : le milieu Graffinity, le milieu LB et le milieu ZYP. C'est avec un extrait issu d'une culture réalisée en milieu LB que l'activité de la sulfatase Q15XH1 recombinante a pu être détectée sur le κ - et le κ - μ -carraghénane. Certains tests d'optimisation réalisés avec la sulfatase Q15XH3 (et Q15XH4, que nous évoquerons dans le chapitre suivant), n'ont pas été reproduits avec la sulfatase Q15XH1. Nous avons en effet supposé que les conclusions obtenues pour les sulfatases Q15XH3 et Q15XH4 pouvaient être étendues aux autres carraghénane-sulfatases appartenant à la famille des sulfatases à formylglycine de *P. atlantica*. Ces tests portent sur l'influence de la concentration en IPTG et le temps d'induction et ont été décrit dans le chapitre précédent (Chap 2 - § C.2). En revanche, la température d'induction a été testée pour l'ensemble des sulfatases.

Grâce à l'optimisation, la libération de sulfate mesurée par chromatographie est devenue significative. Pour autant, la confirmation du motif désulfaté par la sulfatase Q15XH1 par analyse RMN ^1H fut une difficulté supplémentaire. D'une part, la RMN étant moins sensible que la chromatographie, il faut obtenir entre 150 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de sulfate libéré par la réaction pour espérer visualiser la conversion du carraghénane sur le spectre. D'autre part, comme la purification rendait inactive la sulfatase, il a fallu trouver une solution pour

travailler avec l'extrait brut de *E. coli* qui masquait le carraghénane en RMN. Ce problème fut résolu en filtrant l'extrait bactérien entre 30 et 100 kDa, pour enlever notamment les sucres d'*E. coli*. Cependant, une activité de dégradation est visible sur les spectres RMN. Cette dernière pourrait provenir d'oligosaccharides présents dans le substrat qui seraient davantage convertis que les unités κ -carrabioses du polymère ou simplement des lyophilisations répétées lors des échanges D₂O.

La surexpression de la sulfatase Q15XH1 a permis de mettre en évidence la capacité de notre enzyme à désulfater les unités κ -carrabiose quel que soit le degré de polymérisation du substrat. Notre sulfatase est effectivement capable d'éliminer les groupements sulfate du κ -carraghénane mais aussi ceux des oligo- κ -carraghénanes. La meilleure réactivité de la sulfatase recombinante sur des oligosaccharides que sur le polymère de κ -carraghénane pourrait être due à une altération de l'enzyme lors de la surexpression, conduisant à une difficulté à reconnaître ou à fixer le polymère. La présence d'un TAG sur la protéine recombinante peut aussi jouer sur les activités détectées.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La purification de la sulfatase Q15XH1 nous a permis d'obtenir des pistes sur le mécanisme de biodégradation du κ -carraghénane par la bactérie *P. atlantica*. Ainsi, il semblerait que le polymère de κ -carraghénane soit d'abord désulfaté en β -carraghénane sous l'action de la sulfatase Q15XH1. Le polymère de β -carraghénane pourrait ensuite être dépolymérisé par la présence d'une β -carraghénase. En effet, les analyses RMN de conversion du κ -/ μ -carraghénane par la 4S- κ -carraghénane-sulfatase native purifiée, montrent une désulfatation du polymère, sans trace d'une activité carraghénolytique. La sulfatase Q15XH1 est donc capable d'agir sur le polysaccharide. Cependant, au cours des travaux effectués sur la sulfatase recombinante, nous avons également mis en évidence sa capacité à désulfater les oligosaccharides. Il semblerait donc qu'elle puisse accepter aussi bien du polymère que des oligosaccharides comme substrat, de la même manière que la sulfatase Q15XH3 (décrite au Chap II). Néanmoins, en raison de son action sur du polymère, nous avons démontré qu'il existait un autre schéma de biodégradation possible du κ -carraghénane que celui étudié chez *P. carrageenovora* (McLean & Williamson, 1979a, 1979b et 1981). Dans ce nouveau schéma possible, le polymère serait désulfaté avant d'être dépolymérisé.

Bien qu'il faille prendre ces résultats avec précaution, notre sulfatase semble être endo-processive et conduire à une distribution en bloc des unités β -carrabiose au sein de la chaîne polymérique. La sulfatase Q15XH1 permettrait par conséquent de produire des analogues des hybrides κ -/ β -carraghénanes rencontrés chez *Tichocarpus crinitus*. Cette information mérite que l'on s'y intéresse de plus près pour être confirmée en raison des enjeux industriels.

Suite à la purification des sulfatases Q15XH3 et Q15XH1 à partir de la bactérie *P. atlantica*, nous nous sommes intéressés à leur environnement génomique. Nous avons ainsi pu constater qu'elles se situaient en fait dans le même cluster de gènes. L'environnement génomique de nos sulfatases semble converger vers une implication des diverses protéines dans la dégradation du carraghénane. En effet, les gènes de la Q15XH3 et de la Q15XH1 sont localisés dans un cluster contenant d'autres sulfatases, deux protéines inconnues, mais surtout

plusieurs gènes du cycle citrique (oxydation des sucres) et du métabolisme du D-galactose sont clairement identifiés (Figure 4-1). Sur la base de ces observations, on peut donc émettre l'hypothèse que l'ensemble des sulfatases présentes dans ce cluster seraient actives sur du carraghénane, permettant ainsi sa biodégradation. Cette piste est extrêmement intéressante pour la quête de nouvelles carraghénane-sulfatases ou même de carraghénases. En effet, des clusters similaires pourraient être présents chez d'autres bactéries marines. Pour valider notre hypothèse, la surexpression des autres sulfatases se devait d'être entreprise.

RESULTATS

Chapitre IV

Surexpression des sulfatases

Q15XH4 et Q15XG7

issues du cluster impliqué dans

la biodégradation des carraghénanes

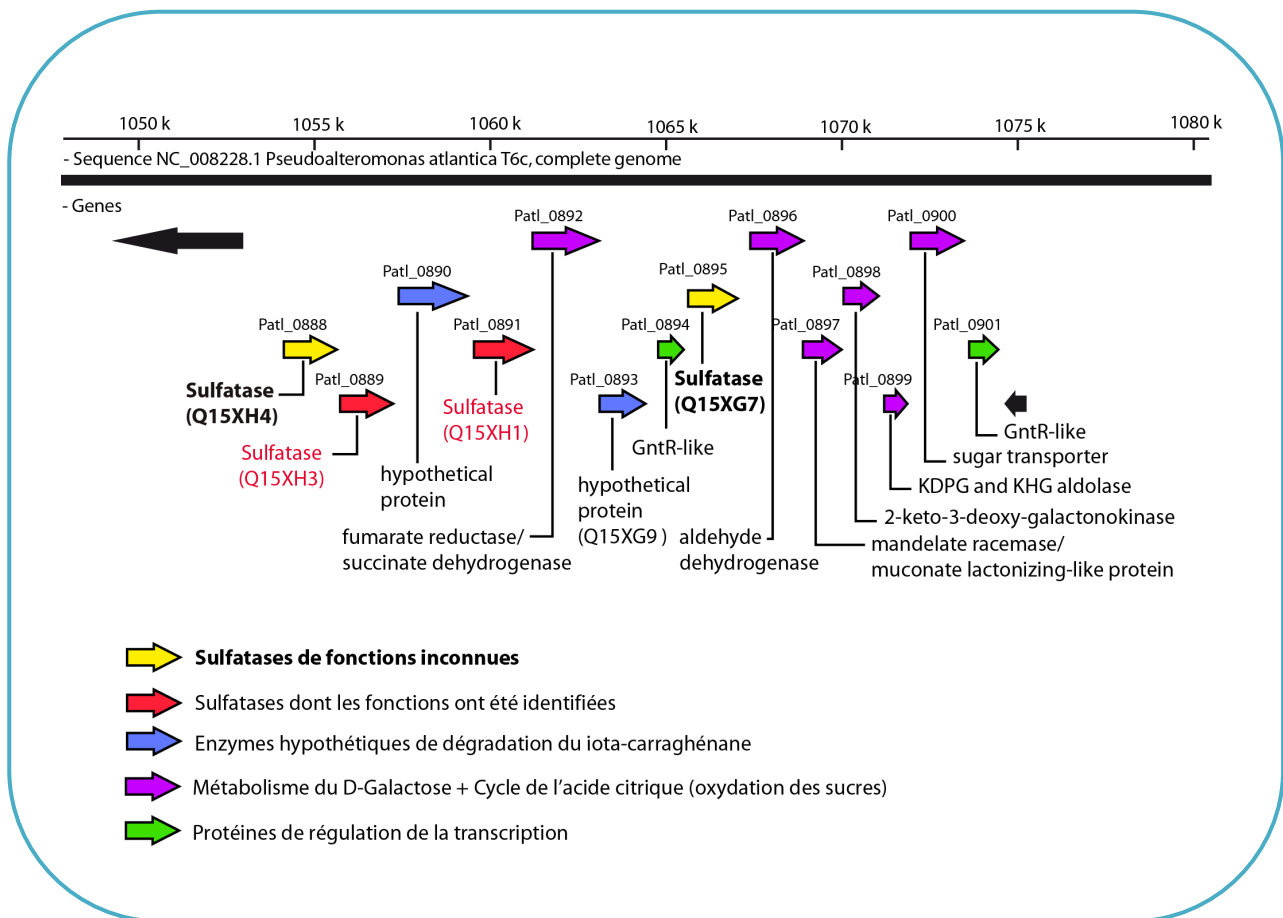


Figure 4-1 : Cluster de gènes de *P. atlantica* hypothétiquement impliqué dans la dégradation des carraghénanes

CHAPITRE IV :

SUREXPRESSION DES SULFATASES Q15XH4 ET Q15XG7 ISSUES DU CLUSTER IMPLIQUÉ DANS LA BIODÉGRADATION DES CARRAGHÉNANES

INTRODUCTION

La distribution des gènes au sein des génomes d'organismes procaryotes n'est pas toujours aléatoire. En effet, il arrive souvent que l'ensemble des gènes impliqués dans une voie catabolique s'organise de façon groupée et colinéaire, et dans ce cas on parle d'un cluster de gènes. Si en plus ces gènes sont co-régulés par un même facteur de transcription, on parle d'un opéron.

L'isolement et la caractérisation des 4S- ι -carraghénane-sulfatase (*cf* Chap II) et 4S- κ -carraghénane-sulfatase (*cf* Chap III), ont conduit à l'identification de ces protéines par spectrométrie de masse. L'expression hétérologue des gènes codant pour ces deux sulfatases, la Q15XH3 et la Q15XH1 ont permis d'affirmer sans ambiguïté leur fonction de carraghénane-sulfatase et leur spécificité respective. L'observation de l'environnement génomique de ces deux protéines dans le génome, révélant que les gènes sont colinéaires et localisés dans une même région chromosomique de *P. atlantica*, a validé l'implication de nos protéines dans la dégradation des carraghénanes. Ce constat nous a permis d'émettre l'hypothèse que le cluster de gènes dont elles font partie (Figure 4-1) pourrait être un opéron (*cf* Chap III). Cela aurait pour conséquence que les autres gènes du cluster soient également impliqués dans le catabolisme des carraghénanes. En effet, le cluster de gènes ainsi découvert inclut deux sulfatases putatives supplémentaires, et présente également des protéines potentiellement impliquées dans le métabolisme du galactose. On y retrouve ainsi toutes les protéines nécessaires à la dégradation progressive d'un sucre.

Séquence Q15XH4

```
MKLTFFIAGM ATALLCHSSL AANEPEQETV QTKQPNVLVL MFDDMRFDTF SYRGGPVPTP
NIDALANDGT RFDNAMTTTG LCSPSRAALF TGRWGHKTGL DDNVGLYHSH VDELSEEEGG
VIRRAADTGY HVGYVGKWHL GPQGPALRGA DFMWGKEHSQ ARHSRPYVPY EKQAKMAQYN
RGERDENGK HEYYQTLPGT YETSHTAENV DMGQKMLREA AKMDEPFFGV ISFEQPHPPY
RVPEPYASMF DPKTVKLPAN HAVKRQFKPM AQDEDWWPWH DVGHMTDMDW RKSRTFYGA
IAMIDHAVGD IIKTAKDVGM YDDLTIIVLG DQGSMLGEHN LYDKGPYAYD ELMRMPLIIR
APNVEPRIVN KQVSMLDIAP TISEMMSLEP DGDVDGRSLV NLMEQGDIAK KGRVDQALYA
YEWYNGGWFQ IRALRTPEMK FVWNPGDNRD ELYDLKNDPI EVNNLIKDKK YTKQLRHMVQ
LMEDELVRIK DPSIEKFRYQ VAGYRSKEGT SQAYNVD
```

Séquence Q15XG7

```
MKSVFHRVVA ALSISVACTS LSYAKQPNIV FLFSDDAGYA DFGFQGSETM KTPNLDQLAS
EGVRFQTQGYV SDSTCGPSRA GIMTGRYQOK FGYYEINVPG YMSEHSAIKG AEMGIPLDEV
TMGDYMKSLG YRTAFYGKWHL LGGTDELHPM HRGFDEFYGF RGGDRSYWAY EVNAPERKSA
VFTDKKLEHG IDQFQEHEGY LTDVLAEKAN QFIEKAPDKP FFIFLSFNAV HTPMEATPED
LAKFPQLKGG RKEVAAMTLA LDRASGAVLN KLKELGLEDD TLVVFSNDNG GPTDKNASSN
YPLAGTKSNF LEGGIRVPFL VKWPAKLAAG KVYDKPVSTL DLLPTFFKAG GGEEVMSELD
GVDLMPYITG QNNKAPHESM YWKKETRAAI RQGDWKLRLR PDRPAELYNL ANDIGEQHNL
AAQEPERVKQ MYKDFFSWEM TLERPLWLLK RQFEEYDLNR MDKYRVPKRL E
```

Figure 4-2 : Séquence en acides aminés des protéines Q15XH4 et Q15XG7 (Uniprot) de *P. atlantica T6c*

Les séquences consensus requises pour la conversion en C α -formylglycine sont surlignées en vert, et les acides aminés présents dans les séquences conservées sont surlignés en jaune.

Dans ce contexte, nous avons donc entrepris la surexpression des deux autres sulfatases du cluster, la Q15XH4 et la Q15XG7 afin d'affirmer ou d'invalider leur activité sur une structure de carraghénane. En étudiant la séquence de ces deux protéines, nous avons pu confirmer qu'elles appartiennent toutes deux à la famille des sulfatases à formylglycine, comme toutes les sulfatases répertoriées chez *P. atlantica*. Elles contiennent en effet, la séquence consensus de 12 acides aminés (C/S-X-P-S/X-R-XXX-L/X-G/X-R/X) requise pour la conversion de la cystéine en résidu C α -formylglycine, et les acides aminés présents dans la séquence conservée G-Y/V-X-S/T-XXX-G-K-X-X-H (Figure 4-2). En appliquant les mêmes stratégies de surexpression que pour les sulfatases Q15XH3 et Q15XH1, nous nous sommes mis en quête des fonctions de sulfatases Q15XH4 et Q15XG7 recombinantes en nous focalisant directement sur les diverses structures des carraghénanes. Nous avons tenté d'optimiser les conditions d'expression des sulfatases actives afin de valider leur substrat. Les polymères ont été testés dans premier temps, mais suite à l'observation dans le cas des sulfatases Q15XH1 et Q15XH3 de leur capacité à désulfater également les oligosaccharides, et parfois avec une meilleure réactivité, les tests ont ensuite été menés sur les oligosaccharides.

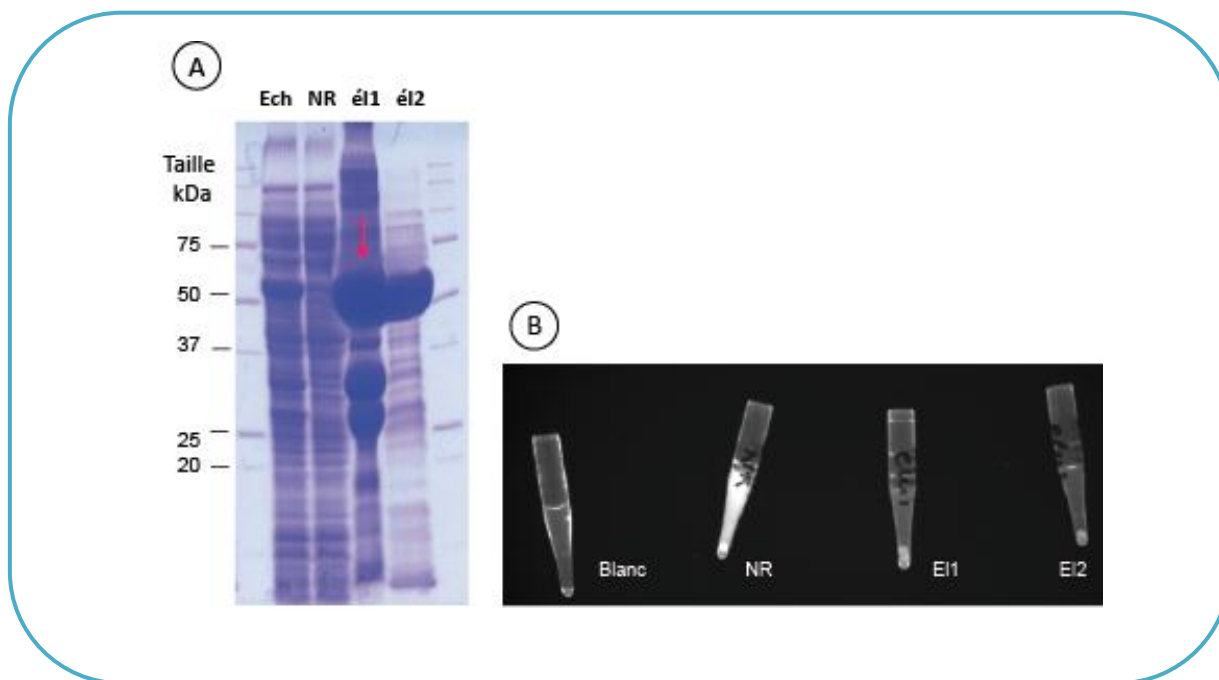


Figure 4-3 : Gel d'électrophorèse de la purification de la sulfatase Q15XH4 (A) et test d'activité sulfatase à la MUF-S sur les fractions correspondantes (B)

Ech : échantillon brut ; NR : non retenu ; é1 : fraction d'élution n°1 ; é2 : fraction d'élution n°2.

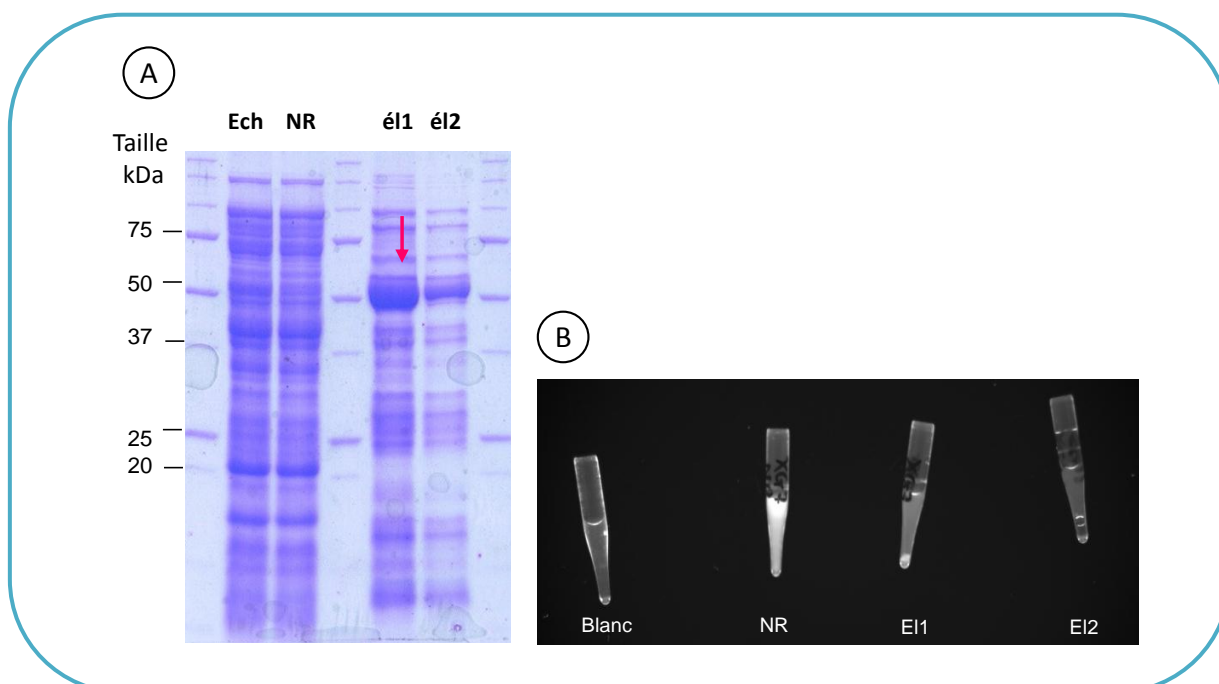


Figure 4-4 : Gel d'électrophorèse de la purification de la sulfatase Q15XG7 (A) et test d'activité sulfatase à la MUF-S sur les fractions correspondantes (B)

Ech : échantillon brut ; NR : non retenu ; é1 : fraction d'élution n°1 ; é2 : fraction d'élution n°2.

RESULTATS

A. Surexpression des sulfatases Q15XH4 et Q15XG7

La surexpression des sulfatases Q15XH4 et Q15XG7 a été entreprise afin de confirmer leur implication supposée dans la désulfatation des carraghénanes. Les gènes ont été clonés dans le plasmide PfO4 puis insérés dans des souches d'expression d'*E. coli*, BL21 (DE3) pour la sulfatase Q15XH4 et Origami pour la Q15XG7, selon les conditions décrites par [Groisillier et al. \(2010\)](#). Des cultures de petit volume réalisées en milieu Graffinity dans un premier temps, ont permis de faire des premiers tests. La purification sur colonne His-spin Trap a montré une bande extrêmement abondante dans l'élution autour de 55 kDa pour la sulfatase Q15XH4 (Figure 4-3) dont le poids moléculaire théorique est de 58 kDa. Une bande significative mais toutefois moins importante fut obtenue pour la sulfatase Q15XG7 de 53 kDa théoriquement (Figure 4-4). Les tests de fluorescence contre la méthylumbelliférylsulfate (MUF-S), réalisés sur le lysat bactérien, se sont révélés positifs pour les deux sulfatases mais essentiellement dans la fraction non-retenue (Figures 4-3 et 4-4).

B. Test d'activité de la sulfatase Q15XH4

B.1 Recherche des conditions optimales d'expression de Q15XH4

Pour cribler une éventuelle activité de la sulfatase Q15XH4, une démarche identique à celle effectuée pour les précédentes sulfatases a été menée. Ainsi, la MUF-S n'étant pas spécifique, un petit criblage contre les 6 carraghénanes usuels (κ -, ι -, λ -, α -, κ - μ - et ι - ν -carraghénanes) a été réalisé sur l'extrait de *E. coli* porteur de la sulfatase Q15XH4 et issu de la culture de petit volume en milieu Graffinity. Ce premier test s'est avéré positif sur le ι -carraghénane uniquement, avec une activité de 27 $\mu\text{g/ml}$ de sulfate libéré. Ce résultat, bien que faible, mais toutefois plus important que celui obtenu pour la sulfatase Q15XH3, a permis

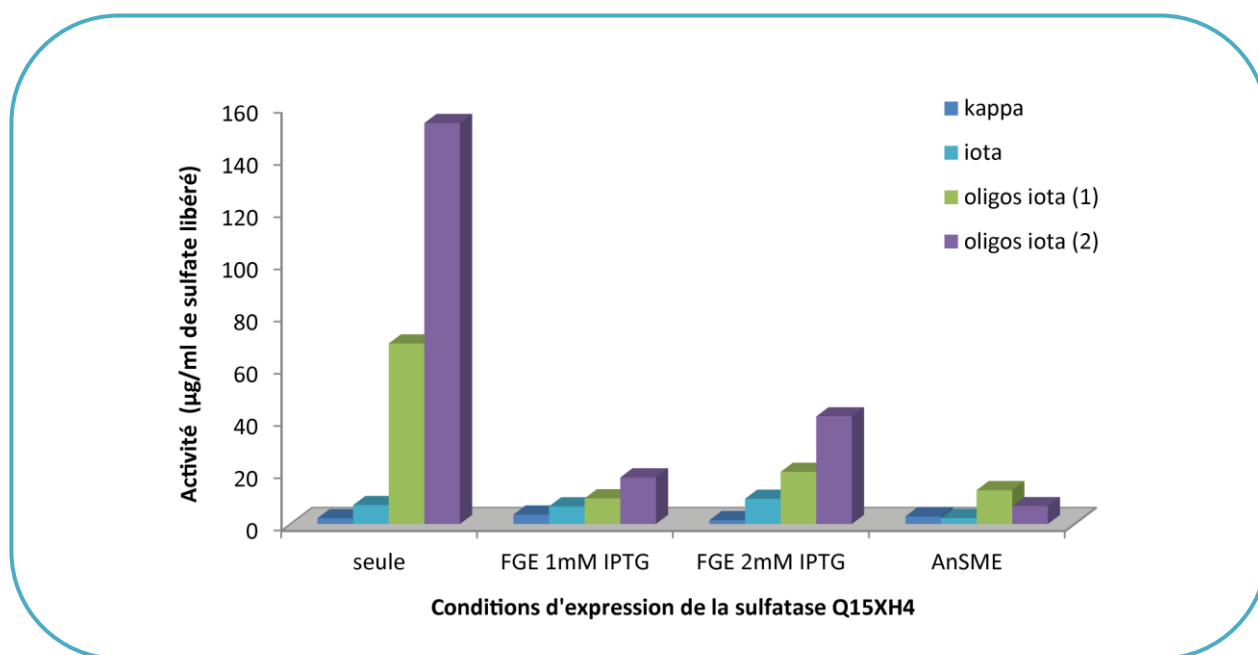


Figure 4-5 : Test d'activité de la sulfatase Q15XH4 sur le κ -, le ι - et 2 lots d'oligos ι -carraghénane en fonction de différentes conditions d'expression en milieu LB

Seule : Sulfatase surexprimée dans *E. coli* - culture induite avec 2 mM IPTG

FGE 1mM IPTG : Sulfatase co-exprimée avec la FGE - culture induite avec 1 mM IPTG

FGE 2mM IPTG : Sulfatase co-exprimée avec la FGE - culture induite avec 2 mM IPTG

AnSME : Sulfatase co-exprimée avec l'AnSME - culture induite avec 2 mM IPTG

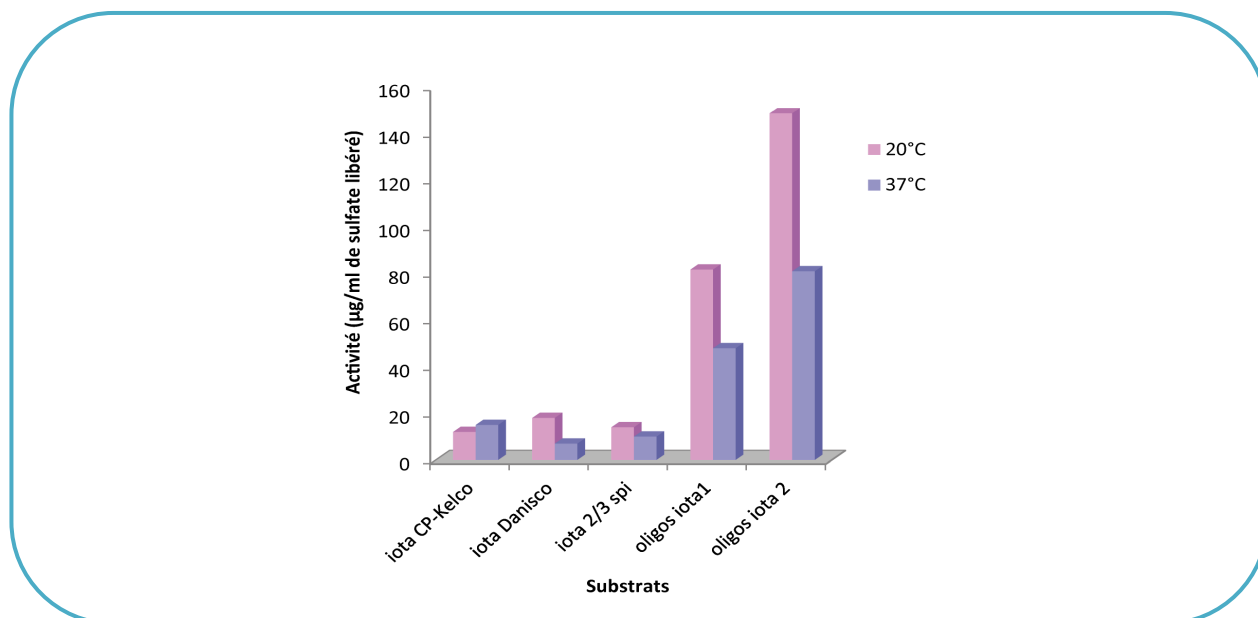


Figure 4-6 : Test d'activité de la sulfatase Q15XH4 sur différents ι -carraghénanes commerciaux et deux lots différents d'oligos ι -carraghénane, en fonction de la température d'induction à 2 mM IPTG.

d'orienter nos tests et de limiter le nombre de substrat pour les expérimentations suivantes. En effet, comme nous cherchions à obtenir une protéine active, nous avons dès lors, tenté d'augmenter l'activité de désulfatation pour la valider, par obtention d'une conversion visible du substrat en RMN.

Différentes conditions d'expression de la sulfatase Q15XH4 ont été testées en parallèle afin de déterminer laquelle permettait une meilleure détection de l'activité. Nous avons joué sur de nombreux paramètres, tels que le milieu de culture, la concentration en IPTG, la température d'induction, les enzymes de maturation FGE et AnSME... Seuls deux tests résumant un peu nos diverses tentatives seront présentés ici pour plus de clarté.

Quatre cultures ont été réalisées en milieu LB dans les mêmes conditions de culture et d'induction (excepté la concentration en IPTG) (Figure 4-5). Les extraits ont tous été incubés contre le κ -carraghénane, utilisé comme témoin négatif, le ι -carraghénane et deux lots d'oligo- ι -carraghénanes différents. On a pu observer que pour des conditions de culture similaires, la sulfatase exprimée seule, c'est-à-dire sans enzyme de maturation, permet une désulfatation nettement plus importante des oligo- ι -carraghénanes. La désulfatation du polymère est en revanche légèrement supérieure lorsque la sulfatase est co-exprimée avec la FGE et la culture induite avec 2 mM d'IPTG mais cette augmentation est peu significative. On a également noté que, quelle que soit la condition d'expression, les oligo-carraghénanes étaient bien plus désulfatés que le polymère.

Après avoir retenu le milieu LB comme le plus favorable à l'expression de l'enzyme, et estimé la concentration en IPTG à 2 mM comme étant la plus propice, différents substrats porteurs d'unités ι -carrabioses furent testés contre des cultures induites à 20 et 37°C. Nous avons ainsi évalué que, contrairement à la sulfatase Q15XH1 (*cf* Chap III), la température d'induction la plus bénéfique à la désulfatation était celle à 20°C (Figure 4-6). On a pu confirmer à nouveau que, dans le cas de cette sulfatase recombinante, les oligosaccharides présentaient une meilleure réactivité face à l'enzyme que le polymère.

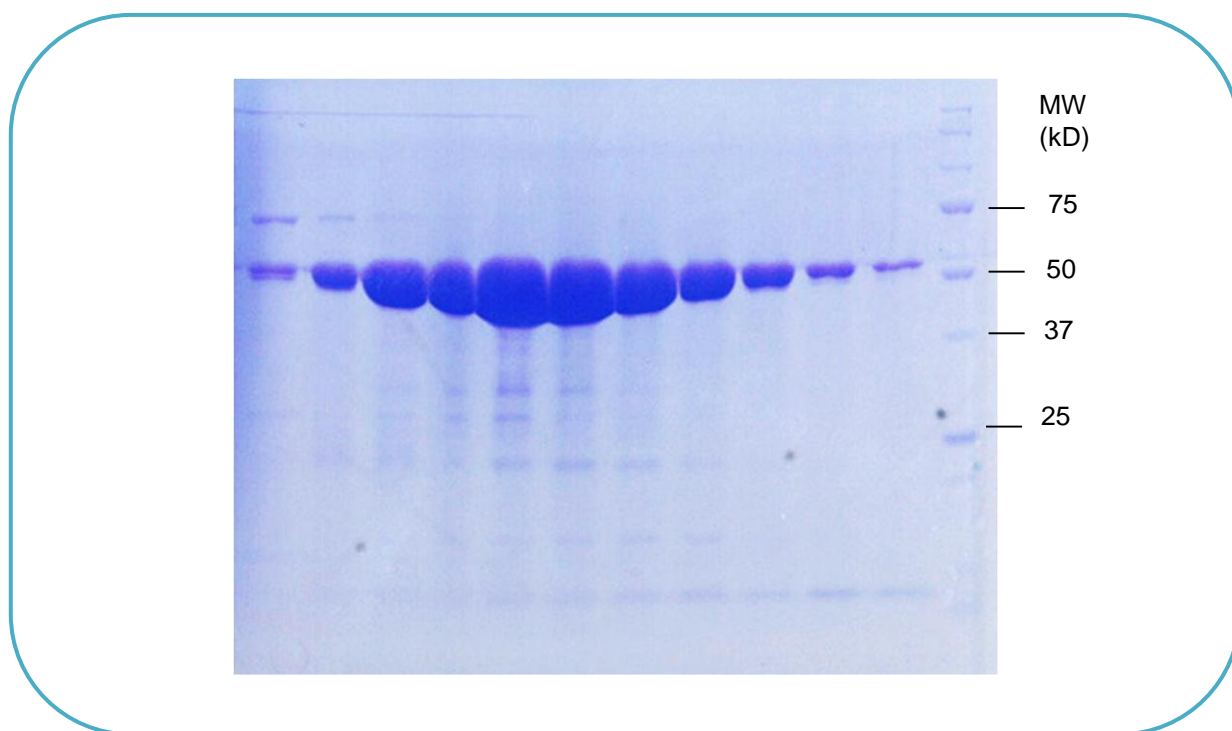


Figure 4-7 : Gels SDS de la sulfatase Q15XH4 après purification sur une colonne de nickel HisPrep FF 16/10

Les conditions optimales à l'activité de désulfatation ont ainsi été déterminées. La sulfatase Q15XH4 recombinante nécessite d'être cultivée en milieu LB, que l'induction soit réalisée avec 2 mM d'IPTG à 20°C pendant 20h environ, et que l'activité soit testée sur des oligosaccharides pour une meilleure détection.

Un essai de purification de la sulfatase Q15XH4 a été conduit sur une colonne de nickel par un gradient croissant en imidazole. Le gel d'électrophorèse obtenu avec les fractions issues de cette purification a montré la sulfatase isolée en quantité (Figure 4-7). En revanche, les tests d'activité sulfatase sur ces fractions se sont tous révélés négatifs sur le ι -carraghénane, tout comme dans le cas de la sulfatase Q15XH3 (*cf* Chap II).

B.2 Caractérisation fonctionnelle de Q15XH4

Une fois les conditions optimales à la détection de l'activité déterminées, nous avons pu obtenir des libérations de sulfate de l'ordre de 200 à 300 $\mu\text{g/ml}$ par mesure en HPAEC. Nous avons alors cherché à confirmer la désulfatation des unités ι -carrabioses par des analyses RMN. Les incubations furent réalisées sur les oligo- ι -carraghénanes, et avec l'extrait d'*E. coli* brut filtré entre 30 et 100 kDa, pour que le carraghénane soit majoritaire face aux sucres d'*E. coli*. Malgré des mesures de désulfatation significatives en HPAEC, nous ne sommes pas parvenus à visualiser la conversion des oligosaccharides par analyse RMN. En effet, nous avons pu mettre en évidence que le déplacement des signaux que nous observions était dû à la quantité de sel extrêmement importante dans nos échantillons

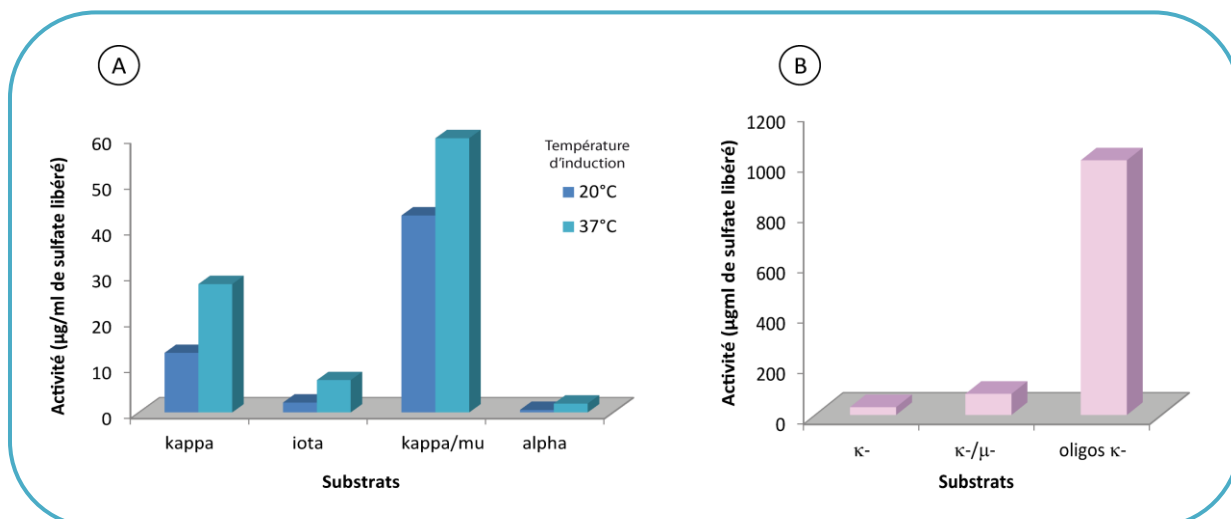


Figure 4-8 : Activité de la sulfatase Q15XG7 sur différents carraghénanes en fonction de la température d'induction (A) et sur différents substrats composés d'unités κ -carrabioses : κ -carraghénane, hybride κ - μ -carraghénane et oligo- κ -carraghénanes (B)

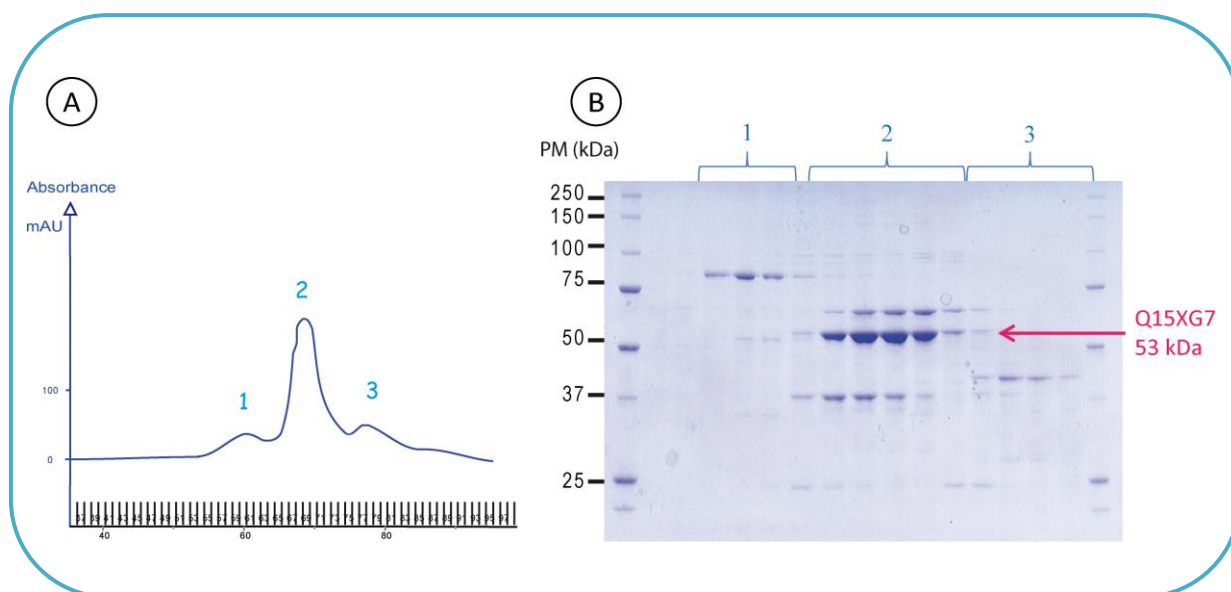


Figure 4-9 : Profil d'élution (A) et gel d'électrophorèse (B) de la purification sur colonne d'exclusion de taille de l'extrait d'*E. coli* contenant de la sulfatase Q15XG7 surexprimée, après une 1^{ère} étape sur colonne de nickel

C. Test d'activité de la sulfatase Q15XG7

C.1 Recherche des conditions optimales d'expression de Q15XG7

L'extrait contenant la protéine surexprimée Q15XG7, testé contre la MUF-S (§ I), a ensuite été criblé contre les 6 carraghénanes usuels mais aucune activité n'a été détectée.

Lors d'un premier criblage réalisé avec l'ensemble des sulfatases du cluster co-exprimées avec l'enzyme de maturation FGE, et cultivées en milieu LB, nous avons pu constater une activité qui se démarquait nettement des autres par son importance. Il s'agissait de la désulfatation du κ -carraghénane avec la sulfatase Q15XG7. Ce test nous avait ainsi donné une première idée du substrat de cette enzyme.

L'influence de la température d'induction a ensuite été testée en incubant les extraits issus de cultures réalisées en milieu LB, et induites à 20 et 37°C sur différents polymères de carraghénanes (Figure 4-8A). Nous avons observé des activités de désulfatation significatives sur le κ - et le κ -/ μ -carraghénane appuyant fortement les résultats du criblage précédent et suggérant un retrait du groupement sulfate en position 4 de l'unité G des unités κ -carrabiose.

La purification de la sulfatase Q15XG7 a été entreprise. Une première étape sur colonne de nickel a conduit à l'obtention d'un pic unique élué à 180 mM d'imidazole approximativement. Les protéines de ce pic ont ensuite été purifiées sur une chromatographie d'exclusion de taille, Superdex 200. Le chromatogramme résultant a montré un profil avec trois pics (Figure 4-9A), dont un pic majoritaire dans lequel une bande plus abondante corrèle à la taille de la sulfatase Q15XG7 (Figure 4-9B). La protéine n'est cependant pas pure après cette deuxième étape. L'activité de désulfatation a été testée avec les fractions possédant la sulfatase Q15XG7 sur les polymères de κ -, et κ -/ μ -carraghénane ainsi que sur les oligo- κ -carraghénanes. De légères activités ont, pour la première fois après purification de nos sulfatases surexprimées, pu être observées, de l'ordre de 20 à 30 μ g/ml de sulfate libéré.

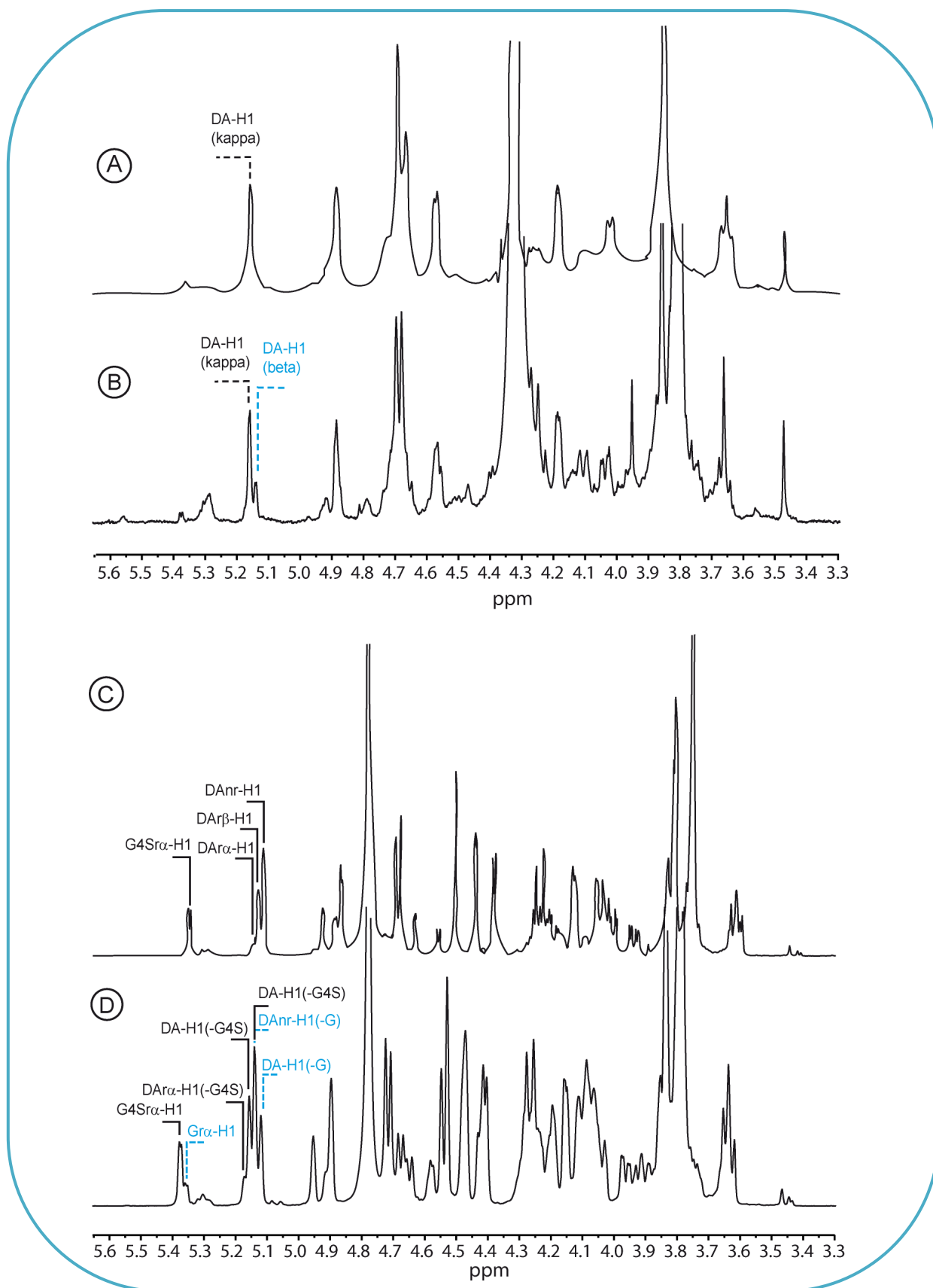


Figure 4-10 : Spectres RMN ^1H du κ - μ -carragénane (A) incubé avec la sulfatase Q15XG7 (B) et des oligo- κ -carragénanes (C) incubés avec la sulfatase Q15XG7

L'utilisation de l'extrait brut dévoilant de meilleures activités de désulfatation, les conditions optimales ont alors été déterminées pour cet extrait. La sulfatase Q15XG7 recombinante nécessite d'être cultivée en milieu LB, que l'induction soit réalisée avec 2 mM d'IPTG à 37°C pendant 20h environ. Une fois ces conditions retenues, l'extrait d'*E. coli* porteur de la sulfatase Q15XG7 a été filtré entre 30 et 100 kDa et incubé en présence de plusieurs substrats composés d'unités κ -carrabioses. Les activités sur les polymères ont été retrouvées, mais surtout nous avons mis en évidence une réactivité extrêmement forte sur les oligos κ -carraghénanes avec plus de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de sulfate libéré (Figure 4-8B). Nous n'avons jamais observé une telle désulfatation avec une sulfatase surexprimée.

C.2 Caractérisation fonctionnelle de Q15XG7 :

Une nouvelle 4S- κ -carraghénane-sulfatase

C.2.1 Confirmation de la fonction de la sulfatase Q15XG7 par RMN ^1H

La conversion des unités κ -carrabioses a pu être visualisée par des analyses RMN ^1H en utilisant l'extrait d'*E. coli* filtré entre 30 et 100 kDa. Ainsi, après incubation de l'extrait de la Q15XG7 en présence du polymère de κ - μ -carraghénane, on a pu observer l'apparition du signal du proton anomérique des unités β -carrabioses à 5,14 ppm (Figure 4-10B). Après incubation de l'extrait sur un mélange d'oligo- κ -carraghénanes, on peut voir de nouveaux signaux correspondant à l'unité G désulfatée (Figure 4-10B). En effet, un premier signal à 5,37 ppm, correspondant à l'unité G du proton anomérique des oligosaccharides d'anomérie α , apparaît attendant au signal du motif sulfaté du κ -carraghénane. Dans le massif à 5,15 ppm, on observe l'apparition deux signaux des protons anomériques de l'unité anhydrogalactose du côté réducteur et non réducteur légèrement plus blindés dû à la perte du groupement sulfate sur l'unité G. Ces signaux révèlent la conversion d'unités κ -carrabioses en unités β -carrabioses. On note que les déplacements chimiques obtenus diffèrent légèrement de ceux de la littérature car nous avons beaucoup de sel, ce qui affecte le champ magnétique local.

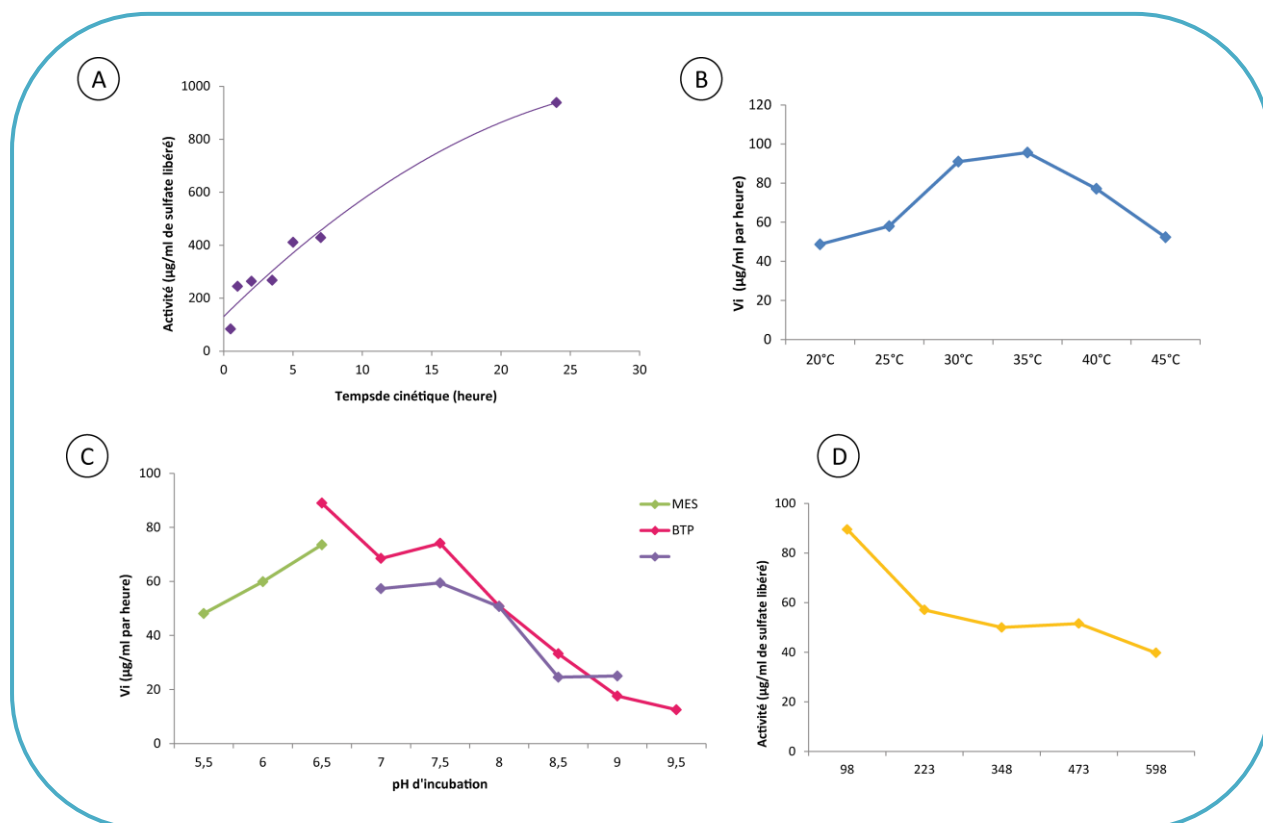


Figure 4-11 : Cinétique de désulfatation des oligo- κ -carraghénanes par la sulfatase surexprimée Q15XG7 (A). Activité de la sulfatase Q15XG7 surexprimée en fonction de la température d'incubation (B), du tampon et du pH (C) et de la concentration en NaCl (D)

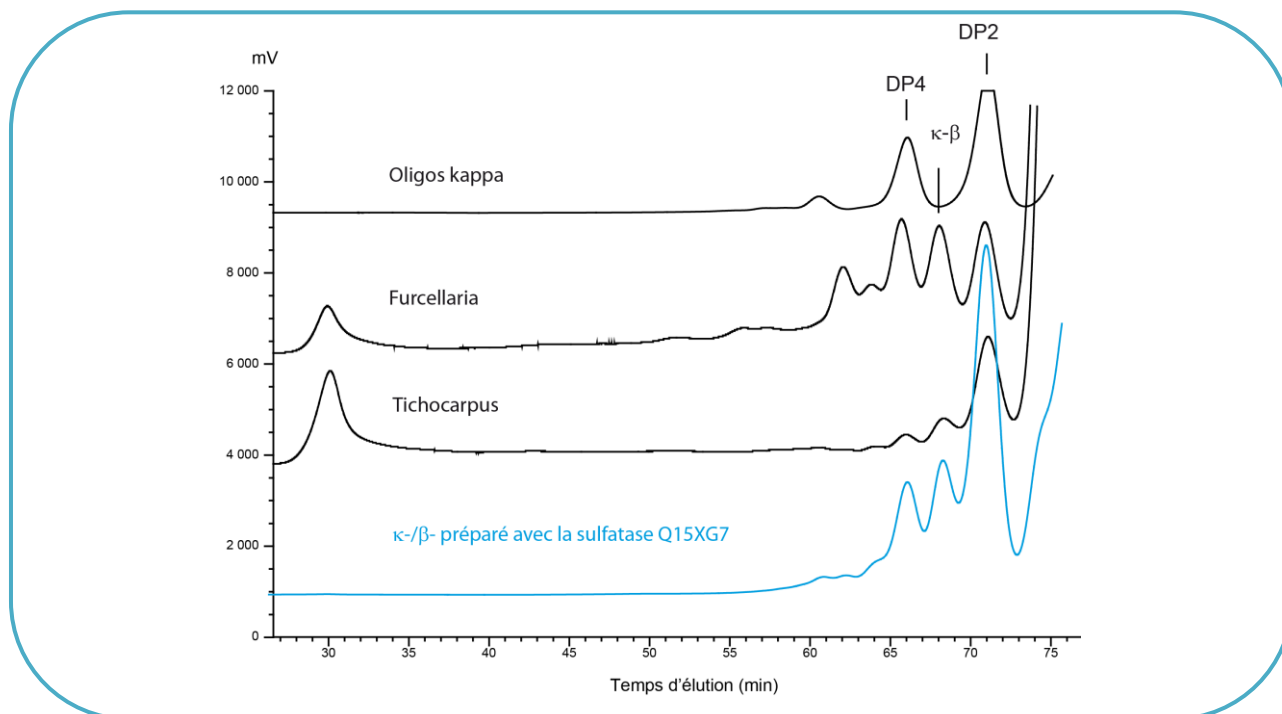


Figure 4-12 : Oligosaccharides produits par la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* à partir de l'hybride κ - β -carraghénane obtenu par la sulfatase Q15XH1, et des hybrides κ - β -carraghénane naturels issu des algues *Furcellaria lumbricalis* et *Tichocarpus crinitus*

C.2.2 Caractérisation biochimique de la sulfatase Q15XG7

La caractérisation biochimique de la sulfatase surexprimée Q15XG7 a été entreprise en utilisant l'extrait filtré entre 30 et 100 kDa sur les oligo- κ -carraghénanes. La sulfatase n'est pas pure dans ces conditions, toutefois elle est nettement majoritaire aux protéines d'*E. coli*. Dans un premier temps, une cinétique de désulfatation des oligo- κ -carraghénanes par la sulfatase Q15XG7 a permis de visualiser l'allure de la courbe dans les conditions expérimentales choisies (Figure 4-11A). Bien qu'incomplète, cette cinétique nous a permis de choisir le temps de nos incubations afin d'être dans la zone linéaire pour la caractérisation de l'enzyme. Les tests d'incubation de la sulfatase Q15XG7 en présence d'oligo- κ -carraghénanes, réalisés dans les différentes conditions ont permis de révéler les paramètres biochimiques de cette sulfatase : une température optimale autour de 35°C (Figure 4-11B), un pH de 6,5 (Figure 4-11C) et une concentration en NaCl autour de 100 mM (Figure 4-11D).

C.2.3 Mode d'action de la sulfatase Q15XG7

L'étude du mode d'action de la sulfatase Q15XG7 a été menée en suivant la même stratégie que pour la sulfatase Q15XH1, qui permet également de produire des hybrides de κ -/ β -carraghénane (*cf* Chap III). Ainsi, les produits de dégradation de l'hybride préparé par la sulfatase Q15XG7 engendrés par la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* ont été comparés par HPSEC avec ceux issus des κ -/ β -carraghénanes de *Furcellaria lumbricalis* et de *Tichocarpus crinitus* (Figure 4-12). En raison de précipitations dans le milieu, le milieu d'incubation de l'hybride κ -/ β -carraghénane par la sulfatase Q15XG7 a été filtré sur 10 kDa après réaction, expliquant l'absence de fraction résistante. On a pu observer que le profil d'élution obtenu avec l'hybride préparé par la sulfatase Q15XG7 présentait un mélange d'oligosaccharides standards de κ -carraghénane et d'oligosaccharides hybrides κ -/ β -carraghénane, sans retour à la ligne de base entre les différents signaux. De plus, il semblerait que l'on puisse produire à partir de cet hybride des oligosaccharides κ -/ β -carraghénane de DP4, bien que ces signaux soient faibles. Ces observations suggèrent que l'hybride préparé grâce à la sulfatase Q15XG7 pourrait ressembler davantage à celui de *Furcellaria lumbricalis*. Par conséquent, la distribution des motifs au sein de la chaîne polymérique serait aléatoire résultant d'un caractère endo-aléatoire de la sulfatase Q15XG7.

DISCUSSION

La détection d'activité avec les sulfatases surexprimées est extrêmement difficile. De nombreux tests d'optimisation sont nécessaires pour détecter l'activité mais surtout pour espérer visualiser la conversion du carraghénane par les analyses de RMN. Nous avons fait le constat, que certains paramètres d'optimisation étaient clairement « sulfatases-dépendants ». En effet, la température d'induction de la culture par exemple a une réelle incidence sur les activités détectées. Dans le cas de la sulfatase Q15XH4, une température à 20°C va être plus favorable alors que pour la Q15XG7, c'est une température à 37°C.

La surexpression des deux autres sulfatases du cluster, la Q15XH4 et la Q15XG7, s'est révélée fructueuse. Bien que la conversion n'ait pas été démontrée pour la sulfatase Q15XH4 par manque de temps, les expériences préliminaires semblent indiquer une désulfatation des unités ι -carrabioses, en raison des activités significatives mesurées par HPAEC sur les oligo- ι -carraghénanes. Par contre, après de multiples essais, en variant les conditions d'expression, de culture, ou de préparation de l'extrait, nous sommes parvenus à visualiser la conversion par RMN des unités κ -carrabioses du polymère de κ -/ μ -carraghénane et des oligo- κ -carraghénanes avec la sulfatase Q15XG7. Cette sulfatase recombinante est extrêmement active par rapport aux autres. Le fait qu'elle ait été surexprimée dans une souche d'expression différente, Origami au lieu de BL21 (DE3), pourrait expliquer ce résultat. Sa capacité à désulfater le polymère semble indiquer que la sulfatase Q15XG7 présente un mode d'action endo. La comparaison des oligosaccharides produits à partir de cet hybride avec ceux de *Tichocarpus crinitus* et *Furcellaria lumbricalis* appuie cette idée. La sulfatase Q15XG7 pourrait conduire à une distribution en bloc des unités au sein de la chaîne polymérique, créant de ce fait des analogues du furcellaran, un polymère très prisé des industriels (cf Chap III). Toutefois, d'autres expériences sont indispensables pour affirmer cette hypothèse, notamment la réalisation de cinétiques de dégradation avec un suivi par HPSEC pour voir les oligosaccharides intermédiaires à la réaction. Il serait donc envisageable que les deux 4S- κ -carraghénane-sulfatases caractérisées chez *P. atlantica*, la Q15XH1 et la Q15XG7, présentent des modes d'action différents.

Comme nous l'avons déjà évoqué, la sulfatase Q15XG7, comme les autres sulfatases décrites dans les chapitres précédents, présente la capacité d'accepter dans son site actif aussi bien les polymères que les oligosaccharides. On peut se poser la question de savoir si cela est valable pour toutes les sulfatases. La réactivité sur les oligosaccharides est meilleure avec les sulfatases surexprimées. En revanche, les sulfatases natives Q15XH1 et Q15XH3 sont bien plus actives sur le polymère. Cette différence pourrait être due à une étape au cours de la surexpression qui serait altérée.

Avec ces nouveaux résultats, nous avons confirmé l'implication du cluster mis en avant par la purification des précédentes sulfatases, dans la biodégradation des carraghénanes. Ces derniers seraient désulfatés avant d'être pris en charge par les enzymes attaquant le squelette du sucre, ici le D-galactose, révélant une machinerie complète de biodégradation de ces polysaccharides d'algues rouges. De ce fait, on peut supposer que les deux gènes codant pour des protéines hypothétiques, Patl_0890 et Patl_0893 codant pour la Q15XG9, ont également une action sur du carraghénane. On peut imaginer d'autres sulfatases, mais de familles inconnues, ou encore de nouvelles carraghénases telle qu'une α -carraghénase ou une β -carraghénase, de famille différente que celles déjà répertoriées dans la littérature.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'expression hétérologue des deux sulfatases putatives Q15XH4 et Q15XG7 a permis de valider l'implication du cluster de gènes dans la dégradation des carraghénanes. De plus, elle a aussi permis de caractériser une nouvelle carraghénane-sulfatase. Celle-ci agit sur les unités κ -carrabioses comme la sulfatase Q15XH1 décrite dans le chapitre III. Finalement, c'est l'approche menée au début de cette thèse à partir de la purification d'activités cibles, qui a permis d'identifier un cluster dédié aux carraghénanes au sein du génome. La validation de celui-ci laisse présager une organisation des enzymes en opéron chez *P. atlantica*. Il est ainsi probable qu'il y ait d'autres clusters impliqués dans la dégradation des carraghénanes dans le génome de *P. atlantica*.

RESULTATS

Chapitre V

Identification

d'une 1-carraghénase

et de son cluster chez P. atlantica

CHAPITRE V :

IDENTIFICATION D'UNE IOTA-CARRAGHÉNASE ET DE SON CLUSTER CHEZ *P. ATLANTICA*

INTRODUCTION

La caractérisation des extraits de *P. atlantica* a permis de suspecter rapidement la présence d'activités carraghénolytiques dans cette bactérie. Dans l'annotation des enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides (Cazymes) sur le site de la base de données CAZY en 2010, aucune κ-, ι- ou λ-carraghénase de séquence connue n'était pourtant répertoriée pour cette bactérie. Nous avons donc porté un réel intérêt aux dégradations de nos polymères, observées lors des analyses RMN. De plus, pour résoudre l'analyse structurale des carraghénanes, et notamment celle des carraghénanes hybrides, il est important de disposer de plusieurs enzymes de même fonction mais avec des modalités de reconnaissance différente. Or, toutes les ι-carraghénases caractérisées biochimiquement à cette date présentent les mêmes produits de dégradation. Pour cette raison, la recherche de nouvelles carraghénases demeure indispensable. Dans notre cas, l'attention particulière que nous avons portée aux enzymes de dépolymérisation avait autant pour but de comprendre les voies de dégradation des différentes structures de carraghénanes, que la découverte de nouvelles carraghénases. En effet, l'identification des différentes enzymes mises en jeu dans le processus de dégradation des carraghénanes par *P. atlantica*, permet de retracer la chronologie des diverses réactions enzymatiques ainsi que d'identifier les structures des carraghénanes intermédiaires.

Le doute sur la présence d'une activité ι-carraghénase fut levé par l'étude de l'activité de désulfatation du ι-carraghénane par le surnageant de culture de *P. atlantica*. En effet, il nous a été possible de séparer les activités de désulfatation et de dépolymérisation, permettant

alors d'affirmer que c'était bien le polymère de ι-carraghénane qui était dégradé, et non une autre unité carrabiose résultante de la désulfatation (κ- ou α-carrabiose). La purification de cette ι-carraghénase fut alors entreprise. La caractérisation biochimique de cette nouvelle ι-carraghénase a été réalisée et les produits de dégradation identifiés.

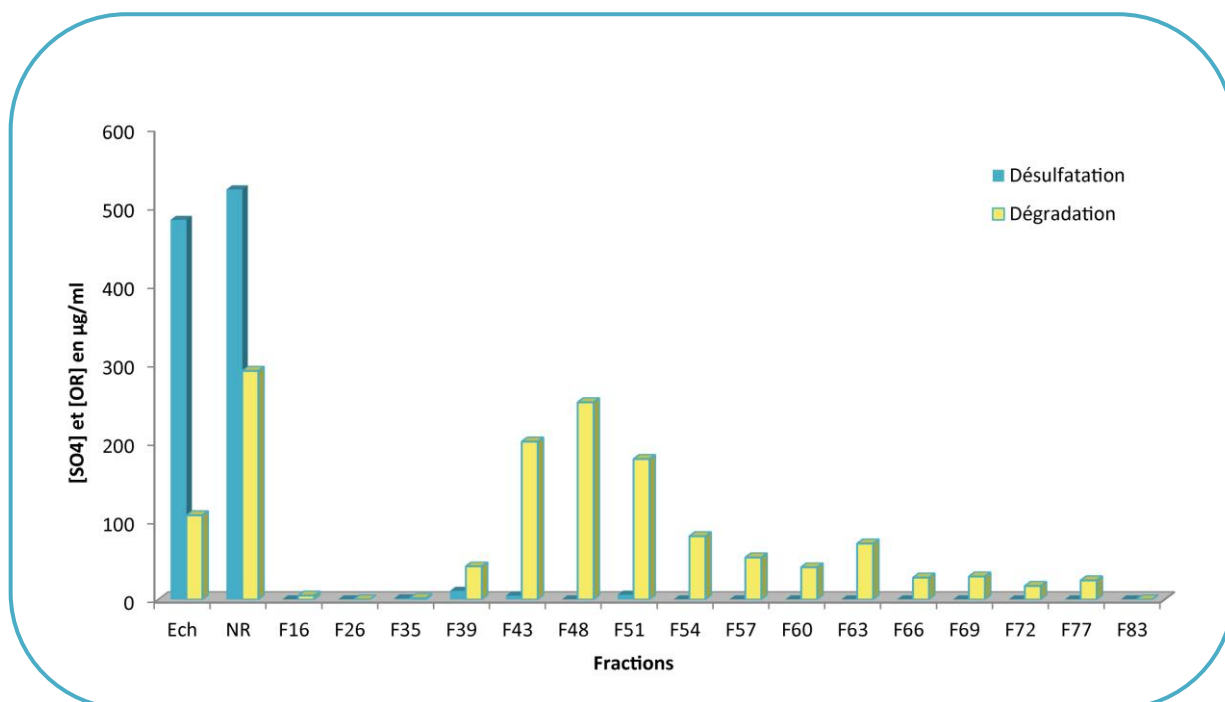


Figure 5-1 : Activités de désulfatation et de dépolymérisation mesurées après incubation des différentes fractions issues de la DEAE du surnageant de *P. atlantica*, en présence de ι -carraghénane

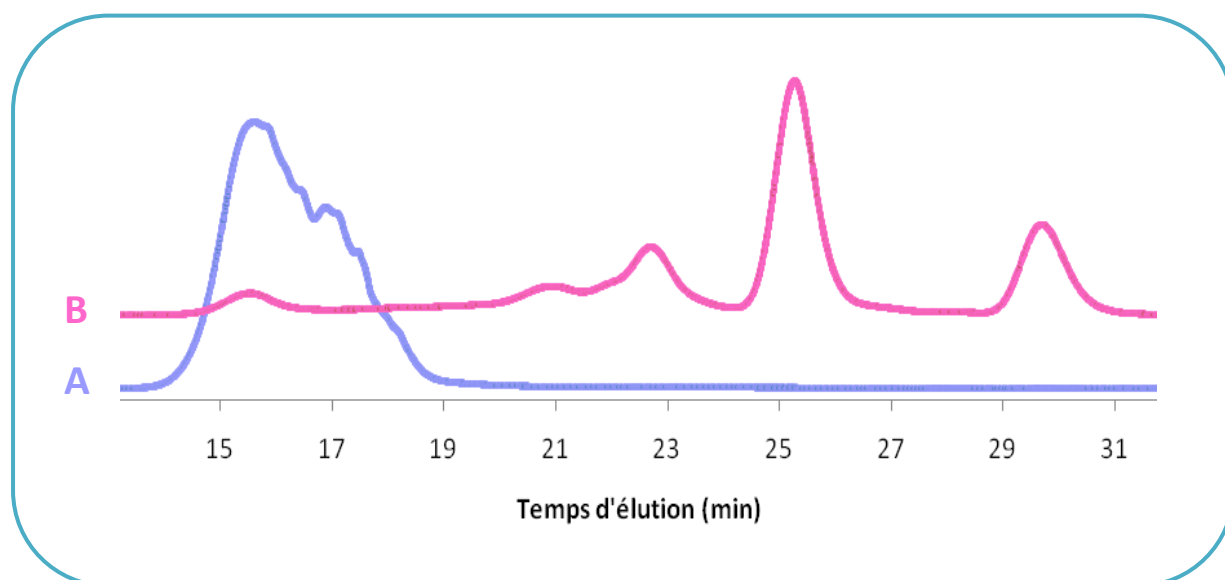


Figure 5-2 : Profil d'éluion HPSEC du ι -carraghénane (A) incubé avec la fraction 48 issue de la DEAE effectuée sur le surnageant (B)

RESULTATS

A. Mise en évidence d'une ι -carraghénase chez *P. atlantica*

A.1 Découverte d'une ι -carraghénase chez *P. atlantica*

Le surnageant de culture de *P. atlantica* a été concentré et fractionné sur une colonne échangeuse d'anions faible, DEAE-Sépharose. Les différentes fractions obtenues ont été testées contre du ι -carraghénane, d'une part pour mesurer une activité de dépolymérisation et d'autre part pour quantifier l'activité de désulfatation. On a pu constater que cette dernière, bien présente dans l'échantillon de départ, n'est pas retenue sur la colonne et est retrouvée dans son intégralité dans la fraction non-retendue (Figure 5-1). En revanche, des extrémités réductrices, synonymes d'une activité de dépolymérisation, ont été produites par les fractions d'élution de la purification, en plus de leur présence dans l'échantillon de départ et la fraction non-retendue. Cette activité de dépolymérisation est loin d'être négligeable car elle atteint environ 250 $\mu\text{g/ml}$ d'extrémités réductrices produites équivalentes au glucose, correspondant à une delta DO de 0,85. On observe un pic d'activité reflétant sa rétention sur la colonne et l'élution des protéines carraghénolytiques *via* le gradient de NaCl. Il est intéressant de noter une augmentation de l'activité détectée dans les fractions issues de la purification, la fraction non-retendue comprise, par rapport à l'échantillon de départ. Si l'on s'intéresse aux activités de désulfatation et de dépolymérisation simultanément, on souligne que, bien que présentes toutes deux dans l'échantillon de départ, il est possible de séparer ces deux activités. Ainsi, on retrouve dans l'élution uniquement l'activité de dégradation du polymère, alors que l'activité de désulfatation n'est présente qu'à l'état de traces (Figure 5-1).

La fraction présentant l'activité maximale de dépolymérisation a été incubée en présence de ι -carraghénane et l'hydrolysât analysé en chromatographie d'exclusion stérique (Figure 5-2). On a pu observer que le polymère de départ était dégradé en différents oligosaccharides démontrant avec certitude une activité de dépolymérisation.

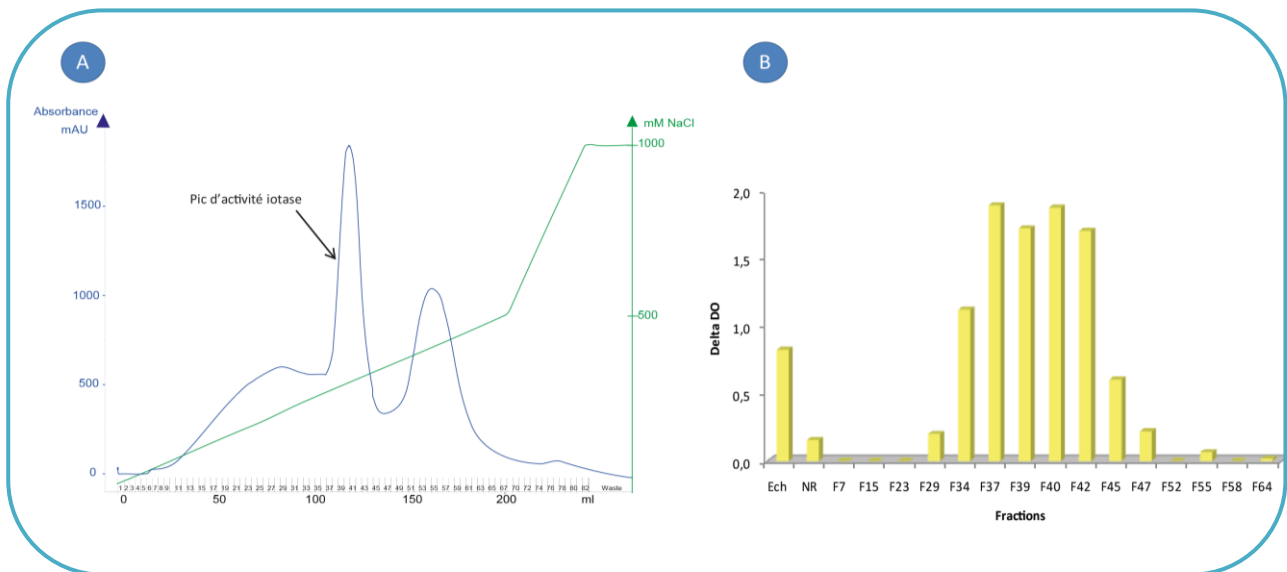


Figure 5-3 : Profil d'éluion du surnageant de *P. atlantica* sur DEAE-Sépharose (A) et activité de dépolymérisation du ι-carraghénane de fractions issues de cette DEAE (B)

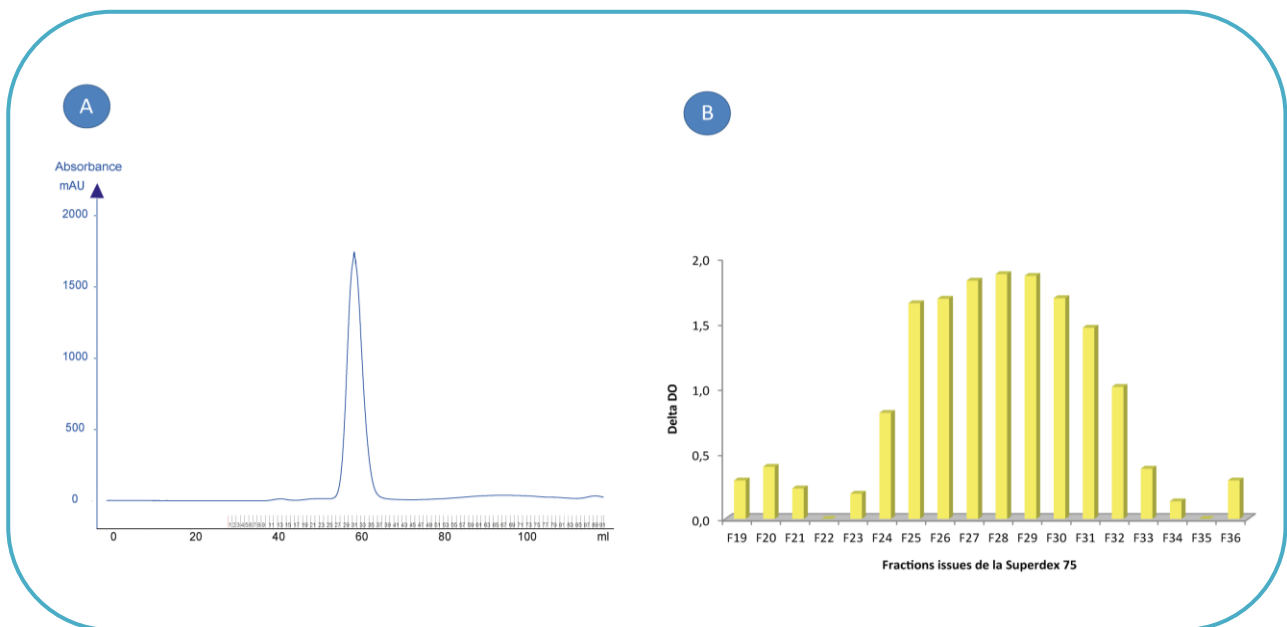


Figure 5-4 : Profil d'éluion de fractions issues de la DEAE sur gel filtration (A) et activité de dépolymérisation du ι-carraghénane de fractions issues de cette purification (B)

A.2 Purification partielle de la ι -carraghénase

Pour envisager la purification de la ι -carraghénase, une caractérisation partielle de l'activité à partir du surnageant concentré de *P. atlantica* a été réalisée. Ainsi, après une nuit d'incubation, on a pu observer que l'activité était similaire pour des températures comprises entre 20°C et 40°C, et qu'un pH de 7,5 dans le milieu d'incubation semblait le plus favorable.

La mise au point d'un protocole de purification pour cette enzyme a été entreprise. La production de la ι -carraghénase par la bactérie *P. atlantica*, est induite par la présence de ι -carraghénane dans le milieu de culture. La ι -carraghénase étant excrétée dans le milieu au cours de la culture, le surnageant a donc été concentré par ultrafiltration avant d'être dialysé pour la purification. Le protocole mis en œuvre repose sur une première étape de chromatographie échangeuse d'anions faible, DEAE-Sépharose, éluée par un gradient croissant en NaCl. Cette étape permet un premier fractionnement du lysat bactérien et d'éliminer un grand nombre de protéines de notre extrait. En effet, la présence de la ι -carraghénase est détectée dans le pic principal atteignant 1700 mAU d'absorbance élué à 300 mM NaCl (Figure 5-3A). L'activité de dépolymérisation est mesurée par la méthode de sucres réducteurs, et dévoile une Δ DO de 1.8, équivalent à 550 μ g/ml d'extrémités réductrices produites dans le milieu d'incubation (Figure 5-3B). Les fractions présentant l'activité maximale sont alors rassemblées et concentrées, avant d'être déposées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex 75, effectuée en mode isocratique (Figure 5-4A). A l'issue de cette deuxième étape, l'activité ι -carraghénase est conservée (Δ DO de 1.8) (Figure 5-4B), et les protéines des fractions déposées sur la colonne sont davantage séparées sur le gel d'électrophorèse (Figure 5-5). Au terme de ce protocole, la ι -carraghénase n'est pas pure, mais trois bandes seulement étaient corrélées à l'activité, permettant par conséquent des analyses en spectrométrie de masse.

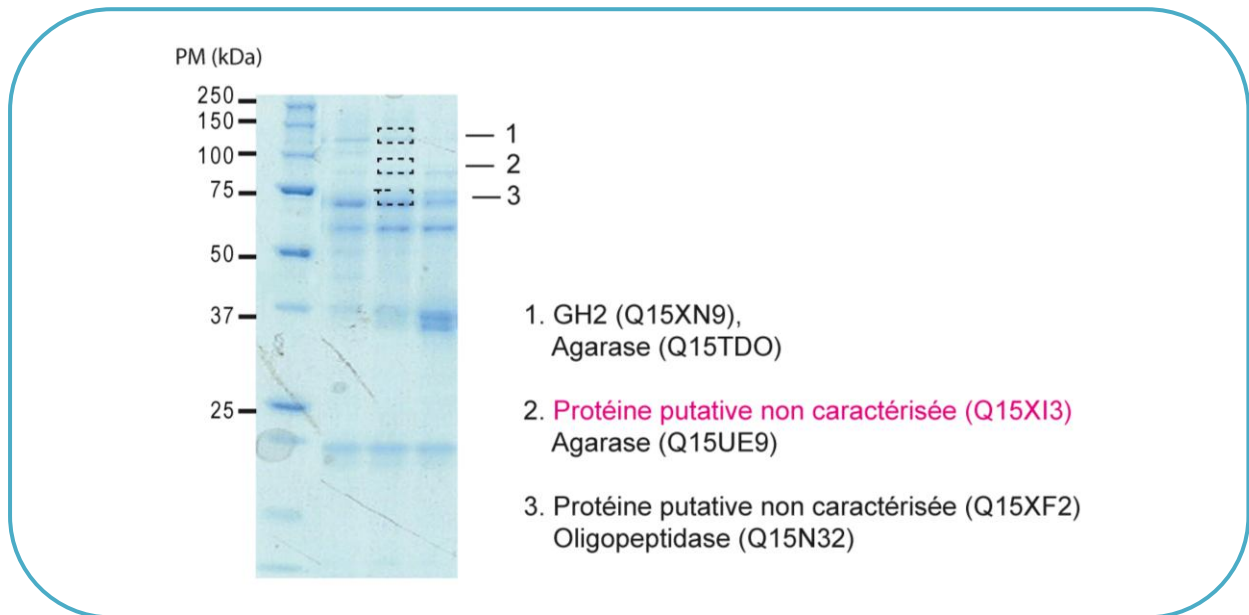


Figure 5-5 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de fractions collectées après la colonne de chromatographie d'exclusion de taille

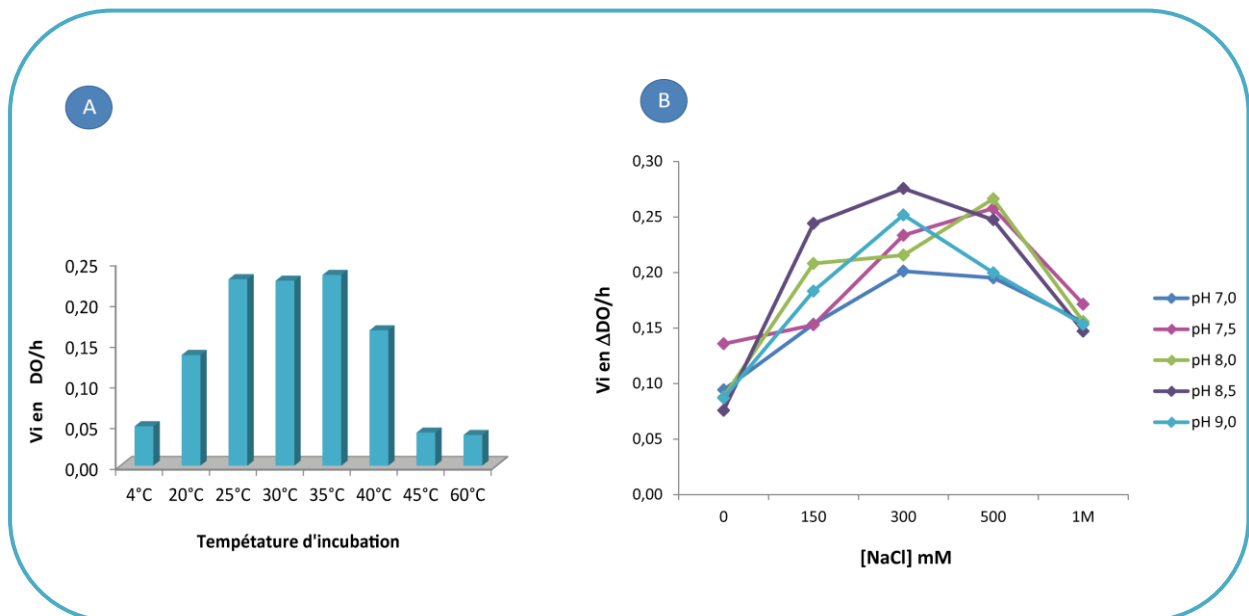


Figure 5-6 : Test de l'activité ι -carraghénase en fonction de la température d'incubation (A), et du pH en fonction de la concentration en NaCl (B)

A.3 Hypothèses d'identification de la protéine de la ι-carraghénase par analyses en spectrométrie de masse

Sans surprise, toutes les enzymes identifiées dans le surnageant de *P. atlantica* se sont révélées être majoritairement des polysaccharide-hydrolases. La fraction d'environ 120 kDa est composée essentiellement d'une glycoside-hydrolase de la famille 2 (Q15XN9), famille qui rassemble différentes β-glycosidases telles que des β-galactosidases, β-glucuronidases, ou β-mannosidases. Dans cette fraction nous avons également trouvé une agarase correspondant au gène Q15TDO (Figure 5-5). Dans la bande autour de 90 kDa, la protéine majoritaire est la Q15XI3 annotée en 2010 comme une protéine hypothétique non caractérisée. Dans cette fraction, on retrouve à nouveau la présence d'une agarase, correspondant au gène Q15UE9. Enfin, la troisième fraction corrélée à l'activité ι-carraghénase, est à nouveau composée d'une protéine putative non caractérisée, la Q15XF2, et d'une oligopeptidase (Q15N32).

A.4 Caractérisation biochimique de la ι-carraghénase

A ce stade de nos analyses, nous ne pouvions pas encore attribuer sans ambiguïté l'activité iota-carraghénase à une séquence en particulier. Cependant, une caractérisation biochimique de l'activité ι-carraghénase de *P. atlantica* a été possible avec la fraction utilisée pour les analyses en spectrométrie de masse et contenant un minimum de bandes sur gel d'électrophorèse. Un premier test d'incubations de cette fraction, contenant la ι-carraghénase, en présence de ι-carraghénane, a été réalisé à différentes températures sur 6h, et a permis de révéler la température optimale de l'enzyme. Celle-ci se situe entre 25 et 35°C (Figure 5-6A). Le pH optimal a été déterminé en incubant la fraction active sur une gamme de concentration croissante en NaCl. Les résultats ont permis d'attribuer la condition optimale pour l'activité de dépolymérisation à un pH de 8,5 associé à une concentration de 300 mM NaCl (Figure 5-6B).

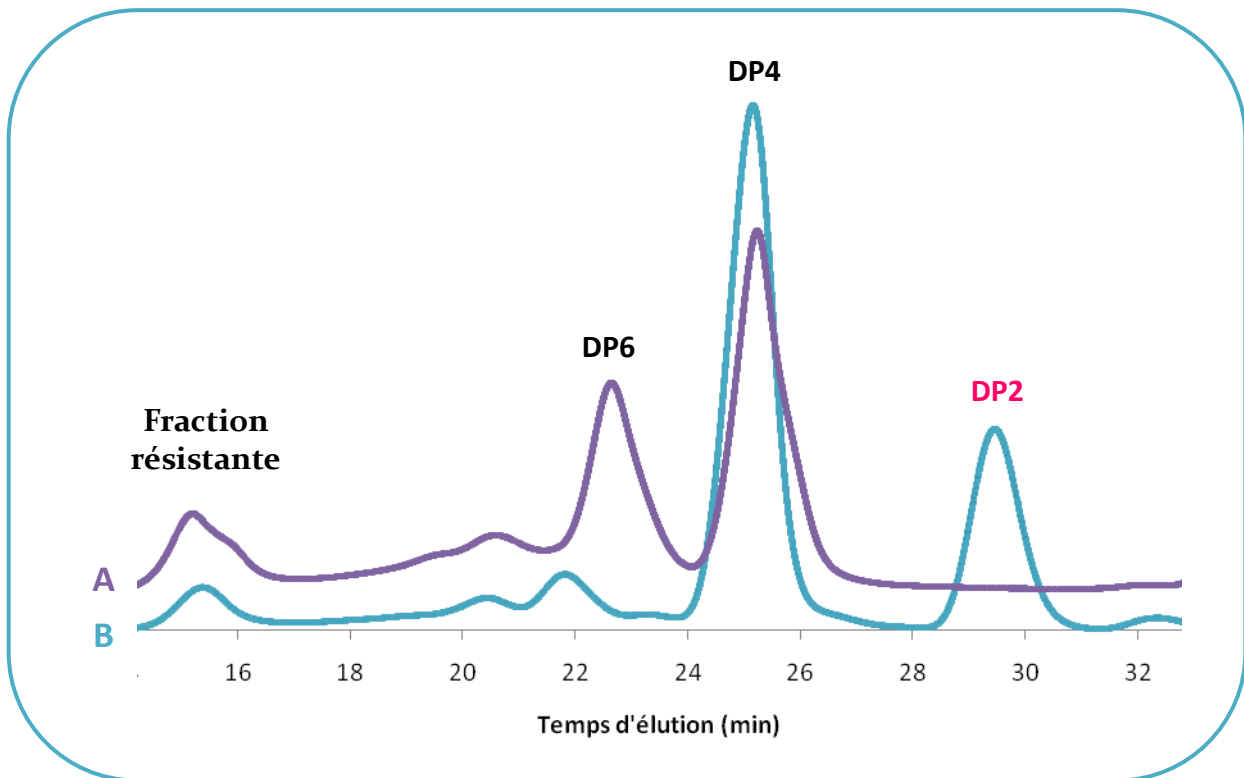


Figure 5-7 : Analyses des produits terminaux des ι-carraghénases d'*A. fortis* (A) et de *P. atlantica* (B) sur chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC)

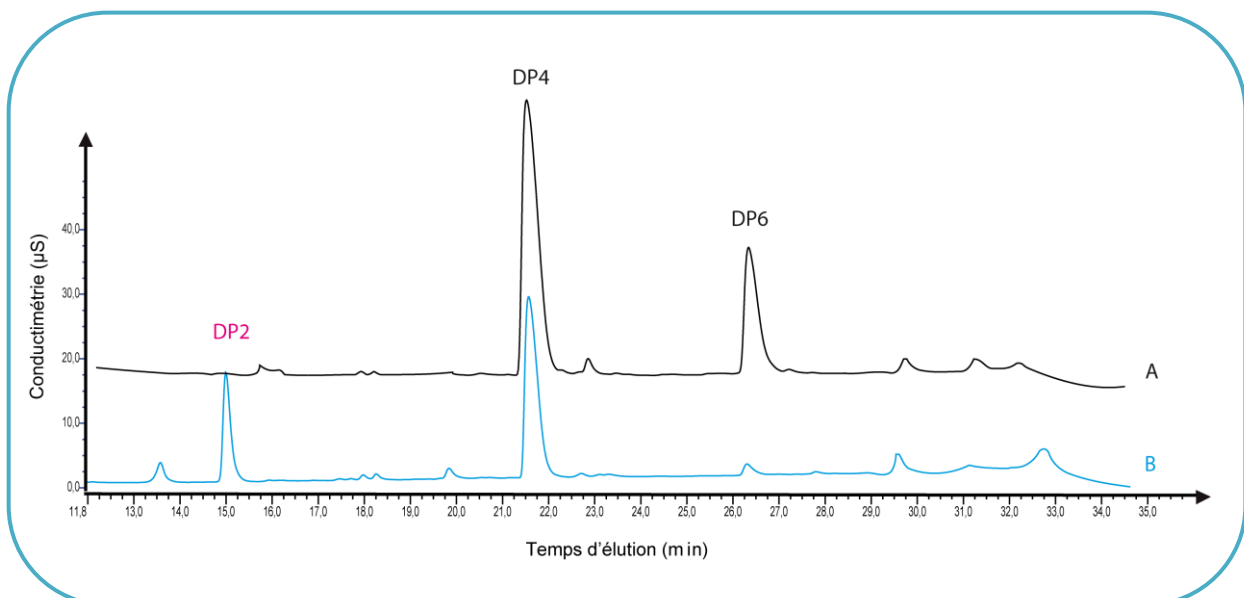


Figure 5-8 : Analyses des produits terminaux des ι-carraghénases d'*A. fortis* (A) et de *P. atlantica* (B) sur chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC)

A.5 Produits de dégradation de la ι -carraghénase

L'étude des produits limites de l'hydrolyse du ι -carraghénane avec la ι -carraghénase de *P. atlantica* a été effectuée après dégradation du polymère jusqu'à complétion. Le milieu d'incubation a été analysé par chromatographie d'exclusion de taille HPSEC et le profil obtenu comparé à celui de l'hydrolyse du ι -carraghénane avec la ι -carraghénase d'*A. fortis* (Figure 5-7). Cette dernière engendre, comme toutes les ι -carraghénases dont les produits de dégradation ont été étudiés, de l'hexa- et du tétrasaccharide. L'analyse comparative avec le profil obtenu avec la ι -carraghénase de *P. atlantica* a permis de dévoiler que notre iotase formait d'autres produits terminaux : du tétrasaccharide comme les autres, mais aussi du disaccharide ι -carrabiose, pour la première fois observé (Figure 5-7).

Ce résultat a pu être confirmé par chromatographie échangeuse d'anions HPAEC, où les différents oligosaccharides ont été élués en fonction de leur charge (Figure 5-8). L'hexa- et le tétrasaccharide d'*A. fortis* ont été élués à 26 et 21,5 min respectivement. Dans le cas de la ι -carraghénase de *P. atlantica*, le pic élué à 15 min peut être identifié comme du disaccharide.

Afin de s'assurer de notre observation, le disaccharide a été purifié et analysé en RMN. Ainsi, on a pu observer uniquement les signaux ι -carrabiose localisés du côté réducteur, révélant la présence d'une seule unité disaccharidique (Figure 5-9). On retrouve, par ordre de blindage, le signal du proton anomérique de l'unité G4S, et les signaux des protons de l'unité DA2S d'anoméries α et β .

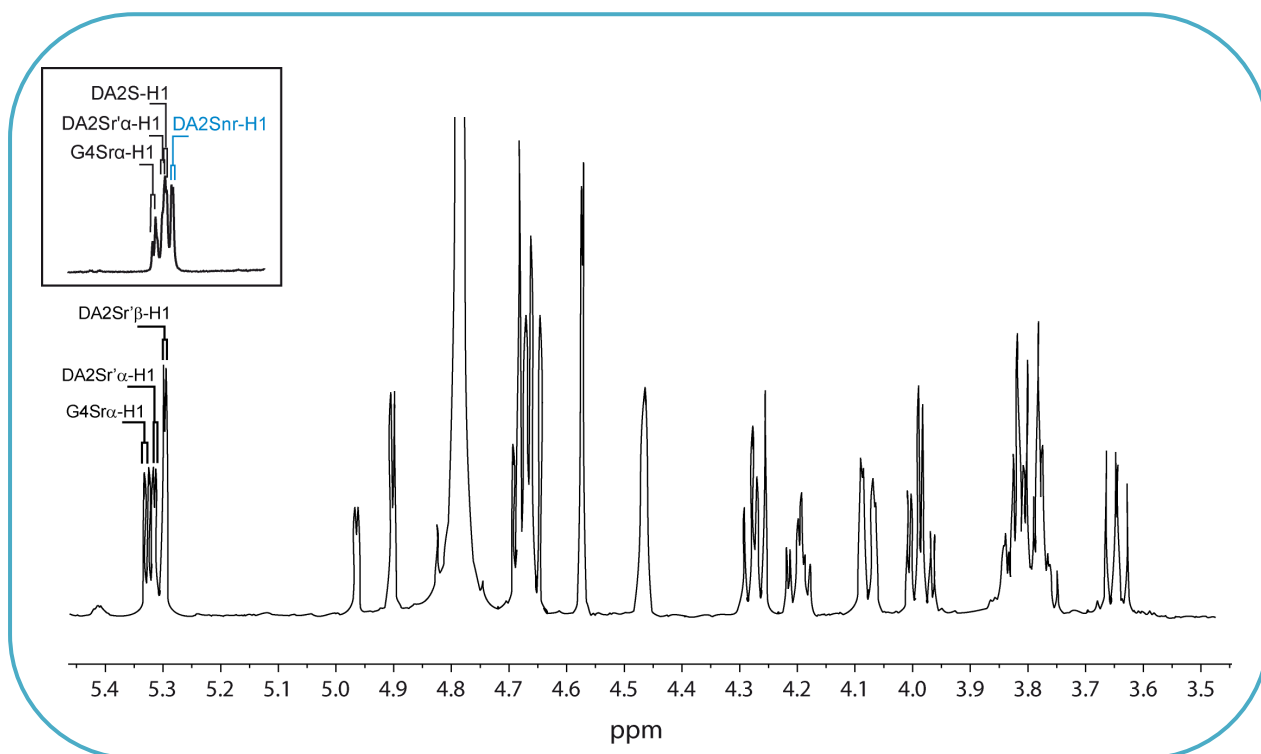


Figure 5-9 : Spectre RMN ^1H du ι -carrabiose (DP2) produit par la ι -carraghénase de *P. atlantica*

Dans l'encadré, la zone des protons anomériques pour des oligo- ι -carraghénanes constitués de 2 disaccharides au minimum. Le signal du proton anomérique de l'unité DA2S positionnée du côté non réducteur est indiqué en bleu.

B. Identification de la ι -carraghénase de *P. atlantica*

B.1 Analyse croisée des résultats de spectrométrie de masse avec la base de données CAZY en 2011

Les séquences des peptides obtenus en spectrométrie de masse peuvent ensuite être croisées avec la séquence du génome de *P. atlantica*, permettant de corréler nos données acquises par la purification de l'activité avec l'annotation automatique des gènes dans le génome. Ainsi, basé sur la caractérisation d'une nouvelle iota-carraghénase appartenant à la famille GH82 au cours de l'année 2011, la base de données CAZY a été mise à jour nous permettant d'obtenir de nouvelles informations.

De nouvelles recherches BLAST des deux protéines putatives Q15XI3 et Q15XF2 présentes dans les bandes 2 et 3 (Figure 5-5) de la fraction active ont été réalisées sur le site web « Uniprot ». La protéine Q15XF2 a montré de grandes similarités de séquences avec d'autres protéines hypothétiques non caractérisées de diverses bactéries marines. En revanche, la protéine Q15XI3 a dévoilé de légères similitudes avec les ι -carraghénases répertoriées (21,8% avec celle d'*A. fortis*, 20,1% avec la A1 de *Z. galactanivorans*), mais surtout de très grandes homologies avec la ι -carraghénase E3W9G3 (60,1%) nouvellement caractérisée chez *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94(T) (Hatada *et al.*, 2010). La caractérisation biochimique de cette nouvelle ι -carraghénase a entraîné le reclassement dans CAZY de la séquence Q15XI3, toujours comme protéine putative non caractérisée, mais dans la famille 82 des glycoside-hydrolases. Or, on peut souligner que cette famille contient uniquement des ι -carraghénases à ce jour, validant solidement l'identification de notre protéine.

Par conséquent, les analyses en spectrométrie de masse, corrélées aux nouvelles données CAZY à l'automne 2011, ont permis d'identifier de façon quasi-certaine la protéine Q15XI3, purifiée à partir du surnageant de culture, comme la ι -carraghénase de *P. atlantica*.

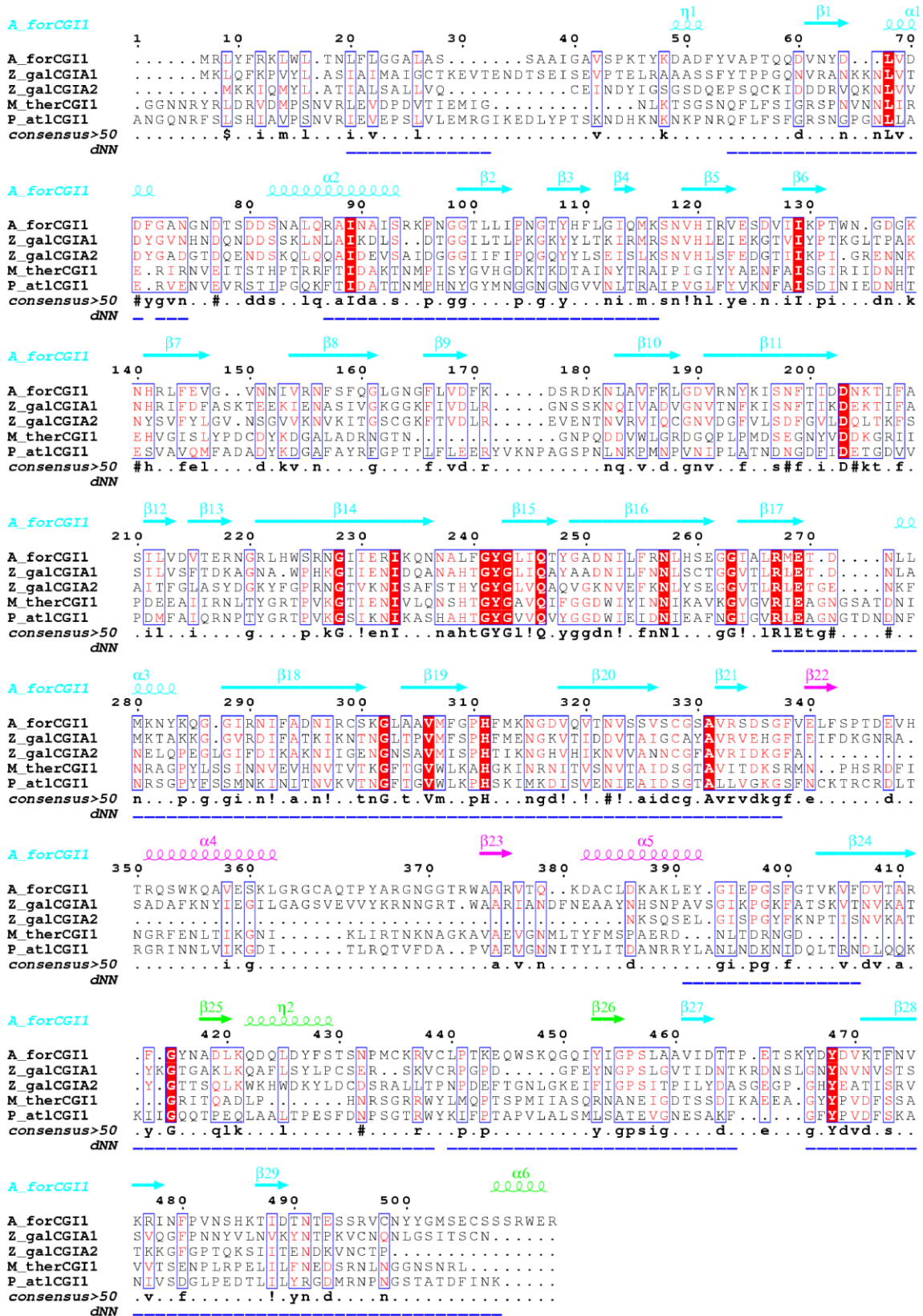


Figure 5-10 : Alignement des séquences des ι -carraghénases de *P. atlantica*, *M. thermotolerans*, *A. fortis*, et les ι -carraghénases A1 et A2 de *Z. galactanivorans*

L'alignement présenté est la zone de chevauchement des séquences des cinq ι -carraghénases couvrant la structure en hélice β et les domaines A et B. Les éléments de structure secondaires d'après la structure 3D de la ι -carraghénase de *A. fortis* sont indiqués au-dessus de la séquence et coloré selon comme indiqué dans le schéma de la figure 5-11 : en cyan, la structure de l'hélice β , en rose le domaine A et en vert le domaine B. Les acides aminés soulignés en bleu proviennent des peptides identifiés par les analyses en spectrométrie de masse.

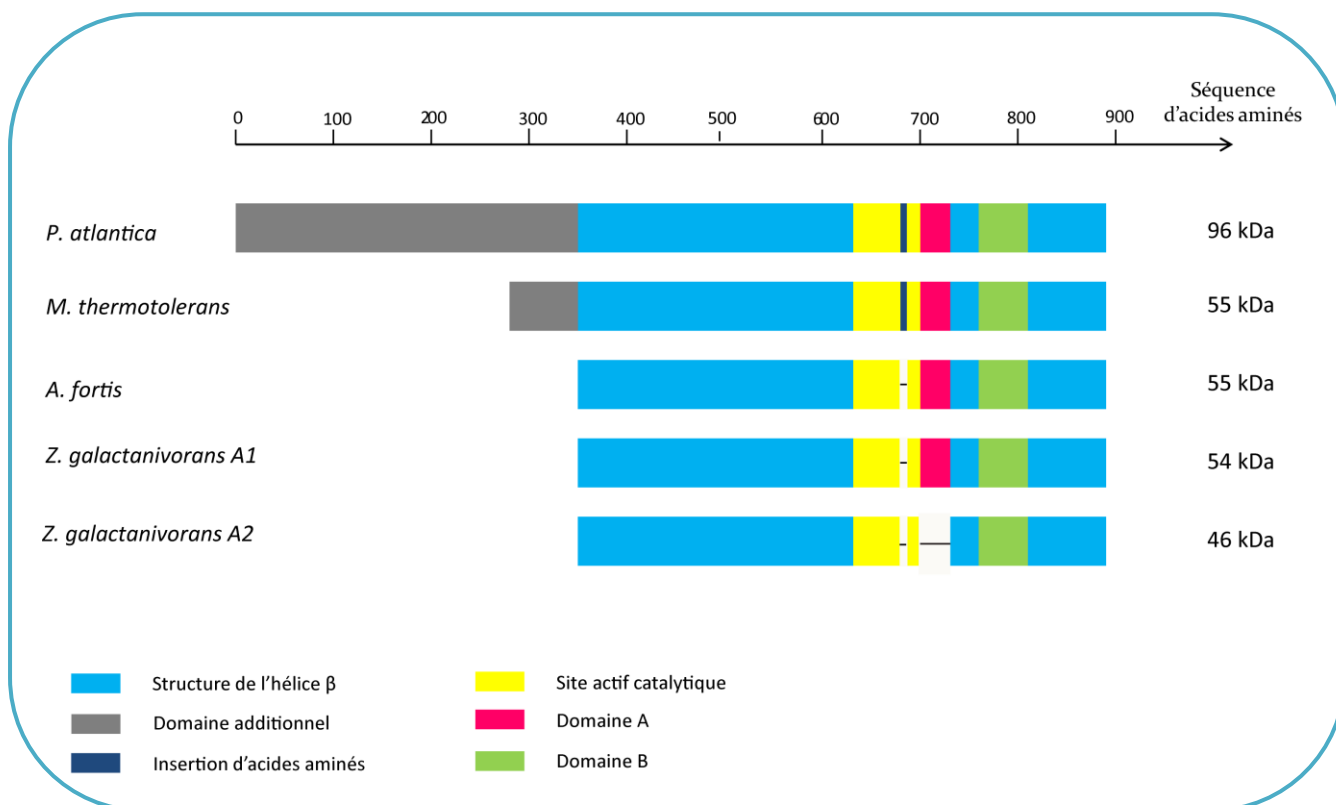


Figure 5-11 : Alignement schématique des séquences de quatre ι -carraghénases caractérisées avec la ι -carraghénase de *P. atlantica*

*B.2 Alignement des séquences de la ι -carraghénase de *P. atlantica* avec les autres ι -carraghénases caractérisées*

Pour mieux comprendre les similarités et les différences de la ι -carraghénase de *P. atlantica* avec les autres ι -carraghénases caractérisées, nous avons effectué un alignement de séquences de ces protéines. Ainsi, bien que le poids moléculaire de la ι -carraghénase de *P. atlantica* soit bien supérieur aux autres, les séquences des ι -carraghénases d'*A. fortis*, de *Z. galactanivorans* et de *M. thermotolerans* furent alignées avec celle de *P. atlantica* (Figures 5-10 et 5-11). Nous avons alors constaté que le poids moléculaire de la ι -carraghénase de *P. atlantica* était dû un domaine additionnel. Pour autant, la structure en hélice β , ainsi que les domaines A et B étaient présents comme chez la plupart des autres ι -carraghénases (*Introduction générale* – Figure IG-34). Le site actif des cinq ι -carraghénases révèle de très

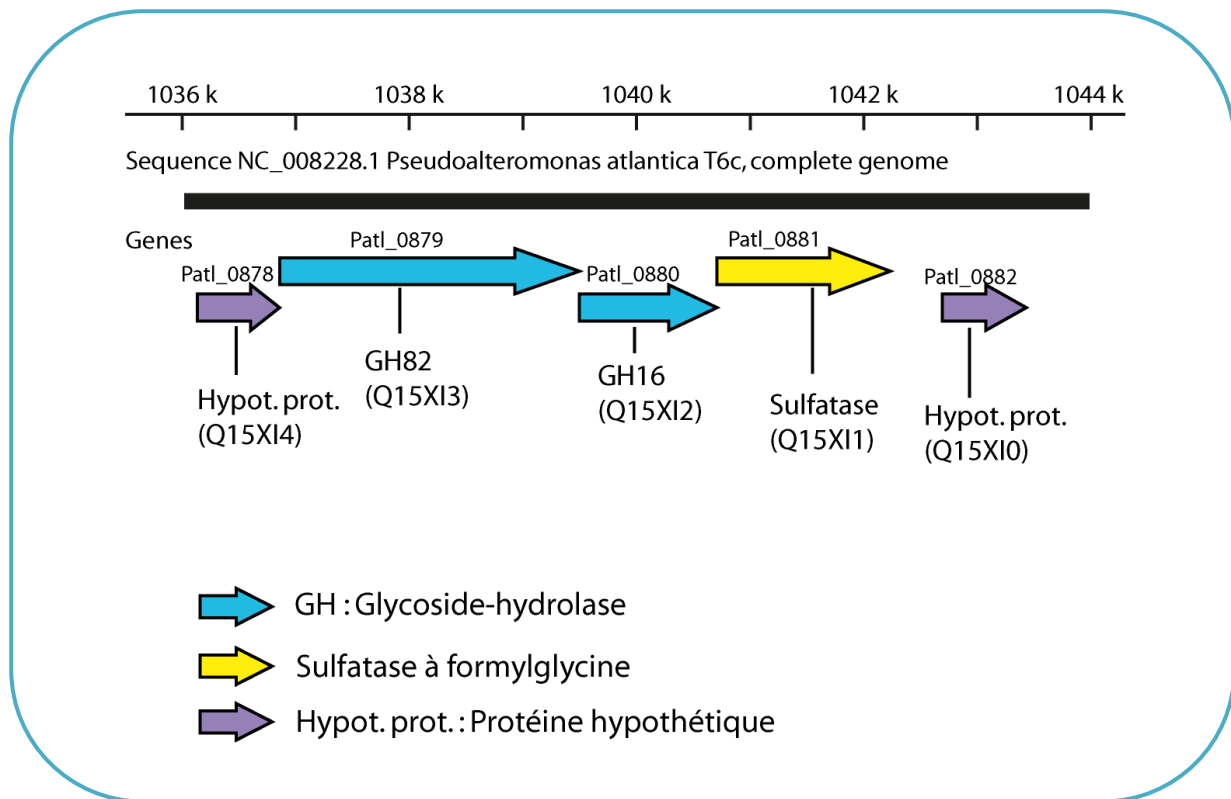


Figure 5-12 : Cluster de gènes de la ι -carraghénase de *P. atlantica*

fortes identités entre chacune. Au sein de cette zone contenant les résidus catalytiques, nous avons pu observer une insertion de quelques acides aminés pour les ι -carraghénases de *P.atlantica* et de *M. thermotolerans* (Figures 5-10 et 5-11).

B.3 Cluster de la ι -carraghénase de *P. atlantica*

Par une démarche similaire aux carraghénane-sulfatases précédemment décrites, après l'identification de la ι -carraghénase de *P. atlantica*, vraisemblablement codé par le gène de la protéine Q15XI3, nous nous sommes intéressés à sa localisation dans le génome. Nous avons alors constaté qu'elle se situait également dans un petit cluster de gènes (Figure 5-12), contenant aussi des gènes de protéines hypothétiques et un gène codant pour une sulfatase. Cette co-localisation avec une iota-carraghénase nous à amener à supposer que cette sulfatase puisse être active sur du carraghénane. L'objectif principal de ma thèse étant l'identification et la caractérisation de carraghénane-sulfatases, nous avons alors entrepris la surexpression de la sulfatase présente dans ce cluster, la protéine Q15XI1.

C. Surexpression de la sulfatase du cluster de la ι -carraghénase

C.1 Surexpression de la sulfatase Q15XI1

La surexpression de la sulfatase Q15XI1 a été entreprise afin de connaître son implication supposée dans la désulfatation des carraghénanes. Le gène a été cloné dans le plasmide PfO4 puis insérés dans des souches d'expression d'*E. coli*, BL21 (DE3), selon les conditions décrites par [Groisillier et al. \(2010\)](#).

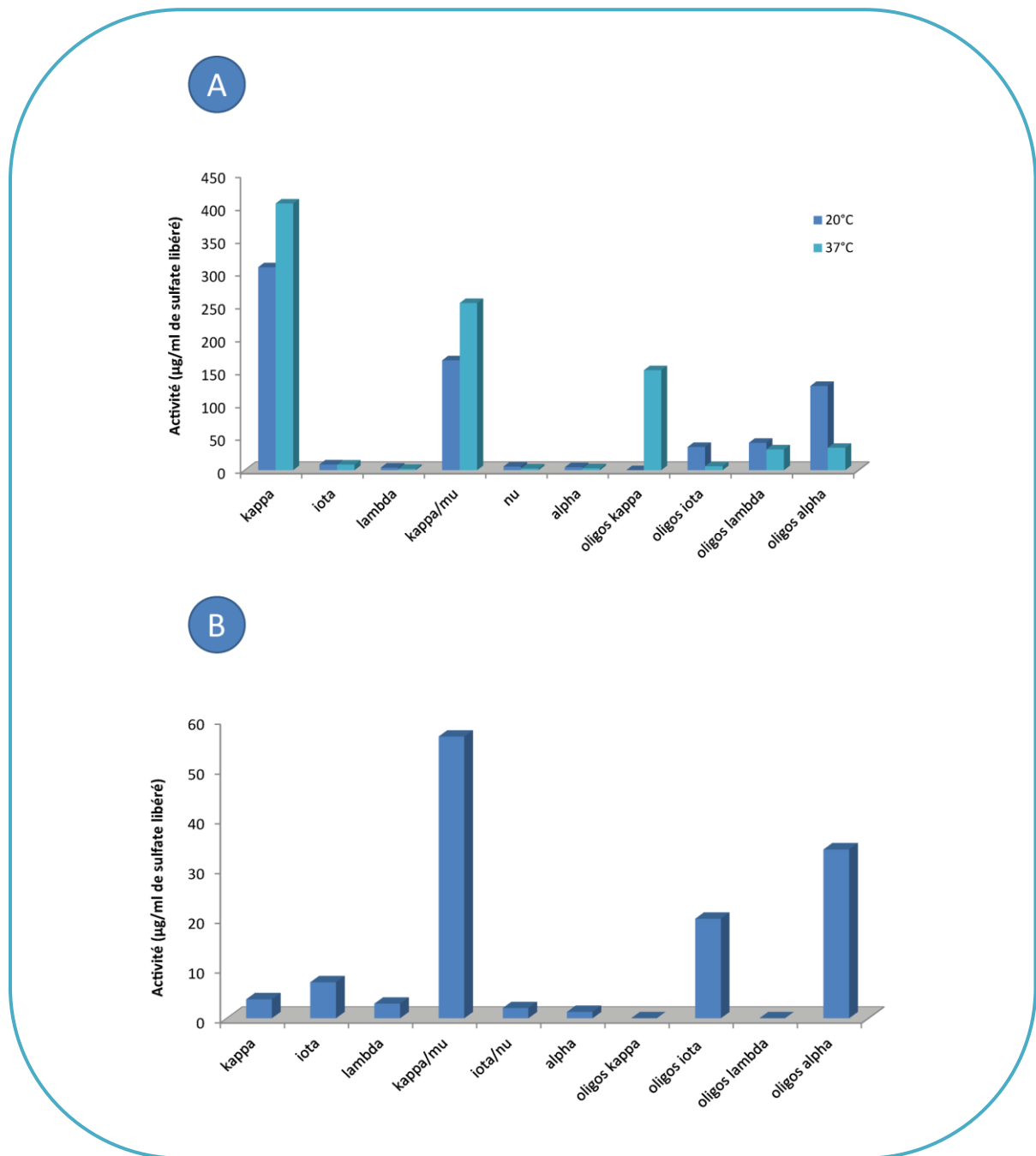


Figure 5-13 : Criblages d'activités avec la sulfatase Q15XI1 surexprimée

A : 1^{er} crible réalisé avec des inductions de cultures effectuées à 20°C et 37°C.

B : 2^{ème} crible réalisé uniquement avec une température d'induction à 20°C.

C.2 Test d'activité de la sulfatase Q15XI1

Des cultures de petit volume réalisées en milieu LB, ont permis de faire des premiers criblages. Le premier crible a été effectué avec des extraits provenant de cultures réalisées à deux températures d'induction : l'une à 20°C et la seconde à 37°C. Les extraits ont été incubés en présence des six polymères de carraghénane à disposition (κ -, ι -, λ -, κ -/ μ -, ι -/ ν -, et α -) et des quatre oligosaccharides correspondants (oligos κ -, ι -, λ - et α -). Sur ce crible, on a pu observer de fortes activités de désulfatation sur les substrats porteurs d'unités κ -carrabioses : κ -carraghénane, κ -/ μ -carraghénane et les oligo- κ -carraghénanes uniquement avec une température d'induction à 37°C (Figure 5-13A). De façon moins importante, une activité fut détectée sur les oligo- α -carraghénanes.

Le second crible a été effectué uniquement avec une production de la sulfatase induite à 20°C. Sur cette expérience, nous avons relevé des activités de désulfatation sur le κ -/ μ -carraghénane, les oligo- ι -carraghénanes et les oligo- α -carraghénanes (Figure 5-13B). Nous avons constaté que toutes ces activités avaient été observées dans le premier crible, mais avec une quantité de sulfate libéré plus importante.

Chacune de ces activités a ensuite été optimisée par les tests décrits dans les chapitres précédents (concentration en IPTG, temps d'induction, etc). La plus forte désulfatation et la plus reproductible fut obtenue sur les oligo- ι -carraghénanes. Néanmoins, malgré des quantités de sulfate libéré significatives par HPLC, la conversion des unités ι -carrabiose n'a pas pu être démontrée par les analyses RMN.

DISCUSSION

A. Découverte d'une ι -carraghénase chez *P. atlantica*

L'activité de dépolymérisation du ι -carraghénane dans la bactérie *P. atlantica* a pu être confirmée grâce à la séparation des activités de désulfatation et de dépolymérisation du surnageant de culture. Il a ainsi été possible d'affirmer que c'était bien le polymère de ι -carraghénane qui était dégradé, et non une autre unité carrabiose résultante de la désulfatation, telle que le κ - ou l' α -carrabiose. Il aurait en effet été possible que le polymère de ι -carraghénane soit d'abord désulfaté, puis la nouvelle structure dégradée par la carraghénase adaptée. Dans le cadre des travaux présenté dans ce chapitre, nous avons pu démontrer la présence d'une ι -carraghénase, néanmoins on ne peut pas exclure qu'une activité α -carraghénase soit également présente dans *P. atlantica*.

L'activité de dépolymérisation du ι -carraghénane est relativement faible dans le surnageant brut. Deux raisons peuvent expliquer cette observation. D'une part, en prenant en compte le protocole appliqué, le surnageant contient après la culture de nombreuses extrémités réductrices, que l'on ne diminue que partiellement par l'étape de dialyse. Pour cette raison, l'absorbance de notre échantillon est réduite de façon non spécifique dès le départ, amenant à une différence d'absorption entre le blanc et l'échantillon diminuée en conséquence. La mesure des extrémités réductrices effectivement produites est par conséquent masquée. La deuxième raison pouvant expliquer la dégradation limitée du ι -carraghénane est la désulfatation du substrat. Des unités ι -carrabioses ont en effet converties en structure α -carrabiose sous l'action d'une sulfatase (décrite au Chap 2) et la ι -carraghénase étant spécifique, elle agit par conséquent moins sur ce polymère modifié.

Le protocole de purification mis en place n'a pas permis d'obtenir l'activité ι -carraghénase purifiée à l'homogénéité. Cependant, seulement trois bandes étaient corrélées à l'activité de dépolymérisation, nous permettant ainsi la réalisation d'analyses en spectrométrie de masse. Ces derniers n'ont pas permis à eux seuls de trancher sur la protéine responsable de l'activité ι -carraghénase, néanmoins ils nous ont fortement orientés sur les deux protéines putatives Q15XI3 et Q15XF2. En réalisant des BLAST sur le site web « Uniprot » nous sommes parvenus à identifier la protéine Q15XI3 comme correspondant à un gène d'une ι -carraghénase appartenant à la famille GH82. En effet, cette protéine montre de légères ressemblances avec d'autres ι -carraghénases, mais surtout elle est fortement homologue à la protéine E3W9G3 (44,5% d'identité) décrite comme une ι -carraghénase au même moment que notre purification par [Hatada et al.](#), à la fin de l'année 2010. Cette concordance avec les peptides relevés par les analyses en spectrométrie de masse de la fraction du surnageant de *P. atlantica* ayant une activité ι -carraghénase, nous permet de conclure avec une très forte probabilité que la protéine Q15XI3 est bien responsable de l'activité ι -carraghénase purifiée. Cependant, puisque notre purification n'était pas obtenue à l'homogénéité, nous ne pouvons pas complètement exclure que la protéine codée par le gène Q15XF2 soit responsable de l'activité observée.

La classification des cazymes dans la base de données CAZY est basée sur les homologies de séquences d'acides aminés. La ι -carraghénase de *P. atlantica* étant très éloignée des autres ι -carraghénases caractérisées jusqu'en 2010 (14,4 % d'identité seulement avec celle d'*A. fortis*), il est normal que la protéine Q15XI3 n'ait pas été, dans un premier temps, classée dans la famille GH82 contenant les autres ι -carraghénases. La caractérisation d'une nouvelle ι -carraghénase au cours de l'année 2010, celle de *M. thermotolerans* a conduit à l'extension de la famille GH82. En effet, cette ι -carraghénase dont l'activité a été biochimiquement caractérisée par [Hatada et al., \(2010\)](#), fut classée dans la famille GH82 lors de la mise à jour de la base de données CAZY en 2011, bien que présentant seulement 18,5 % de similarités (dont 11,8 % d'identité) avec celle d'*A. fortis* par exemple. Lors de l'introduction de cette enzyme dans la famille GH82, la protéine Q15XI3 de *P. atlantica*, qui présente 60,1 % de similarités (dont 44,5 % d'identité) avec la ι -carraghénase de *M. thermotolerans*, fut alors reclassée dans la famille GH82.

| | <i>P. atlantica</i> | <i>M. thermotolerans</i> |
|-------------------|---------------------|--------------------------|
| Protéine | Q15XI3 | E3W9G3 |
| Poids moléculaire | 96 kDa | 55 kDa |
| T° optimale | 35°C | 50°C |
| pH optimal | 8,5 | 7,5 |
| [NaCl] optimale | 300 mM | 100 mM |

Tableau 5-1 : Comparaison des facteurs biochimiques des deux ι -carraghénases homologues issues de *P. atlantica* et *M. thermotolerans*

Bien que les ι -carraghénases de *P. atlantica* et de *M. thermotolerans* soient des protéines homologues, on a pu constater des différences entre ces deux enzymes. En effet, le poids moléculaire de la ι -carraghénase de *P. atlantica* (96 kDa) est presque deux fois supérieur à celui de ι -carraghénase de *M. thermotolerans* (55 kDa) en raison d'un domaine additionnel (Figure 5-11). On relève également des optima d'activité différents, notamment au niveau de la température d'incubation. La ι -carraghénase de *M. thermotolerans* présente une température optimale particulièrement élevée, à 50°C, alors que notre ι -carraghénase issue de *P. Atlantica* n'est quasiment pas active à cette température (Tableau 5-1).

L'étude des produits de dégradation de la ι -carraghénase de *P. atlantica* a permis de dévoiler des modalités de reconnaissance différentes de celles de la ι -carraghénase d'*A. fortis*. En effet, la ι -carraghénase de *P. atlantica* produit du tétrasaccharide et du disaccharide de la série néo- ι -carrabiose, alors que la ι -carraghénase d'*A. fortis* produit de l'hexa- et du tétrasaccharide. Cette différence importante peut être expliquée par les faibles homologies de séquences d'acides aminés entre les ι -carraghénases de *P. atlantica* et d'*A. fortis*. Sur ce constat, nous nous sommes intéressés à la ι -carraghénase homologue de *P. atlantica*, issue de *M. thermotolerans*. L'étude d'[Hatada et al. \(2010\)](#) sur cette dernière, mentionne qu'elle produit essentiellement du tétrasaccharide. En raison des fortes homologies entre ces deux ι -carraghénase, et notamment une insertion commune d'acides aminés au cœur même du site actif, nous avons fait l'hypothèse que ces deux enzymes devaient présenter des modalités de reconnaissance similaires. Nous avons ainsi fait la démarche de nous procurer les produits de dégradation catalysés par la ι -carraghénase de *M. thermotolerans*, et les avons purifiés sur HPSEC. Les analyses RMN nous ont révélé sa capacité à produire également du disaccharide validant ainsi que les ι -carraghénases de *P. atlantica* et de *M. thermotolerans* possédaient les mêmes modalités de reconnaissance. L'insertion d'acides aminés dans le site actif catalytique ou la présence d'un domaine additionnel pour ces deux ι -carraghénases pourrait expliquer la différence des produits terminaux obtenus par rapport aux autres ι -carraghénases.

B. La sulfatase Q15XI1 impliquée dans la biodégradation des carraghénanes ?

Les premiers cribles suggèrent que la sulfatase Q15XI1 agirait sur du carraghénane en raison des désulfatations détectées par chromatographie HPAEC. Cependant cette technique révèle parfois des faux positifs, complexifiant l'interprétation de nos résultats. En effet, le κ -/ μ -carraghénane par exemple, présente généralement une désulfatation apparente, et entraîne une sensibilité moindre que pour d'autres substrats de carraghénanes. Lorsque les activités sont très faibles, comme c'est le cas avec les sulfatases surexprimées, il devient difficile de déterminer avec certitude le substrat de la sulfatase. Il est donc important de coupler les résultats de chromatographie avec une autre technique, pour valider les mesures de sulfate libéré observées, et c'est notamment ce que nous faisons par le biais des analyses RMN. Basée sur la détection en HPAEC, et après optimisation, la désulfatation des unités ι -carrabioses semble être la plus probable avec la sulfatase Q15XI1. Néanmoins, ce résultat est à prendre avec précaution dans la mesure où il ne nous a pas été possible de démontrer la conversion par RMN.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre purification, associée à la mise à jour récente du site web CAZY, a permis d'associer avec une quasi-certitude l'activité ι -carraghénase détectée dans la bactérie *P. atlantica* avec la protéine Q15XI3 du génome. En se basant sur l'analyse du premier cluster mis en évidence (Chap IV), nous avons émis l'hypothèse que la sulfatase Q15XI1, présente dans le cluster de la ι -carraghénase, serait impliquée dans la biodégradation des carraghénanes. Les premiers résultats obtenus nous donnent bon espoir que notre théorie soit la bonne, malheureusement par manque de temps, il ne nous fut pas possible de la confirmer. Cette piste mérite vraiment que l'on s'y intéresse. Car, si les gènes codant pour des carraghénases et des carraghénane-sulfatases sont organisés en cluster au sein des génomes des bactéries, cela pourrait simplifier grandement la recherche de nouvelles carraghénane-sulfatases. En effet, si l'on prend à titre d'exemple le génome de la bactérie marine *P. carrageenovora*, on trouve une sulfatase attenante au gène de la κ -carraghénase ([Tristan Barbeyron, communication personnelle](#)). Cette sulfatase pourrait donc hypothétiquement être active sur une structure de carraghénane. Ainsi, dans le cas de *P. atlantica*, la confirmation d'une activité de la sulfatase Q15XI1 sur du carraghénane, conduirait à l'existence probable de schémas similaires dans d'autres bactéries marines.

RESULTATS

Chapitre VI

*Mise en évidence d'enzymes
originales chez *P. atlantica* :
une α -carraghénane-sulfatase
et une β -carraghénase*

CHAPITRE VI

MISE EN ÉVIDENCE D'ENZYMES ORIGINALES CHEZ *P. ATLANTICA* UNE α -CARRAGHÉNANE-SULFATASE ET UNE β -CARRAGHÉNASE

INTRODUCTION

De manière générale, les unités α - et β -carrabioses sont moins prépondérantes dans les structures de carraghénanes que les unités κ - ou ι -carrabioses. Cependant, certaines espèces d'algues possèdent des teneurs importantes de ces motifs. C'est le cas de *Furcellaria lumbricalis* et de *Tichocarpus crinitus*, espèces que nous avons déjà évoquées dans le chapitre 3, dont les carraghénanes extraits sont des hybrides de κ -/ β -carraghénane, où les unités β -carrabioses peuvent dépasser les 50% (Yermak *et al.*, 1999 ; Correc *et al.*, 2012). Les unités α -carrabioses quant à elles, sont trouvées dans des structures hybrides de ι -/ α -carraghénane. Cet hétéropolymère particulier a fait notamment la réputation de l'espèce *Catenella nipae* Zanardini (Zabackis & Santos, 1986).

Sans doute en raison de la moins grande fréquence de ces motifs, les enzymes de modification agissant sur les structures α - et β -carrabioses n'ont pas encore fait l'objet d'étude. En effet, aucune α - ou β -carraghénase en encore une 2S- α -carraghénane-sulfatase n'est décrite dans la littérature à ce jour. Or, lors de la biodégradation des structures de κ - et de ι -carraghénane, il est fort probable que le processus passe par des structures intermédiaires présentant des motifs α - et β -carrabiose. Comme nous l'avons déjà évoqué, les bactéries

marines ont développé au cours de leur évolution, toute la « machinerie » nécessaire à la dégradation des polysaccharides d'algues, du polymère de structure complexe, jusqu'à la formation des nutriments essentiels pour leur survie. On peut donc supposer aisément de trouver chez ces dégradeurs marins toutes les enzymes agissant sur les carraghénanes, même sur des structures moins abondantes telles que le β - ou l' α -carrabiose.

Ainsi, en se focalisant sur une seule bactérie, dont la séquence génomique est disponible, en l'étudiant dans sa globalité, et en dévoilant petit à petit les différentes enzymes impliquées dans la biodégradation des carraghénanes, nous avons pu mettre en évidence de nouvelles enzymes, dont l'existence était supposée mais qui n'avait jamais été démontrée dans la littérature. En effet, dans ce chapitre seront présentées les différentes étapes qui ont permis d'établir qu'une 2S- α -carraghénane-sulfatase était impliquée dans le processus de dégradation du ι -carraghénane. Cette enzyme a été purifiée et une première identification du gène a été effectuée. De plus, en travaillant sur plusieurs structures de carraghénane en parallèle et en corrélant les différents résultats, nous avons pu acquérir la certitude de la présence d'une β -carraghénase chez *P. atlantica*.

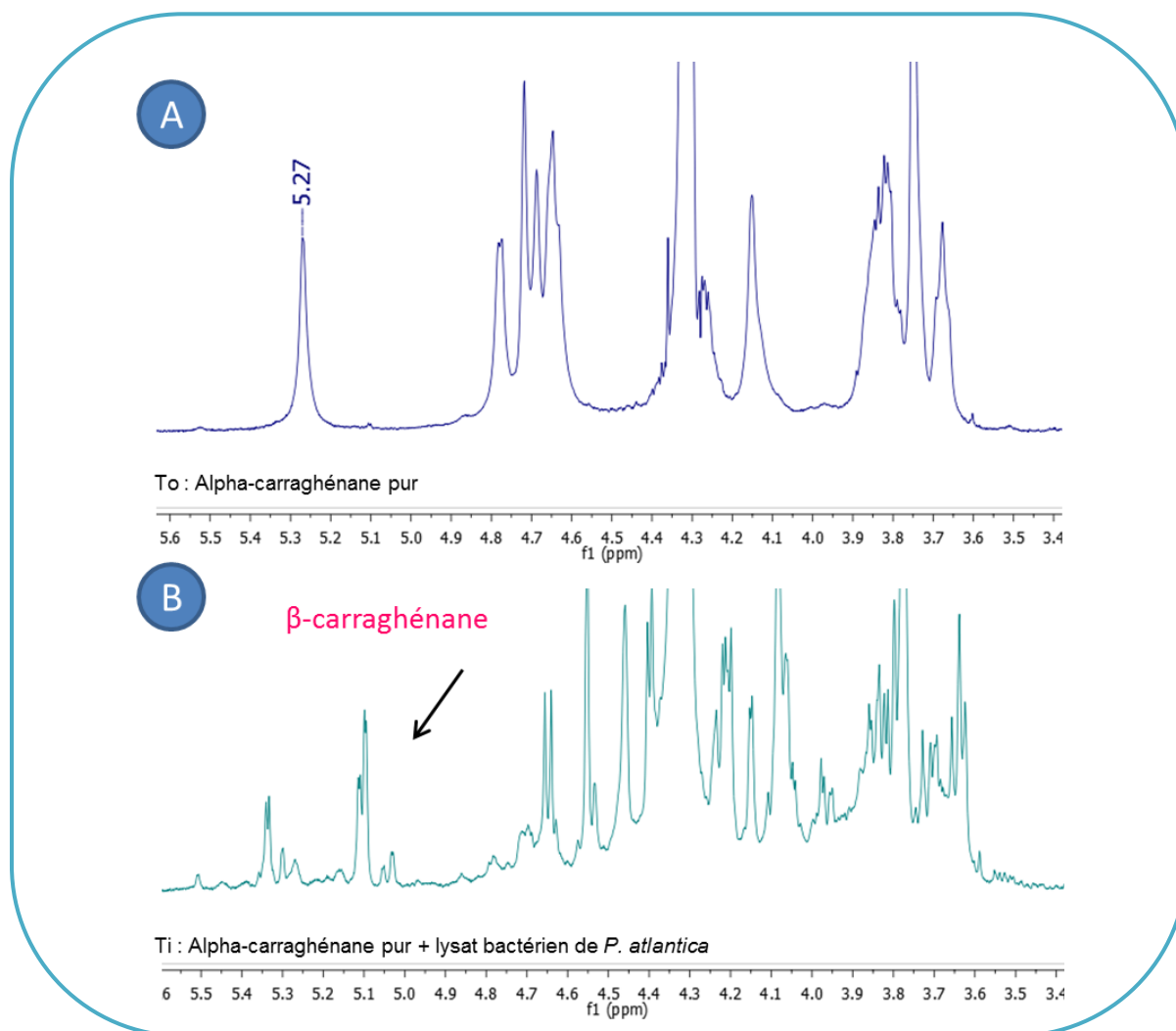


Figure 6-1 : Spectres RMN ^1H d' α -carraghénane pur (A) incubé avec le lysat bactérien de *P. atlantica* (B)

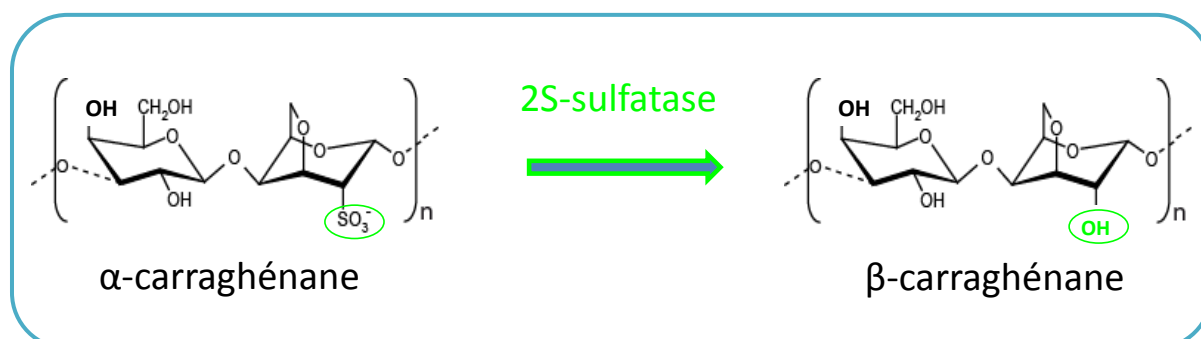


Figure 6-2 : Conversion des unités α -carrabiose en β -carrabiose sous l'action d'une 2S-carraghénane-sulfatase

RESULTATS

A. Identification d'une 2S- α -carraghénane-sulfatase

Il est important de souligner que le travail réalisé sur cette enzyme n'a pu être entrepris que grâce à la purification antérieure de la sulfatase Q15XH3. En effet, cette dernière, sous sa forme native, nous a permis de produire à partir du ι -carraghénane, de l' α -carraghénane pur à l'échelle du gramme. Grâce à ce nouveau substrat, inexistant comme homopolymère, nous avons pu entreprendre les tests d'activité pour la 2S- α -carraghénane-sulfatase.

A.1 Mise en évidence d'une 2S- α -carraghénane-sulfatase

Bien que la suspicion d'une sulfatase agissant sur de l' α -carraghénane était déjà bien forte après l'obtention des résultats RMN du criblage au début de cette thèse (**Chap. 1**), l'existence de cette enzyme fut démontrée en incubant le lysat bactérien de *P. atlantica* en présence d' α -carraghénane pur. Le milieu d'incubation fut d'abord analysé par HPAEC, révélant une quantité de sulfate libéré par la réaction, supérieure à 1000 $\mu\text{g/ml}$. Le milieu fut ensuite analysé par RMN ^1H , dévoilant la conversion du substrat (Figure 6-1). Ainsi un signal de proton anomérique autour de 5,1 ppm a permis d'affirmer la perte du sulfate de l'unité DA de motifs α -carrabiose et leur conversion en motifs β -carrabiose. L' α -carraghénane polymérique est transformé en oligo- β -carraghénanes après incubation avec le lysat bactérien de *P. atlantica*.

A.2 Purification partielle d'une 2S- α -carraghénane-sulfatase

La production de la 2S- α -carraghénane-sulfatase par la bactérie *P. atlantica*, a été induite par la présence de ι -carraghénane dans le milieu de culture. Le protocole de purification mis en œuvre a été réalisé à partir du milieu intracellulaire où l'activité lors du criblage fut visualisée. Une fois le culot bactérien lysé, l'extrait enzymatique a été dialysé

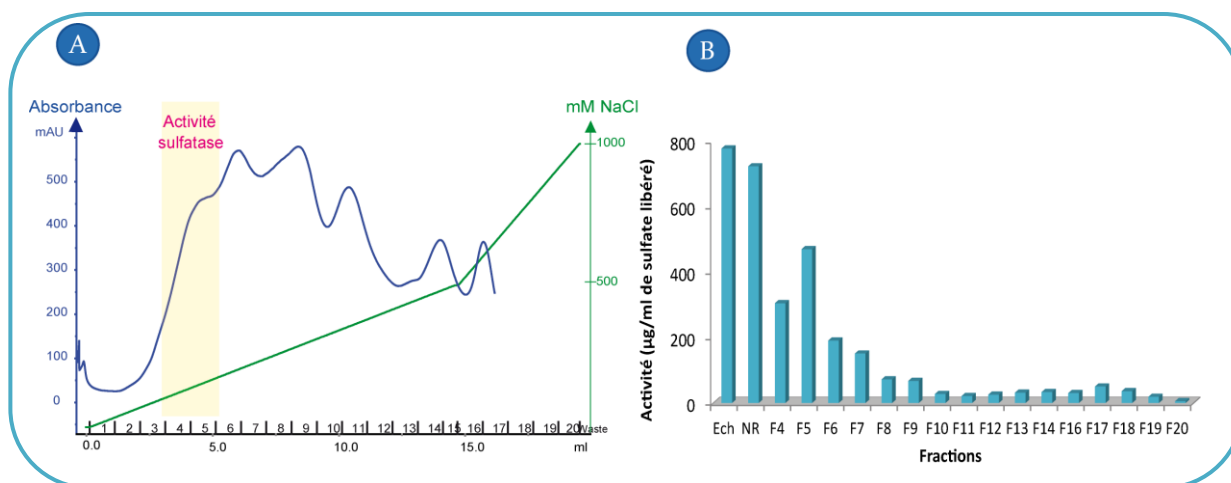


Figure 6-3 : Profil d'élution du lysat de *P. atlantica* sur une colonne d'héparine de 1 ml (A) et activités détectées dans les fractions correspondantes contre l' α -carraghénane (B)

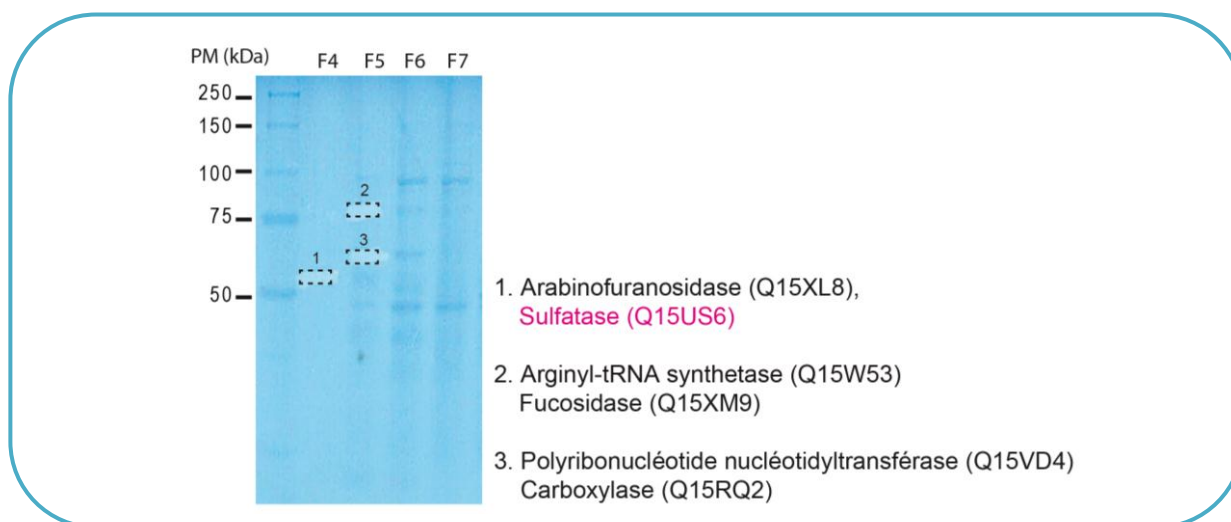


Figure 6-4 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de fractions collectées après la colonne d'héparine de 1 ml du lysat de *P. atlantica*

Séquence Q15US6

```

MMFNRTAMSR YLPLIMGVTA LSAVASACAV EHPLLKQQAS QKPNVVIFYV DDLGYGDISP
NGAIGVDPN LDALASKGVN FTDAHSTAST CTPSRYSLIT GEHGFRQNA ILPGDAPALI
RPGKATLPSM LQKAGYTTGV IGKWHLGLGE GSDVDWNQDVK PGPLEIGFDY SFLLPATGDR
VPTVYLEGHE VVNLESSDPI EVSYDHKVGD RPTGVDNPEL LRMKADLQHS QTIVNGISRI
GSMGGGEKAL WVDEEFPDVF SQKAVEFIER SKKDPFFLFF SFQDIHVPRP PNERFKGKST
MGPRGDAIAQ MDWVVGVMQ ALTTQGVADN TLVIFTSNG PVLDDGYDDM AAEMLGHEHP
AGPFRGGKYS VFEGGTRVPM IVYWPNGNTH IRSSALISQV DIYASLAGLV KQPLAKTEAI
DSLDMHAFI GKTNNARTYL LEEAVGTLGL RKHNWKYIKA ISKEKGLPNW LGNKDIEMGF
ALTPQLFDLT DDVGEQTNRA KDYPALVNAM EQKIQQDLIEK GFRYSQ
    
```

Figure 6-5 : Séquence d'acides aminés de la protéine Q15US6 (Uniprot) de *P. atlantica* T6c

Les séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse sont indiquées en rose. La séquence consensus requise pour la conversion en C α -formylglycine est surlignée en vert, et les acides aminés présents dans la séquence conservée sont surlignés en jaune.

contre le tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,0, sélectionné pour la purification. Le protocole qui nous a donné les meilleurs résultats, repose sur une étape de chromatographie effectuée sur une petite colonne d'affinité de 1ml constituée d'héparine. L'élution des protéines par un gradient croissant en NaCl, permet de fractionner l'extrait bactérien. L'activité sulfatase mesurée contre l' α -carraghénane est élue en début de gradient entre 100 et 150 mM de NaCl, et atteint 470 μ g/ml de sulfate libéré à son maximum (Figure 6-3). Cette unique étape amène au quasi-isolement (et parfois à son isolement) de la 2S- α -carraghénane-sulfatase. En effet, les fractions issues de cette purification montrent très peu de bandes protéiques sur gel d'électrophorèse. Cela nous a permis de réaliser des analyses en spectrométrie de masse, pour tenter d'identifier la protéine à l'origine de l'activité (Figure 6-4).

[A.3 Identification probable de la 2S- \$\alpha\$ -carraghénane-sulfatase](#)

La bande excisée dans la fraction 4, d'un poids moléculaire avoisinant les 55 kDa est composée majoritairement d'une arabinofuranosidase (Q15XL8) (Figure 6-4). Cependant, on trouve également la protéine Q15US6 (Uniprot) dont le gène (Patl_1842) a été annoté comme une sulfatase (Copeland *et al.*, 2006). Sept peptides couvrant 15% de la séquence de cette sulfatase à formylglycine de 57,6 kDa (Protein_ID ABG40362.1) ont été identifiés (Figure 6-5). Les bandes excisées de la fraction 5, sont composées d'une arginyl-tRNA synthétase (Q15W53) et d'une fucosidase (Q15XM9) pour celle de 70 kDa environ, et d'une polyribonucléotide nucléotidyltransférase (Q15VD4) et d'une carboxylase (Q15RQ2) pour celle avoisinant les 60 kDa.

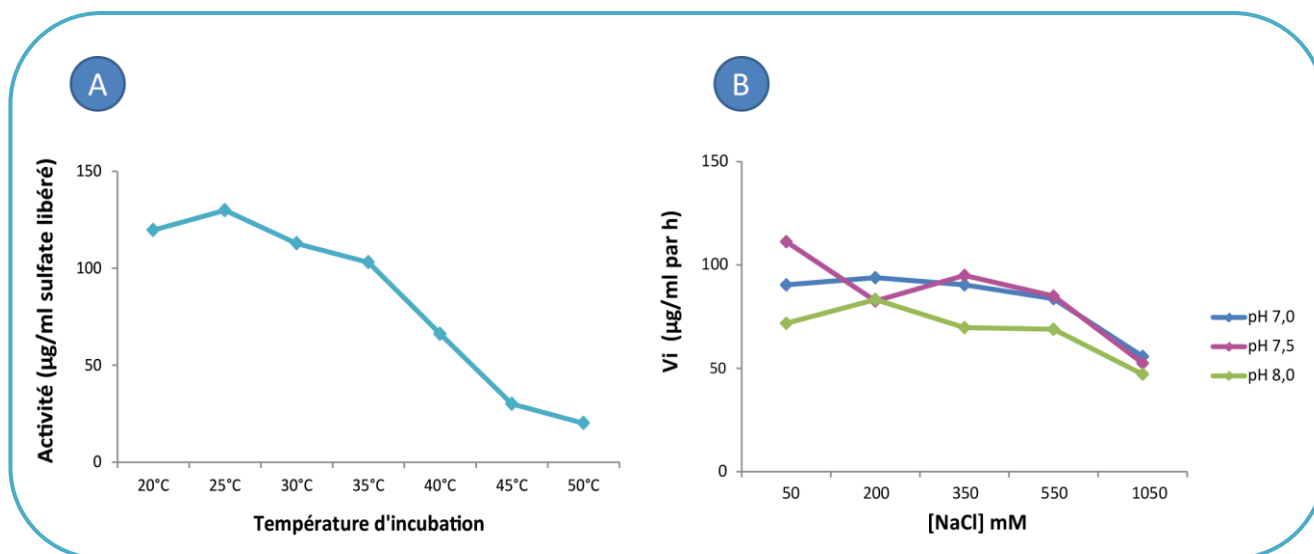


Figure 6-6 : Test de l'activité 2S- α -carraghénane-sulfatase en fonction de la température d'incubation (A), et du pH en fonction de la concentration en NaCl (B)

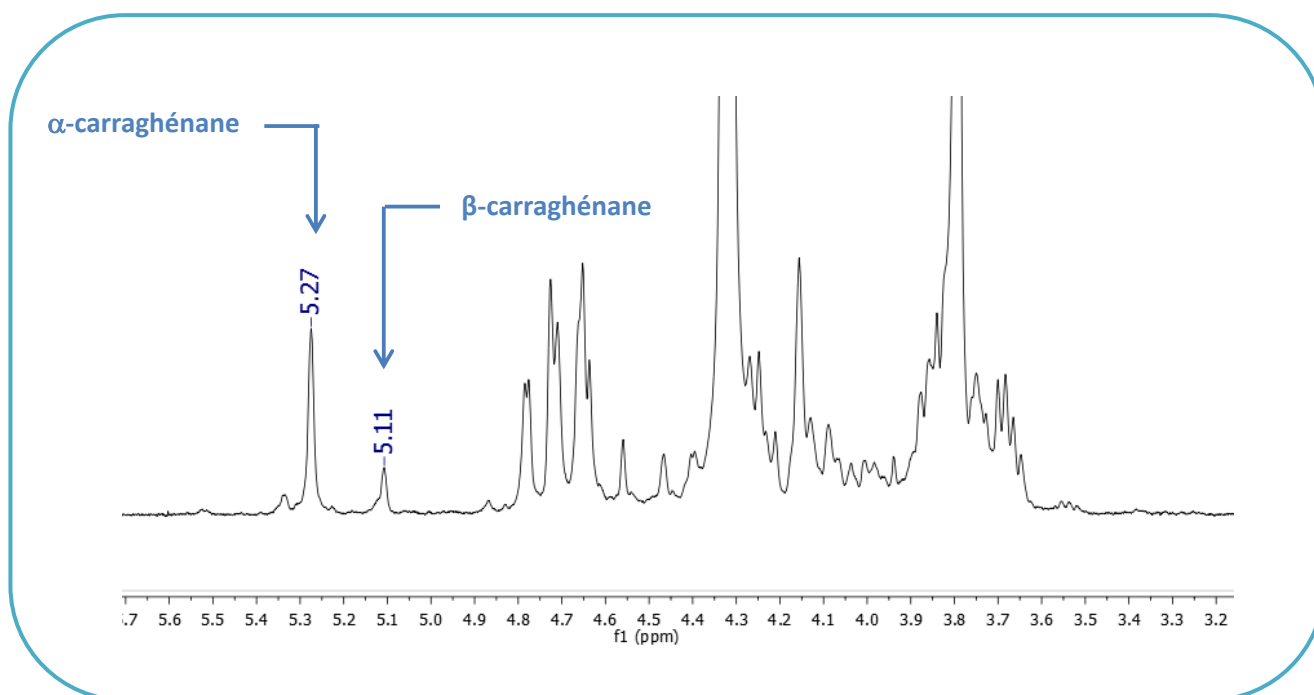


Figure 6-7 : Spectre ¹H-RMN d' α -carraghénane incubé avec la protéine Q15US6 purifiée

A.4 Caractérisation biochimique de la 2S- α -carraghénane-sulfatase

Une caractérisation biochimique approximative de la 2S- α -carraghénane-sulfatase a été réalisée en utilisant la fraction 4 issue de la purification sur colonne d'héparine. La température optimale de l'enzyme a été évaluée en incubant cette fraction en présence d' α -carraghénane pur à diverses températures. La condition la plus favorable fut relevée à 25°C (Figure 6-6A). Le pH optimal a été déterminé en incubant la sulfatase sur une gamme de concentration croissante en NaCl. Les résultats ont permis d'attribuer la condition optimale pour l'activité de désulfatation à un pH de 7,5 associé à une concentration de 50 mM NaCl (Figure 6-6B).

La désulfatation de l' α -carraghénane, comme celle du κ -carraghénane, conduit à sa conversion en β -carraghénane (Figure 6-7). En effet, les motifs α -carrabioses ne présentent qu'un seul groupement sulfate par unité disaccharidique, situé en position 2 de l'unité DA (figure 6-2). Par conséquent, la théorie suggère automatiquement la formation de β -carraghénane par clivage du sulfate. Le spectre RMN ^1H obtenu après incubation avec la protéine Q15US6 purifiée confirme cette conversion puisqu'on observe le signal du proton anomérique caractéristique du β -carraghénane à 5,12 ppm, en accord avec la littérature ([van de Velde et al., 2004](#)).

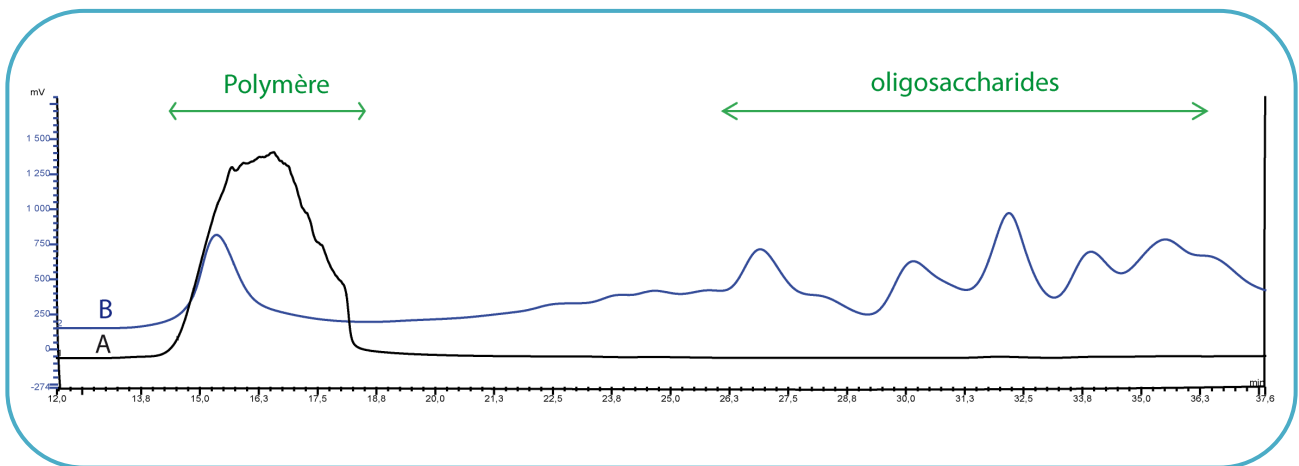


Figure 6-8 : Profil HPSEC de l' α -carraghénane (A) incubé avec le lysat bactérien de *P. atlantica* (B)

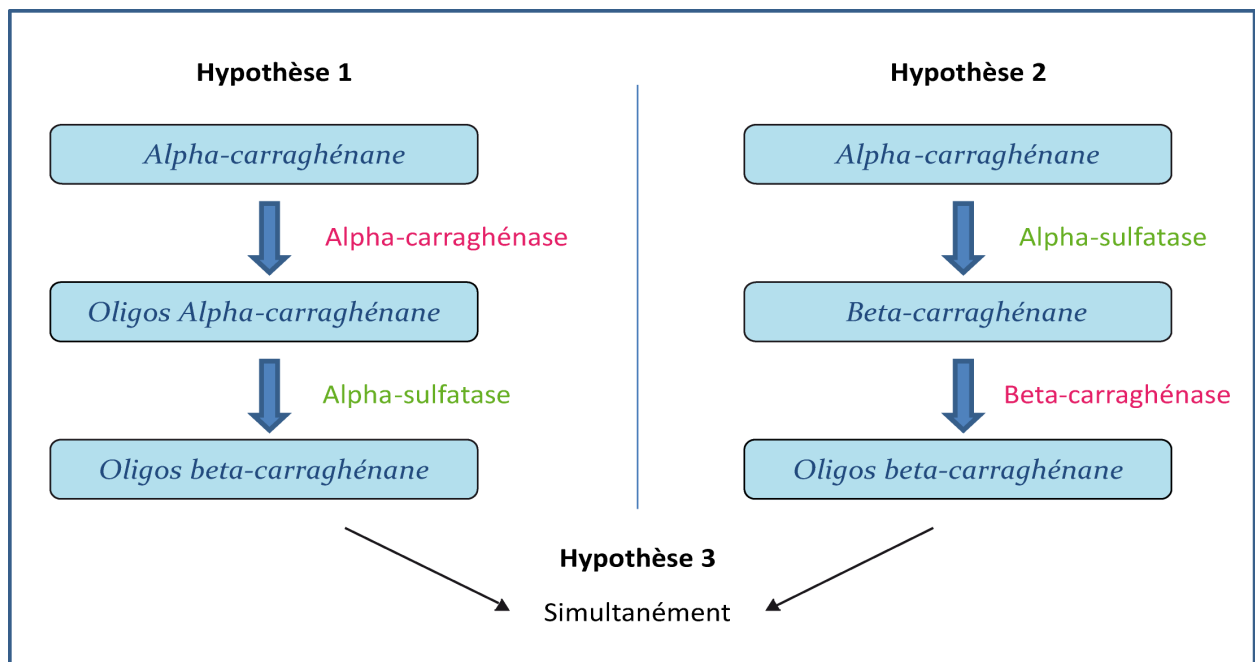


Figure 6-9 : Scénarios de dégradation de l' α -carraghénane par le lysat bactérien de *P. atlantica*

B. Mise en évidence d'une β -carraghénase

De nombreux résultats acquis lors des études de désulfatation des carraghénanes (voir chapitres précédents) suggèrent la présence d'une activité β -carraghénase dans la bactérie *P. atlantica*. Nous avons cherché à confirmer l'existence de cette enzyme.

*B.1 Dégradation de l' α -carraghénane par *P. atlantica**

L'incubation d' α -carraghénane pur en présence du lysat de *P. atlantica* entraîne un relargage de sulfate, car des unités α -carrabioses sont converties en β -carrabioses (**Chap VI. § A.**). L'analyse de ce milieu d'incubation par HPSEC montre également une dégradation très forte du substrat initial (Figure 6-8) confirmant la présence d'une carraghénase. En effet, la fraction résistante de polymère est très faible, et de nombreux oligosaccharides différents se sont formés. En raison du profil, ce chromatogramme suggère la formation d'oligosaccharides hybrides α -/ β -carrabioses.

Cependant, ce résultat n'est pas suffisant pour identifier de façon certaine la carraghénase mise en jeu. En effet, on ne peut savoir si c'est l' α -carraghénane qui est dépolymérisé par le biais d'une α -carraghénase, ou si l' α -carraghénane est désulfaté en β -carraghénane avant d'être dégradé par une β -carraghénase. Si la 2S- α -carraghénane-sulfatase suit le fonctionnement des sulfatases Q15XH3 et Q15XH1, il se pourrait en effet qu'elle soit capable de convertir les oligosaccharides autant que le polymère. Dans ce cas, les deux scénarios restent plausibles (Figure 6-9).

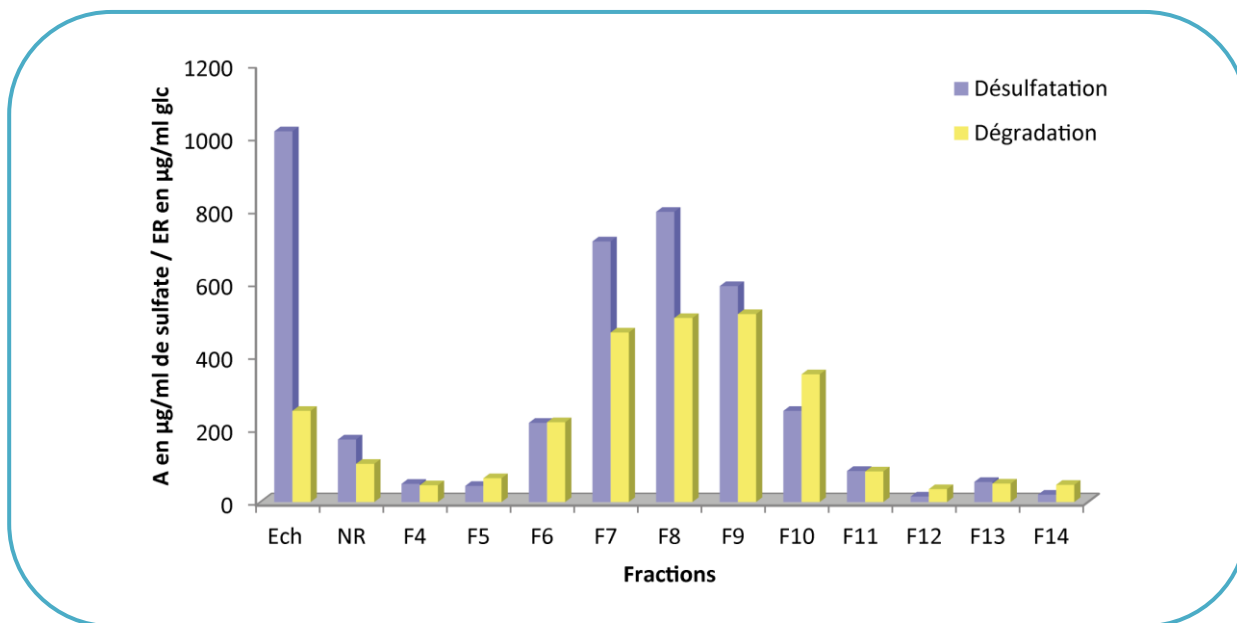


Figure 6-10 : Suivi des activités de désulfatation et de dégradation de l' α -carraghénane après fractionnement du lysat de *P. atlantica* sur une DEAE-Sépharose

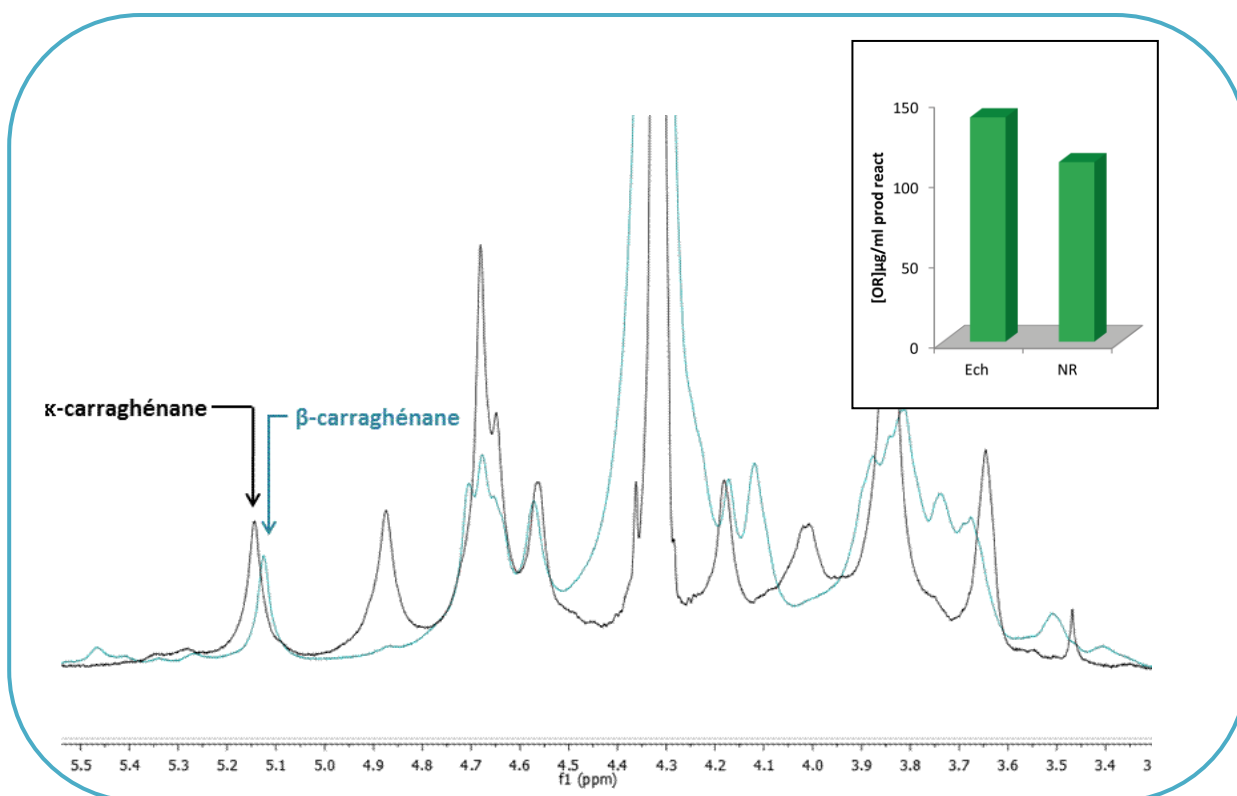


Figure 6-11 : Spectres ^1H -RMN de β -carraghénane (vert) préparé par voie chimique à partir de κ -carraghénane (noir)

Dans l'encadré : Mesure des extrémités réductrices formées après incubation du β -carraghénane préparé par voie chimique avec le lysat et le non retenu de la DEAE présentée à la figure 6-10

B.2 Corrélation des activités de désulfatation et de dégradation de l' α -carraghénane

Une purification sur colonne échangeuse d'anions a été effectuée pour fractionner le lysat de *P. atlantica*. Sur l'ensemble des fractions, les activités de désulfatation et de dégradation de l' α -carraghénane pur ont été testées. Pour cela, les milieux d'incubations ont été séparés en deux fractions. L'une a été analysée par HPAEC pour la mesure du sulfate libéré, et l'autre a permis de réaliser le dosage des extrémités réductrices formées lors de l'incubation. Ainsi, nous avons mis en évidence un phénomène important : la corrélation des deux activités (Figure 6-10). On ne peut pas exclure que les activités soient indépendantes, néanmoins on peut également faire l'hypothèse que pour mesurer la formation d'extrémités réductrices, il faut que le polymère ait été désulfaté. Dans ce cas, la carraghénase mise en jeu agirait sur le polymère de β -carraghénane, et non sur l' α -carraghénane.

B.3 Dégradation du polymère de β -carraghénane chimique par le lysat de *P. atlantica*

Nous sommes parvenus à nous procurer une légère quantité de β -carraghénane pur. Le polymère avait été préparé par désulfatation chimique de κ -carraghénane, par l'Ifremer de Brest (Plouzané, 29). Deux extraits, le lysat brut et le non retenu de la DEAE présentée à la Figure 6-10, ont été incubés en présence de ce β -carraghénane. Un dosage des extrémités réductrices produites a été réalisé, après 24h, sur les milieux d'incubation. Nous avons mesuré une activité de dépolymérisation de 150 μ g/ml d'extrémités réductrices formées dans l'échantillon de départ, équivalent à une Δ DO de 0,5 (Figure 6-11). Cette activité a été retrouvée dans le non-retenu de la DEAE avec une production en oses réducteurs légèrement inférieure. Ces résultats appuient l'existence d'une β -carraghénase dans le lysat de *P. atlantica*. Le temps limité de la durée de ces travaux de thèse n'ont pas permis d'aller plus loin pour l'identification et la caractérisation de cette polysaccharidase.

DISCUSSION

A. Existence d'une 2S- α -carraghénane-sulfatase dans *P. atlantica*

Dès la recherche de nouvelles carraghénane-sulfatases par le criblage au début de cette thèse, nous avons mis en évidence que le ι -carraghénane était désulfaté par la bactérie *P. atlantica* en deux substrats : l' α -carraghénane et un deuxième carraghénane, dont le déplacement chimique du proton anomérique se situait autour de 5,1 ppm. Dans un premier temps, nous avons interprété celui-ci comme étant du κ -carraghénane, mais les tests de dépolymérisation du substrat modifié avec la κ -carraghénase s'étant avérés négatifs, nous avons par la suite compris que l' α -carraghénane était lui-même désulfaté et produisait du β -carraghénane. Ce processus fut confirmé par la désulfatation d' α -carraghénane pur produit à partir de la sulfatase Q15XH3, par le lysat de *P. atlantica*.

Nous avons rencontré de grandes difficultés autour de la purification de cette 2S- α -carraghénane-sulfatase. En effet, cette enzyme est très « sensible ». Peu de tampons maintiennent son activité, de même qu'elle s'accroche sur très peu de colonnes. On peut noter le fait que, bien que notre enzyme se soit accrochée sur une colonne d'héparine de 1 ml, en revanche elle ne s'est pas accrochée sur une colonne prête à l'emploi de 20 ml. En conséquence, cette purification n'est pas vraiment aboutie. La bande excisée de la fraction 4 contient, en effet, majoritairement une autre protéine, identifiée comme une arabinofuranosidase. De plus, l'analyse des spectres RMN réalisés avec des fractions issues de la colonne d'héparine montrent régulièrement une activité de dépolymérisation. Néanmoins, la piste de l'identification de la 2S- α -carraghénane-sulfatase comme étant la protéine Q15US6 est intéressante. D'autant plus, que cette sulfatase ne fait pas partie du cluster de gènes des précédentes carraghénane-sulfatases caractérisées. L'identification de la 2S- α -carraghénane-sulfatase est donc à confirmer, par exemple par le biais de la surexpression de la protéine Q15US6, même si la surexpression des sulfatases peut se révéler délicate comme nous l'avons montré dans les chapitres précédents. Une autre possibilité consisterait à tenter d'induire la production de cette sulfatase native par son substrat naturel,

c'est-à-dire de partir d'une culture de *P. atlantica* cultivée dans un milieu contenant de l' α -carraghénane.

B. Mise en évidence d'une β -carraghénase dans *P. atlantica*

Beaucoup d'éléments vont dans le sens de l'existence d'une β -carraghénase dans la bactérie *P. atlantica*. La dégradation du β -carraghénane sur les spectres RMN ^1H démontrant les activités de la 4S- κ -carraghénane-sulfatase et de la 2S- α -carraghénane-sulfatase appuie fortement cette théorie. Si l'on ajoute à cela, la corrélation des activités de désulfatation et de dégradation de l' α -carraghénane, et les activités mesurées à partir du β -carraghénane obtenu par voie chimique, tous les résultats s'accordent pour conclure à l'existence de cette enzyme. Les résultats obtenus sur le polymère de β -carraghénane ne permettent pas à eux seuls de confirmer l'existence d'une β -carraghénase, car en raison de la très faible quantité que nous possédions, la dépolymérisation du substrat n'a pas pu être démontrée par HPSEC ou RMN. Le facteur limitant à l'étude d'une β -carraghénase est l'obtention de son substrat, c'est-à-dire le β -carraghénane pur. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence deux sulfatases capable de produire du β -carraghénane, mais celui-ci est, dans la majorité des cas, dégradé. En effet, il est difficile de purifier nos sulfatases en éliminant totalement l'activité de dégradation. Et lorsque nous y parvenons, la quantité d'enzyme résultante est insuffisante pour envisager la conversion totale du polymère en β -carraghénane. Les sulfatases Q15XH1 et Q15XG7 recombinantes pourraient permettre de résoudre le problème à condition de trouver l'origine de la dépolymérisation visualisée sur le spectre RMN. L'autre solution aurait été la production de β -carraghénane par voie chimique en quantité, cependant c'est un processus long, et par faute de temps, nous n'avons pu l'envisager sur la fin de cette thèse.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'existence d'une 2S- α -carraghénane-sulfatase ainsi que celle d'une β -carraghénase dans la bactérie marine *P. atlantica* ont pu être confirmées. Mais il reste du travail sur la purification et la caractérisation de ces enzymes, qui sont très intéressantes du fait de leur originalité. La surexpression de la sulfatase Q15US6 permettrait de confirmer l'identification potentielle de cette 2S- α -carraghénane-sulfatase. La purification de la β -carraghénase est envisageable après l'obtention préalable de β -carraghénane pur. Cette enzyme présente un grand intérêt car elle pourrait appartenir à une nouvelle famille de carraghénases.

DISCUSSION GÉNÉRALE

DISCUSSION GENERALE

A. Les bactéries marines : une source de sulfatases

L'annotation récente de génomes de bactéries marines a permis de mettre en évidence l'abondance des sulfatases dans des organismes également capable de dégrader les polysaccharides. On cite souvent le cas de la bactérie *Rhodopirellula baltica*, qui détient actuellement le record avec 104 sulfatases à formylglycine dans son génome (Glöckner *et al.*, 2003) et qui possède 42 gènes de glycoside-hydrolases et 5 gènes de polysaccharide-lyases. Mais on peut également parler de *Zobellia galactanivorans* qui détient 71 sulfatases à formylglycine avec 137 GH et 15 PL (Tristan Barbeyron, communication personnelle, travaux en cours de publication), ou même de *P. atlantica*, modèle de notre étude, dont le génome code pour 19 sulfatases à formylglycine et une seule sulfatase appartenant à la famille des β -lactamases, et présente 66 GH et 5 PL (Copeland *et al.*, 2006). Au début de ces travaux de thèse, aucune séquence de sulfatase active sur des polysaccharides marins n'était cependant décrite comme appartenant à la famille des formylglycines. Sur les 20 gènes annotés comme étant des sulfatases dans le génome de *P. atlantica*, nous avons attribué la fonction carraghénane-sulfatase de façon certaine à trois protéines (les Q15XH3, Q15XH1 et Q15XG7). Pour deux autres protéines (les Q15XH4 et Q15XI1) la libération de sulfate observée par chromatographie après incubation en présence de carraghénanes suggère également une fonction carraghénane-sulfatase, bien que la conversion n'a pu être validée par RMN. Une autre carraghénane-sulfatase, potentiellement identifiée comme correspondant à la protéine Q15US6 nécessiterait d'être surexprimée pour valider son identification. Finalement, ces travaux de thèse ont permis d'effectuer les premières étapes d'une caractérisation expérimentale pour peut-être déjà 6 carraghénane-sulfatases parmi les 19 sulfatases à formylglycine annotées chez *P. atlantica*. De plus, il faut prendre en compte que les sulfatases annotées dans les génomes sont celles à formylglycines car ce sont celles qui présentent les plus grandes homologies de séquences, mais il existe d'autres familles de sulfatases : les métallo- β -lactamases et les dioxygénases Fe(II)- α -kétoglutarate dépendantes. Sans compter les familles qui restent à découvrir, car la première carraghénane-sulfatase mise en évidence chez *P. carrageenovora* est le premier membre d'une nouvelle famille de sulfatases encore

non répertoriée (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2010). Il y a donc un très fort potentiel de découvertes de carraghénane-sulfatases chez les bactéries marines, et nous ne sommes qu'aux prémices de l'exploration de ces enzymes, et plus généralement des carbohydrate-sulfatases. Les algues étant une source de carbone naturelle pour les bactéries, il n'est finalement pas surprenant de rencontrer tant de sulfatases actives sur les polysaccharides algaux chez les bactéries marines.

Quelques expériences exploratoires avaient été réalisées au laboratoire sur les parois d'algues mais aucune sulfatase n'avait été mise en évidence. Ces résultats expérimentaux semblent en accord avec le séquençage récent du génome de *Chondrus crispus*, le premier génome d'algue rouge, ne montre aucune sulfatase de famille connue chez cette espèce (Jonas Collen, communication personnelle, travaux en cours de publication). La présence des sulfotransférases, comme celle des sulfurylases, a en revanche été confirmée. Ces données récentes suggèrent que les sulfatases, impliquées dans la biodégradation des carraghénanes, sont des enzymes sans doute moins fréquentes chez les algues que chez les bactéries.

B. Les sulfatases à formylglycine :

Des enzymes difficiles à surexprimer

Nous avons entrepris la surexpression des sulfatases cibles, d'une part pour valider la fonction des protéines identifiées par la purification, mais d'autre part pour exploiter les données de génomiques dans le but de trouver un maximum de carraghénane-sulfatases. En contraste avec les enzymes natives, purifiées à partir du surnageant et/ou du contenu cellulaire de *P. atlantica*, nous avons rencontré de grandes difficultés pour obtenir une activité de désulfatation de nos substrats par les protéines recombinantes. Les sulfatases à formylglycines sont des enzymes particulières, qui nécessitent une modification post-traductionnelle unique au niveau de leur site actif pour être actives (Schmidt et al., 1995 ; Dierks et al., 1998 ; Landgrebe et al., 2003) faisant intervenir des protéines de maturation. Chez les procaryotes, il existe trois systèmes de maturation différents pour rendre fonctionnelles les sulfatases : la FGE (*formylglycine generating enzyme*), l'AnSME (*Anaerobic Sulfatase Maturing Enzyme*)

et le système d'*E. coli* encore peu connu (Benjdia *et al.*, 2007). Nous avons interprété les faibles activités de nos sulfatases par une maturation insuffisante de nos protéines lors de la surexpression dans *E. coli*. Pour cette raison, nous avons tenté de pallier à ce problème en co-exprimant nos sulfatases avec les enzymes de maturation FGE et AnSME. Là encore, les sulfatases étaient très peu actives sur leur substrat naturel, c'est-à-dire directement sur le carraghénane. L'un des problèmes majeurs de la surexpression des sulfatases est que le mécanisme de maturation est encore relativement mal connu. Le processus de maturation avec les protéines FGE et AnSME fonctionne bien avec des peptides mais plus difficilement sur des protéines entières, ce qui implique que le mécanisme nécessite peut-être d'autres protéines supplémentaires.

Plusieurs stratégies pourraient être envisagées pour pallier au problème de maturation de nos sulfatases. D'une part, la co-expression a été effectuée sur deux plasmides différents : pFO4 pour la sulfatase et pRSFDuet-1 pour la protéine de maturation (FGE ou AnSME). Une première stratégie consisterait à co-exprimer les deux enzymes dans le même plasmide. L'action de la protéine de maturation sur la sulfatase pourrait ainsi être favorisée. D'autre part, nous avons constaté dans le cas de la sulfatase Q15XH1 (Chap III) que l'enzyme native avait été co-purifiée avec une chaperonine, dont la fonction est d'assister d'autres protéines dans leur maturation, en leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat. On peut donc supposer qu'elle aurait un rôle pour la maturation de la sulfatase Q15XH1, et que par conséquent, l'expression hétérologue en l'absence de la chaperonine conduirait à une sulfatase presque inactive. Il serait intéressant d'entreprendre des essais de co-expression de nos sulfatases avec la chaperonine de *P. atlantica*. Enfin, en réalisant des BLAST de la FGE bactérienne issue de *Mycobacterium tuberculosis* avec le génome de *P. atlantica*, nous avons pu observer une protéine homologue de cette FGE dans notre bactérie. Il s'agit de la protéine Q15T38 (Uniprot), annoté comme une protéine putative non caractérisée. Dans le doute que cette protéine soit impliquée dans le système de maturation des sulfatases de *P. atlantica*, la co-expression de cette protéine avec les sulfatases pourrait être une piste très intéressante. On se rapprocherait ainsi des conditions naturelles de maturation des sulfatases au sein de *P. atlantica*.

Les travaux décrivant les activités sulfatases font généralement appel à des substrats artificiels tels que la MUF-S, le *p*NPS (*p*-nitrophényl sulfate) (Kim *et al.*, 2005), le GALNS (4-méthylumbelliféryl- β -D-galactopyranoside-6-sulfate) (Rodríguez *et al.*, 2010), le SDS (Long *et al.*, 2011), voire des oligosaccharides préparés spécialement par synthèse chimique (Malleron *et al.*, 2012). La désulfatation de ces substrats artificiels présente l'avantage d'être détectée pour de faibles taux de conversion. Ceci explique que les essais de désulfatation de MUF-S avec les diverses carraghénane-sulfatases surexprimées aient toujours été positifs bien que la détection de la désulfatation sur les substrats carraghénanes soit plus difficile à observer. La désulfatation du substrat naturel par la sulfatase surexprimée demande une réplique exacte de la protéine dans ses conditions originelles qui n'est peut-être pas atteinte dans nos conditions.

La maturation des sulfatases à formylglycine n'est pas la seule complexité de ces protéines. Bien que les oligosaccharides ne soient pas indispensables à la maturation des protéines, ils jouent souvent un rôle crucial lors du repliement des glycoprotéines. Ainsi, il a été suggéré que le repliement correct des sulfatases pourrait être dépendant des chaînes de sucres (Buono & Cosma, 2010). Cela rajoute une difficulté supplémentaire à la surexpression des sulfatases, car un mauvais repliement de la protéine peut par conséquent entraîner la diminution, voire l'inactivité de l'enzyme.

On ne peut pas non plus ignorer la présence du TAG de la sulfatase recombinante, qui peut jouer un rôle sur l'activité de l'enzyme. Dans le cas des sulfatases appartenant à la famille des formylglycines, il se pourrait que ce dernier gène l'enzyme pour la reconnaissance du substrat, ou altère l'activité de désulfatation.

Nous devons cependant souligner l'exception de la sulfatase Q15XG7 au cours de cette thèse. En effet, nous avons obtenus des activités de désulfatation très importantes sur les oligo- κ -carraghénanes, autour de 1000 μ g/ml de sulfate libéré, par conséquent du même ordre que celles observées avec la sulfatase Q15XH3 native. En revanche, l'activité détectée sur le polymère est dix fois plus faible, autour de 100 μ g/ml de sulfate libéré. Ceci peut s'expliquer par l'accessibilité du substrat qui peut ici jouer un rôle sur la réactivité de l'enzyme. Nous avons relevé l'unique différence de la surexpression de la sulfatase Q15XG7 par rapport aux

autres sulfatases. N'ayant pas eu d'expression dans la souche BL21 (DE3), cette sulfatase a été insérée dans la souche d'expression Origami d'*E. coli*. Cette différence pourrait expliquer les activités observées avec cette sulfatase. Pour le savoir, il faudrait tester une autre sulfatase que nous avons exprimée en BL21 (DE3) en Origami cette fois pour comparer l'influence de la souche d'expression utilisée. Si cela n'augmente pas l'activité, le cas de la sulfatase Q15XG7 pourrait simplement être dû à cette protéine elle-même, car la surexpression des enzymes est extrêmement protéine-dépendante.

C. La biodégradation des carraghénanes par la bactérie

P. atlantica

Nous avons abordé cette thèse en réalisant un criblage de quatre bactéries marines. Après les résultats de ce crible nous avons fait le choix de focaliser notre étude sur le même organisme : la bactérie marine *P. atlantica*. Plusieurs raisons nous ont conduits à faire ce choix. D'une part, les activités lors du criblage étaient bien plus fortes que pour les autres bactéries. Ensuite, le génome de cette bactérie était séquencé, nous permettant de croiser nos informations expérimentales avec les données de génomiques. Par conséquent, ce choix facilitait notre étude. L'analyse des extraits bactériens de *P. atlantica* nous a vite fait prendre conscience du potentiel de cette bactérie, et de sa richesse enzymatique dédiée à la dégradation et à la modification des structures de carraghénanes. Ce choix avait par conséquent un double intérêt : caractériser de nouvelles carraghénane-sulfatases, qui était le but premier de cette thèse, mais aussi découvrir le système carraghénolytique de la bactérie marine *P. atlantica*.

L'unique modèle de dégradation de carraghénane, proposé sur la base des travaux menés sur la bactérie *P. carrageenovora*, suggérait que les sulfatases agissaient après l'action des carraghénases. A la différence des travaux antérieurs, nous avons démontré l'existence de

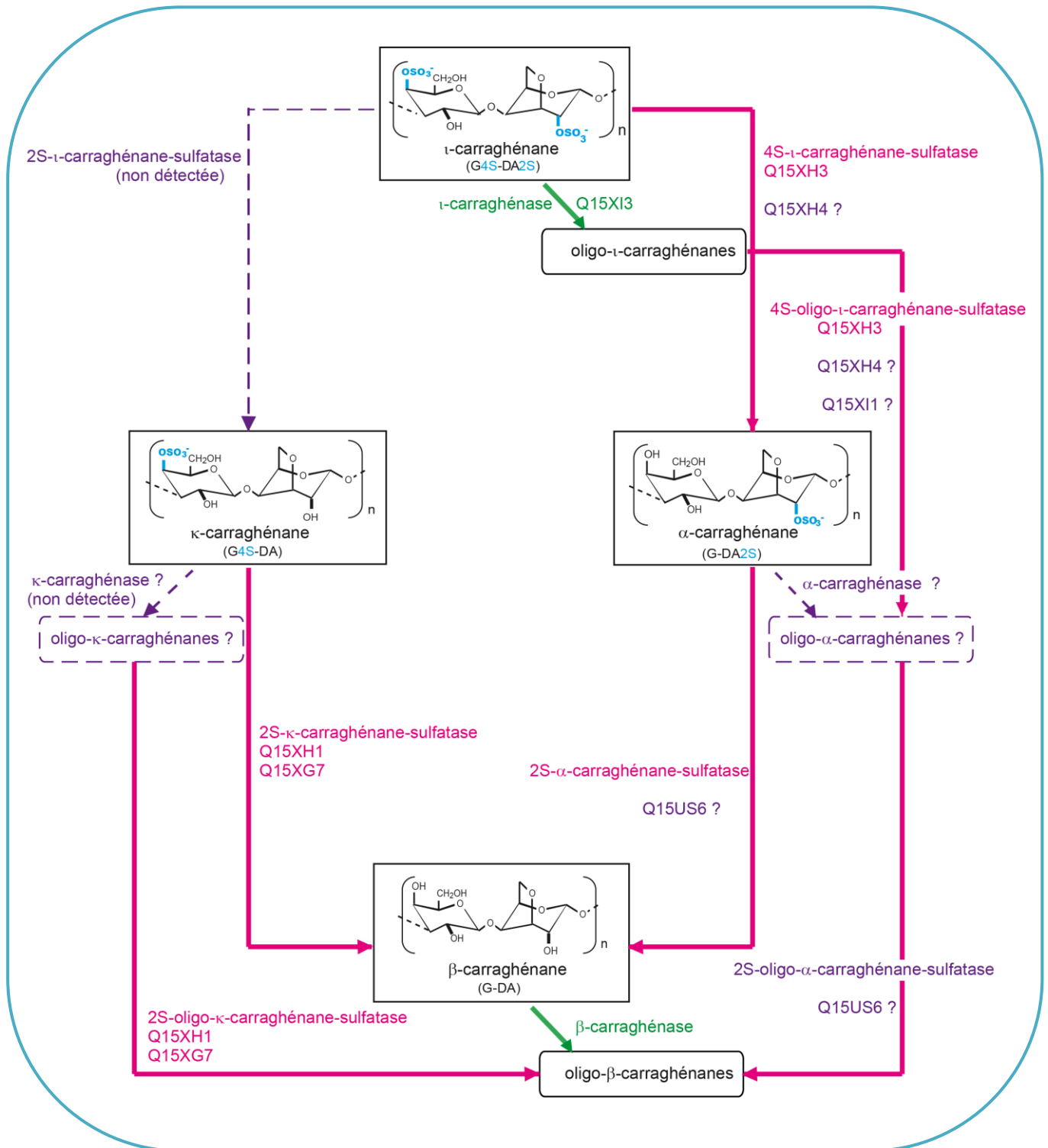


Figure DG-1 : Voies de dégradation des carraghénanes par la bactérie *P. atlantica*

Les carraghénanes sulfatases sont indiquées en rose. Les carraghénases sont indiquées en vert. Les voies et les enzymes hypothétiques sont illustrées avec des lignes pointillées en violet.

sulfatases agissant sur des polymères et mis en évidence chez *Pseudoalteromonas atlantica* une nouvelle carraghénase spécifique aux polymères désulfatés (β -carraghénase). Par conséquent, il existe deux schémas de biodégradation des carraghénanes : l'un faisant intervenir en premier lieu une carraghénase sur le polymère, puis une ou plusieurs sulfatases agirai(en)t ensuite sur les oligosaccharides pour en retirer le(s) groupement(s) sulfate. C'est notamment le cas de la dégradation du κ -carraghénane par la bactérie marine *Pseudoalteromonas carrageenovora* (Figure IG-26). Après l'intervention d'une κ -carraghénase, les oligo- κ -carraghénanes formés sont désulfatés en oligo- β -carraghénanes par l'action d'une glycosulfatase (McLean *et al.*, 1979a ; McLean *et al.*, 1979b ; McLean *et al.*, 1981). Le deuxième schéma de dégradation, que nous avons mis en évidence dans nos travaux, ferait intervenir une sulfatase en première étape, puis une carraghénase dépolymériserait le nouveau polysaccharide ainsi formé. C'est le cas de la dégradation du κ -carraghénane par la bactérie marine *Pseudoalteromonas atlantica* cette fois, où le κ - est d'abord désulfaté en β -carraghénane (Préchoux & Helbert, 2012 – Brevet EP 12/306384), puis une β -carraghénase interviendrait conduisant à la production d'oligo- β -carraghénanes (Figure DG-1). Par conséquent, pour un même produit de départ, le κ -carraghénane, et les mêmes produits finaux, les oligo- β -carraghénanes, on peut avoir deux voies de dégradation différentes en fonction de l'organisme considéré.

Le schéma présenté à la figure DG-1 regroupe l'ensemble des données enzymatiques acquises au cours de cette thèse sur la bactérie *P. atlantica*. Ce schéma permet de constater rapidement la complexité de la biodégradation des carraghénanes, par le nombre d'enzymes impliquées dans le processus. L'existence de certaines structures intermédiaires reste incertaine, comme celle des oligo- κ -carraghénanes et des oligo- α -carraghénanes, bien que des sulfatases de *P. atlantica* puissent agir sur ces structures. En effet, la conversion des oligo- κ -carraghénanes en oligo- β -carraghénanes par la sulfatase Q15XG7 a été démontrée de façon certaine par les analyses RMN. On observe, pour la plupart des carraghénane-sulfatases, la faculté d'agir sur des oligosaccharides aussi bien que sur des polymères, en accord avec le caractère endo- des enzymes étudiées, dévoilant une certaine flexibilité de leur site actif. Par conséquent, plusieurs voies de dégradation s'effectuent en parallèle, comme pour le cas du ι -carraghénane. Il peut en effet être dépolymérisé en oligo- ι -carraghénanes par la ι -carraghénase Q15XI3, et ceux-ci être désulfaté par la sulfatase Q15XH3 (et potentiellement

par les sulfatases Q15XI1 et Q15XH4). Mais le ι -carraghénane peut également être dégradé par le biais d'une désulfation du polymère en α -carraghénane *via* la Q15XH3 à nouveau, et ce substrat peut lui-même, soit être converti en β -carraghénane par la sulfatase Q15US6, soit être dépolymérisé par une α -carraghénase potentielle. Plus simplement, plusieurs scénarios coexistent et se croisent. Par contre, il semble que la structure du β -carraghénane, et/ou des oligos- β -carraghénanes, soit la finalité de la dégradation des structures de carraghénanes, avant la prise en charge du sucre par les enzymes impliquées dans le métabolisme du D-galactose.

Des analyses préliminaires de bio-informatique sur les peptides signaux de nos sulfatases, ont permis de révéler qu'elles étaient toutes des protéines membranaires excepté la sulfatase Q15XI1 qui serait intracellulaire. Ces analyses sont en accord avec nos résultats expérimentaux puisque toutes nos sulfatases semblent être actives sur du polymère et des oligosaccharides, à l'exception de la sulfatase Q15XI1 uniquement active sur les oligo- ι -carraghénanes. Il serait en effet difficile à la cellule d'intégrer du polymère pour le désulfater

D. Une organisation en cluster des enzymes actives sur les carraghénanes

La purification des deux premières carraghénane-sulfatases a révélé l'existence d'un cluster de gènes impliqués dans la biodégradation des carraghénanes. En effet, ce groupe de gènes est constitué, en plus des carraghénane-sulfatases, de deux protéines hypothétiques mais surtout de protéines impliquées dans le métabolisme du D-galactose. Cette observation suggère fortement que l'ensemble des gènes présents dans ce cluster s'organisent de façon groupée et colinéaire pour effectuer une même voie catabolique : celle de la dégradation des carraghénanes. On note que le cluster n'est pas spécifique à une structure de carraghénane. On trouve en effet au sein du même cluster, des sulfatases agissant sur le κ -carraghénane et le ι -carraghénane. Bien que ce dernier pourrait être converti en κ -carraghénane par une sulfatase qui n'a cependant pas été détectée. Néanmoins, il semblerait que la dégradation des κ - et ι -carraghénanes s'effectue par des voies distinctes (Figure DG-1). Malgré de nombreux essais,

nous ne sommes effectivement pas parvenus à détecter une sulfatase permettant de convertir les unités ι -carrabiose en κ -carrabiose. Un deuxième cluster au sein de *P. atlantica* pourrait être impliqué dans la dégradation des carraghénanes. Il s'agit du cluster de la ι -carraghénase. Les résultats préliminaires de la surexpression de la sulfatase présente dans ce cluster semblent converger vers cette idée, avec une désulfatation probable du ι -carraghénane. Comme nous l'avons évoqué précédemment, ces résultats demeurent cependant à confirmer.

Cette organisation des enzymes dédiées aux carraghénanes en cluster pourraient permettre de découvrir de nouvelles enzymes actives sur ces polymères. Et notamment de nouvelles carraghénases, telles que l' α - et la β -carraghénase. Ces enzymes sont des outils indispensables pour continuer les analyses structurales des carraghénanes.

L'étude récente du système alginolytique de *Z. galactanivorans*, a mis en avant l'existence de clusters impliqués dans la biodégradation de l'alginate au sein de cette bactérie (Thomas, 2011). Il semblerait que nous soyons dans le même cas de figure avec la bactérie *P. atlantica* pour la dégradation des carraghénanes.

Par ailleurs, le système carraghénolytique de *P. atlantica*, organisé en cluster, pourrait être un modèle retrouvé chez d'autres bactéries marines. Nous avons ainsi observé que le cluster dédié aux carraghénanes dans *P. atlantica* était conservé chez d'autres bactéries marines, comme par exemple *Cellulophaga algicola*.

E. *P. atlantica* : un nouveau modèle de « dégradeur » des carraghénanes ?

Les résultats mis en avant au cours de cette thèse ont permis de dévoiler le formidable arsenal enzymatique de dégradation des carraghénanes de la bactérie *P. atlantica*. En plus de l'existence de plusieurs carraghénane-sulfatases, nous avons démontré la présence de deux carraghénases. Nous avons illustré précédemment, que ces différentes enzymes s'associent et que les mécanismes se croisent pour dégrader les différentes structures de carraghénanes.

L'organisation des gènes au sein du génome a révélé la capacité de *P. atlantica* à prendre en charge les différentes structures de carraghénane. Cette bactérie a donc développé toute la machinerie nécessaire pour dégrader ces polysaccharides d'algues rouges et les utiliser comme source de carbone. La caractérisation expérimentale de ce cluster ouvre la voie à des études similaires sur d'autres substrats. On peut effectivement imaginer que cette bactérie présente l'équipement nécessaire à dégrader d'autres polysaccharides marins, comme par exemple l'alginate des algues brunes.



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PESPECTIVES

L'objectif de ce travail était de caractériser des carraghénane-sulfatases afin de pouvoir modifier et contrôler la structure des polymères de carraghénanes. Cette étude avait pour finalité de nouvelles utilisations biotechnologiques de ces polysaccharides d'algues rouges, en créant de nouvelles propriétés rhéologiques indépendantes de l'origine botanique des algues. Au début de ce projet en octobre 2009, très peu de données étaient disponibles sur les carraghénane-sulfatases, et aucune n'était répertoriée dans la famille des sulfatases à formylglycines. Nous avons donc ouvert la voie sur le potentiel de découverte de sulfatases actives sur des carbohydrates d'origine marine au sein des bactéries marines, et plus précisément dans la famille des sulfatases à formylglycine. En focalisant notre étude de recherche de carraghénane-sulfatases sur une seule bactérie, *P. atlantica*, nous avons pu commencer à lever un voile sur les mécanismes de dégradation des carraghénanes par cet organisme.

A. De la fonction au gène, du gène à la fonction : deux stratégies complémentaires

Nous avons abordé ces travaux de thèse en s'appuyant sur l'activité des carraghénane-sulfatases pour remonter à l'identification des gènes de ces enzymes. Deux carraghénane-sulfatases étaient décrites au commencement de ces travaux : une 4S-oligo- κ -carraghénane-sulfatase (McLean & Williamson, 1979a ; Kim *et al.*, 2004) et une 4S-t-carraghénane-sulfatase (Genicot-Joncour & Helbert, Brevet FR 09/52642, 2010), toutes deux purifiées à partir de la bactérie marine *P. carrageenovora*. Dans le cas de la première, le gène n'a jamais été séquencé. Dans le cas de la seconde, le séquençage a révélé que cette sulfatase n'appartenait à aucune des trois familles décrites dans la littérature, et qu'elle constituait de ce fait le premier membre d'une nouvelle classe de sulfatase. Comme nous l'avons déjà évoqué,

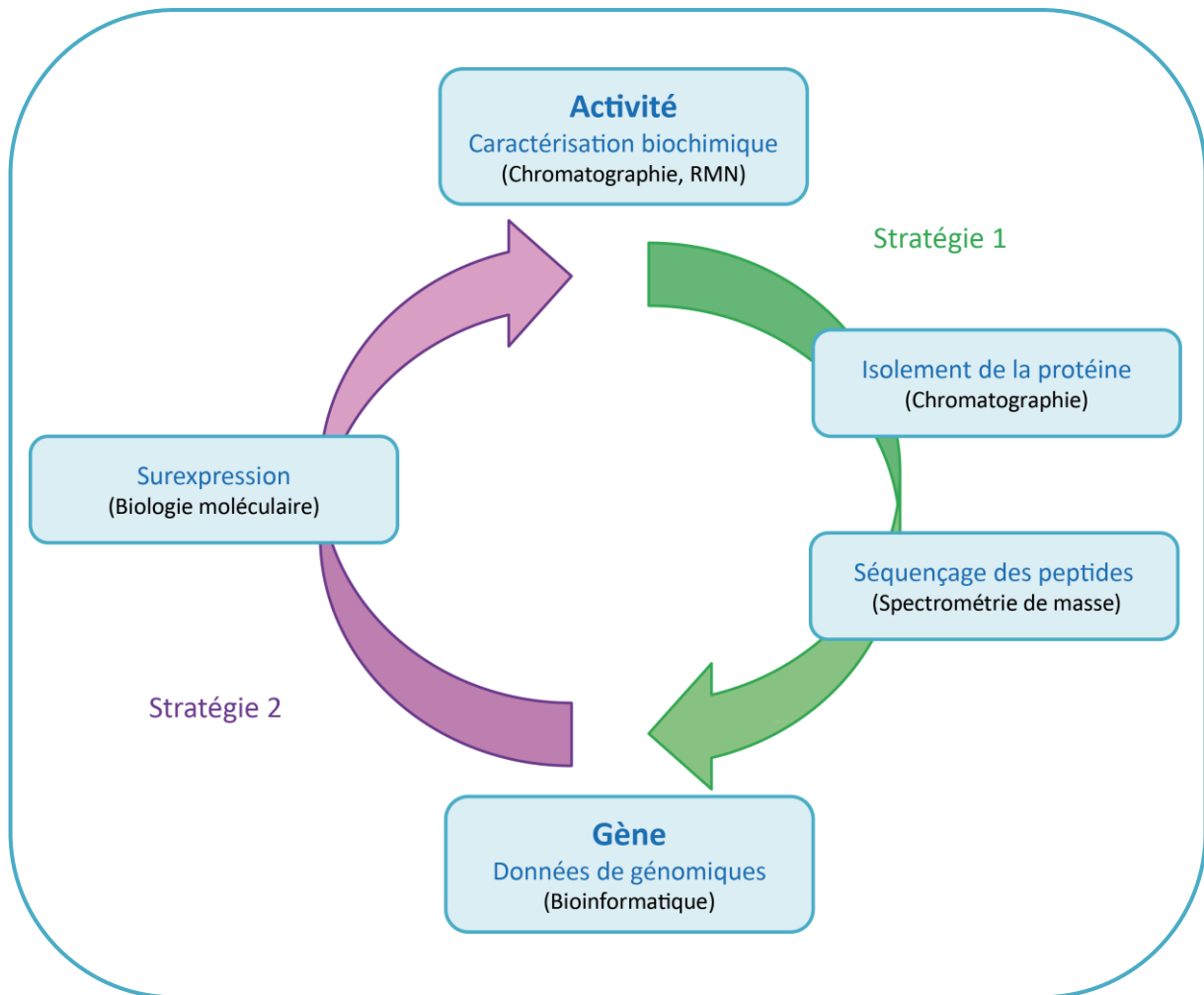


Figure CP-1 : Schématisation des deux stratégies utilisées au cours de cette thèse pour associer une activité à son gène

les bactéries marines possèdent généralement de nombreux gènes codant pour des sulfatases, dont la plupart appartiennent à la famille des formylglycines. Aucune information ne permettait donc à ce stade de déterminer quels gènes de sulfatases au cœur d'un génome étaient susceptibles d'être actifs sur du carraghénane. Pour cette raison, et parce que toutes les bactéries marines n'ont pas leur génome de séquencé, la recherche de carraghénane-sulfatases fut abordée par un criblage, en se basant par conséquent sur l'activité de ces enzymes. Cette stratégie, qui consiste à isoler l'activité enzymatique jusqu'au séquençage de la protéine (Stratégie 1 – Figure 1), présente notamment l'avantage de travailler sans *a priori*. En effet, bien que l'annotation des génomes et le classement des enzymes dans la base de données CAZy sont des outils essentiels. Cependant la classification dans des familles de protéines ne permet pas de conclure nécessairement à la fonction catalytique. Rechercher des enzymes sans *a priori* est également la meilleure chance de découvrir de nouvelles familles d'enzymes, qui seront par conséquent éloignées d'un point de vue homologie de séquences des familles déjà répertoriées. La purification des enzymes natives est une technique qui met en avant l'activité que l'on recherche, c'est-à-dire une fonction spécifique sur un substrat choisi. Dans le cas d'enzymes difficiles à surexprimer, comme les sulfatases, la purification de l'enzyme native permet l'étude de ces protéines, leur caractérisation biochimique et la détermination de leur mode d'action. Mais cette stratégie a aussi ces limites, comme nous l'avons illustré avec le cas de la α -carraghénase de *P. atlantica*. La mise en œuvre des protocoles de purification d'enzymes natives est en grande partie empirique. En effet, comme on ne connaît pas forcément le type de protéine que l'on purifie, la multiplication des différentes conditions (colonne de purification, pH, gradient d'élution...) est indispensable pour parvenir à l'isolement de l'enzyme. Il arrive que l'on parvienne à fractionner considérablement l'extrait, et que seules quelques bandes soient visibles sur le gel d'électrophorèse. Le séquençage du génome de l'organisme étudié devient alors une aide précieuse. En effet, en s'appuyant sur les prédictions des fonctions des protéines, on peut ainsi parvenir à identifier le gène de l'activité purifiée. A cours de cette thèse, la purification des sulfatases natives Q15XH1 et Q15XH3 nous a conduits à nous intéresser à l'environnement génomique de notre sulfatase. Nous avons ainsi découvert une organisation en cluster des enzymes impliquées dans la biodégradation des carraghénanes. Nous avons alors entrepris la stratégie inverse à la première pour continuer notre exploration de nouvelles carraghénane-sulfatases, c'est-à-dire partir des gènes codant pour des sulfatases dans le but de trouver une activité sur du

carraghénane (Stratégie 2 – Figure 1). Bien que nous ayons rencontré de grandes difficultés avec la surexpression des sulfatases, cette stratégie s'est aussi révélée payante et peut être relativement rapide, comme l'a montré le cas de la sulfatase Q15XG7. Finalement, les travaux de cette thèse illustrent clairement la nécessité d'utiliser des deux stratégies pour identifier de nouvelles enzymes : d'une part, celle de partir de l'activité d'une enzyme pour remonter à son identification par son isolement, et d'autre part, celle d'utiliser les données de génomiques pour valider une fonction et trouver le substrat d'action d'une protéine.

B. Des sulfatases pour modifier les carraghénanes

Les travaux de cette thèse ont conduit à l'identification de plusieurs carraghénane-sulfatases. Nous sommes à présent en mesure de contrôler l'hybridité de certaines structures, voir d'en créer de nouvelles. Les exemples de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase et de la 2S- κ -carraghénane-sulfatase confirment que les sulfatases peuvent être utilisées pour contrôler la structure des polymères et en modifier leurs propriétés rhéologiques. De la même façon, les C5-épipimérasés ont été utilisés pour contrôler la composition et la distribution des acides mannuroniques et guluroniques le long de la chaîne polysaccharidique des alginate (Steigedal *et al.*, 2008). De même, les propriétés gélifiantes des pectines peuvent être modifiées en contrôlant leur méthylation par utilisation de méthyl-estérases (Jolie *et al.*, 2010). Dans le cas des carraghénanes, les galactose-6-sulfurylases, qui catalysent la formation du pont 3,6-anhydro sur l'unité galactose liée en $\beta(1-4)$, ont montré qu'elles pouvaient améliorer les propriétés de gélification du ι -carraghénane (Genicot-Joncour *et al.*, 2009).

La première carraghénane-sulfatase que nous avons purifiée et identifiée a fait l'objet d'un dépôt de brevet en raison de son fort potentiel à visée biotechnologique (Préchoux *et al.*, WO 2012/049437 A2). La 4S- ι -carraghénane-sulfatase Q15XH3 permet de produire des hybrides ι -/ α -carraghénane avec des ratios contrôlés des différentes unités. Mais le principal atout de cette enzyme réside dans sa capacité à produire de l' α -carraghénane pur, un polymère de structure idéale, dont les propriétés rhéologiques ont été très peu étudiées. Il est à présent possible d'étudier cette molécule modèle afin de découvrir son réel potentiel industriel. Dans

cet optique, nous avons entrepris la préparation de molécules à l'échelle du gramme afin d'engager des études de rhéologies. Les premiers échantillons ont été transmis à un industriel. A partir d'oligo- ι -carraghénanes, la sulfatase Q15XH3 est également capable de produire de nouveaux oligosaccharides : des oligo- α -carraghénanes. Bien que les perspectives industrielles des oligosaccharides soient moins probables, les propriétés biologiques des oligo- α -carraghénanes pourraient être étudiées. En outre, en raison de son caractère endo, la sulfatase Q15XH3 nous a permis de préparer de nouvelles structures de carraghénanes inédites tels que des hybrides κ - ι - α - et κ - α -carraghénane. Ces nouveaux polymères pourraient présenter de nouvelles propriétés fonctionnelles et méritent également que l'on s'y intéresse.

La 4S- κ -carraghénane-sulfatase Q15XH1 a également fait l'objet d'une demande de valorisation. Cette enzyme semble permettre de produire des analogues du κ - β -carraghénane extrait de l'algue *Tichocarpus crinitus* qui permet de faire des gels élastiques (Nagorskaia *et al.*, 2008). La sulfatase Q15XH1 permet de produire des hybrides avec des ratios contrôlés en unités κ - et β -carrabioses. Dans l'idéal, bien que nous n'ayons pas été en mesure de le démontrer, cette sulfatase pourrait produire du β -carraghénane pur comme molécule modèle. Le β -carraghénane est un polymère proche de l'agarose et qui a montré des propriétés de gélification en raison du pont 3,6-anhydro. Ce polymère n'est cependant pas iono-dépendant. La sulfatase Q15XH1 accepte également dans son site actif des oligosaccharides, permettant la réalisation d'oligo- β -carraghénane. Les études préliminaires sur le mode d'action de la sulfatase Q15XH1 suggèrent un caractère endo-processif de l'enzyme. Dans ce cas, il serait possible par conversion d'un hybride de κ - ι -carraghénane de produire de nouvelles structures comme des hybrides κ - ι - β - et ι - β -carraghénane. Là encore, des études de rhéologie pourraient être entreprises. Au final, on peut aussi envisager de combiner les différentes sulfatases, et préparer des structures composées des unités κ -, ι -, β - et α -carrabioses.

A l'évidence, l'obtention des sulfatases recombinantes actives offrirait aux carraghénane-sulfatases un avenir industriel plus certain pour des applications biotechnologiques. En effet, elle permettrait d'avoir les enzymes en quantité et par un procédé plus simple que la purification de l'enzyme native. De plus, on éliminerait ainsi les carraghénases contaminantes de la voie native. Dans ce but, les études de surexpression des

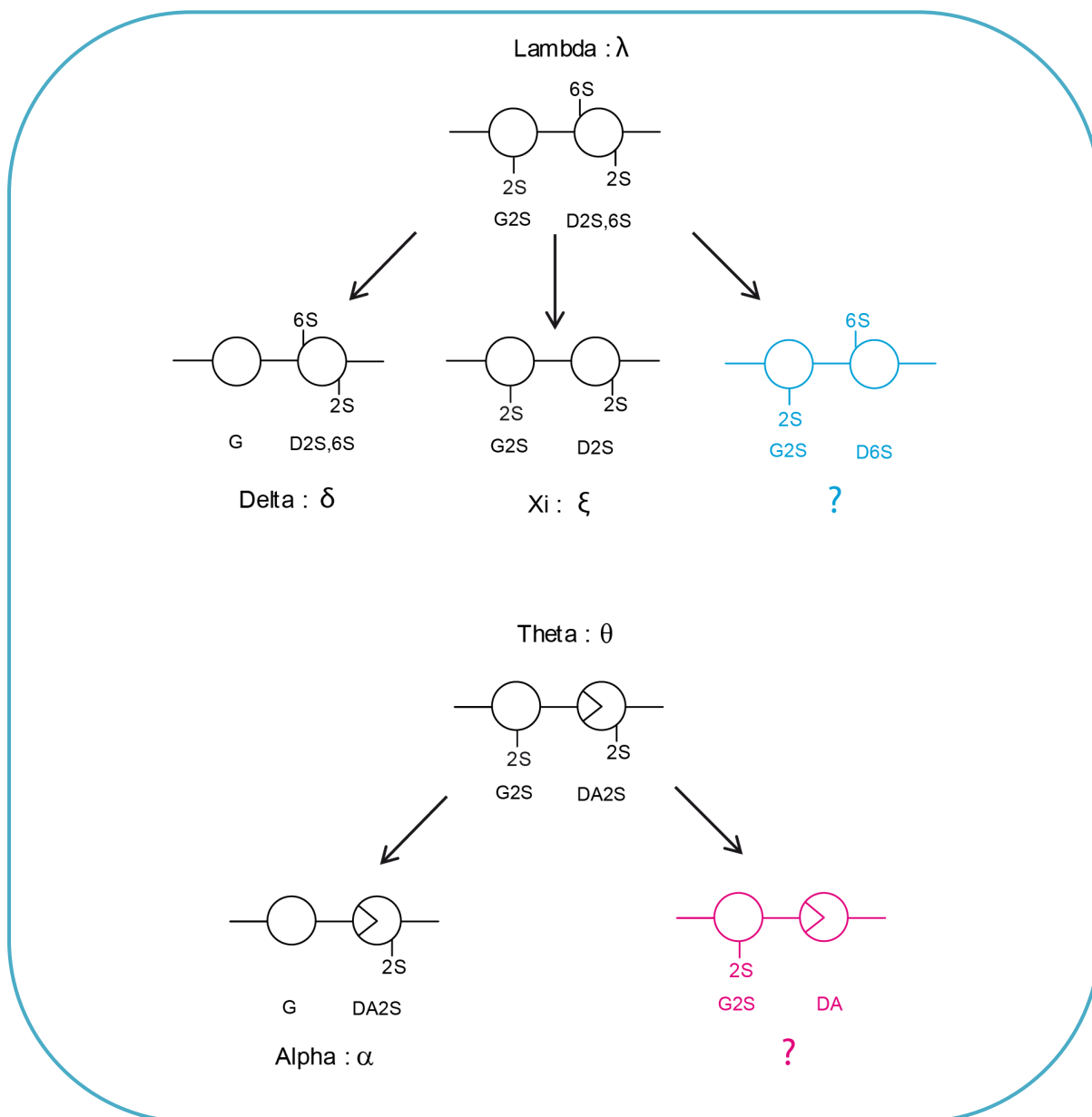


Figure CP-2 : Possibilité création de nouvelles structures de carraghénanes par la désulfatation des structures λ -carrabiose et θ -carrabiose

sulfatases doivent être activement poursuivies.

C. Encore des structures à modifier...

Les carraghénane-sulfatases aujourd'hui identifiées, celles de la littérature et celles issues de ces travaux de thèse, agissent sur les unités κ -carrabiose, ι -carrabiose ou α -carrabiose. Pour le moment, aucune sulfatase agissant sur les unités λ -carrabioses n'a été identifiée, bien que les recherches exploratoires semblent indiquer ce type de sulfatase dans la bactérie *Cobetia marina*. Pourtant, l'une de ces sulfatases permettrait de créer un nouveau motif disaccharidique de carraghénanes. L'hydrolyse du groupement sulfate en position 2 de l'unité G, entraîne la formation du précurseur de l' α -carraghénane, c'est-à-dire le δ -carraghénane (Figure CP-2). L'hydrolyse du sulfate en position 6 de l'unité D engendre à nouveau la formation d'un précurseur, le ξ -carraghénane. Mais l'hydrolyse du groupement sulfate en position 2 de l'unité D, formerait une structure inédite, un disaccharide G2S-D6S. La structure de θ -carraghénane qui serait désulfaté en position 2 de l'unité G, pourrait être plus intéressante, car le nouveau disaccharide formé (G2S-DA) serait porteur d'un pont 3,6-anhydro, indispensable à la gélification des carraghénanes (Figure CP-2).

Les perspectives ouvertes à l'issue de mon travail de thèse sont donc nombreuses et variées. Bien sûr, la recherche de nouvelles carraghénane-sulfatases n'est qu'à peine abordée, et mérite d'être poursuivie et jusqu'aux études de rhéologie des carraghénanes modifiés. D'autre part, la surexpression des sulfatases reste un enjeu majeur pour l'utilisation de ces enzymes à des fins biotechnologiques. Enfin, l'étude du système carraghénolytique de *P. atlantica* a ouvert une porte des plus intéressantes pour tenter de bâtir une vue d'ensemble d'une voie métabolique, et pour identifier de nouvelles cibles à caractériser.

Alors, sur ces quelques lignes, je passe à présent le relais...



CONDITIONS
EXPÉRIMENTALES

CONDITIONS EXPERIMENTALES

A. Sources des carraghénanes

Pour le criblage d'activités carraghénane-sulfatases, les carraghénanes utilisés provenaient de la société CP-Kelco. Le κ -carraghénane (X-6913) a été extrait de l'algue *Kappaphycus alvarezii*, le ι -carraghénane (X-6908) d'*Euchema denticulatum*, et le λ -carraghénane (X-7055) extrait des tétrasporophytes de *Gigartina skottsbergii*. Les hybrides κ/μ -carraghénane (X-6042) et ι/ν -carraghénane (X-6043) utilisés pour leur plus faible viscosité ont été extraits des algues *Kappaphycus alvarezii* et *Euchema denticulatum* respectivement.

Pour la purification de la 4S-iota-carraghénane-sulfatase, les cultures bactériennes de *Pseudoalteromonas atlantica* ont été induites avec du ι -carraghénane (H03058-534) provenant de chez DEGUSSA (Degussa Texturant Systems, Baupre) et extrait des espèces *Euchema spinosum* (2/3) et *Euchema denticulatum* (1/3). Le ι -carraghénane utilisé comme substrat pour tester les activités de désulfatation est le n°1256 extrait d'*Euchema denticulatum* de la société CP-Kelco.

Pour la purification de la 2S-alpha-carraghénane-sulfatase, l' α -carraghénane utilisé comme substrat, a été produit au laboratoire à partir du ι -carraghénane n°1256 de la société CP-Kelco converti par la 4S-iota-carraghénane-sulfatase native.

Pour la purification de la 4S-kappa-carraghénane-sulfatase, les tests d'activité ont été réalisés sur le κ -carraghénane (X-6913) et sur l'hybride κ/μ -carraghénane (X-6042) de la société CP-Kelco.

Pour les études de rhéologie réalisée par la société Danisco, leurs produits ont été utilisés pour la confection de carraghénanes modifiés. Le ι -carraghénane (2544-97-01) a été extrait d'*Euchema denticulatum* et l'hybride purifié de κ/ι -carraghénane (2654-073-1) de l'algue *Gigartina Skottsbergii*.

Pour l'étude du mode d'action des κ -carraghénane-sulfatase, des polymères de κ/β -carraghénanes issus des algues *Tichocarpus crinitus* et *Furcellaria sp* ont été utilisés.

B. Criblage d'activités carraghénane-sulfatases

B.1 Cultures de bactéries marines

Quatre bactéries marines, connues pour leurs activités carraghénolytiques, ont été sélectionnées pour réaliser le criblage d'activités sulfatases : *Pseudoalteromonas carrageenovora* a été obtenue de l'*American Type Culture Collection* (ATCC 43555), de même que *Pseudoalteromonas atlantica* (strain T6c / BAA-1087). La bactérie *Pseudoalteromonas haloplanktis* a été obtenue de la *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ collection N°6060), ainsi que *Cobetia Marina* (DSMZ collection N°4741).

Les quatre bactéries ont été cultivées dans les mêmes conditions dans du milieu Zobell (*Zobell C.E*, 1941). Celui-ci est préparé à partir de Bacto peptone (*Amresco*) 5g/l, d'extraits de levure (*Extract of Autolized Yeast cells, BD*) 1g/l, de 80% d'eau de mer filtrée, et d'eau déminéralisée (QSP 1l). Afin d'induire de potentielles activités sulfatases, trois inductions différentes ont été effectuées pour chaque bactérie : kappa-, iota- et lambda-carraghénane (1g/l).

Le protocole utilisé repose sur trois étapes successives. La première préculture consiste àensemencer 10 ml de milieu Zobell à partir d'un glycérol de la souche bactérienne, conservé à -80°C. L'incubation est réalisée dans un agitateur de type New Brunswick pendant 36h à 18°C et 180 rpm. La deuxième préculture est réalisée en ensemencant 50 ml de milieu Zobell induit, par environ 1ml de la première préculture de manière à avoir une absorbance de 0,1 à 660nm. Cette deuxième préculture est incubée à 18°C jusqu'à ce que l'absorbance atteigne une valeur de 1 à 1,2 soit environ 8h. La culture finale est ensuite effectuée en inoculant 950 ml de milieu Zobell induit, par les 50ml de la seconde préculture ; le tout est incubé à 18°C pendant 36h.

Afin de séparer le culot bactérien du surnageant de culture, les cultures bactériennes sont centrifugées à 6200 g pendant 20 min à 4°C.

B.2 Préparation des extraits bactériens

L'ensemble des étapes décrites ci-dessous sont réalisées à 4°C afin d'éviter la dégradation des protéines.

Les culots bactériens sont resuspendus dans du tampon Tris-HCl (*Sigma*) 50 mM à pH 8,3 avec un demi-comprimé d'anti-protéase (*Complete, EDTA-free, Roche*). Les cellules sont ensuite lysées à la presse de French et les extraits obtenus ultra-centrifugés à 46 500 g pendant 2h. Les lysats sont alors dialysés (MWCO 3500Da, *Spectra/Por*) sous agitation contre du tampon Tris-HCl 50mM à pH 8,3 pendant une nuit à 4°C, afin d'éliminer notamment le sulfate libre.

Les surnageants de culture sont concentrés par précipitation à 90% de saturation en sulfate d'ammonium (61,5 g/100 ml d'échantillon). Après centrifugation (35 min à 27 100 g) les culots obtenus sont resuspendus contre du tampon Tris-HCl à pH 8,3 et dialysés (MWCO 3500Da, *Spectra/Por*) une nuit à 4°C contre ce même tampon.

B.3 Mesure de l'activité sulfatase

B.3.1 Réaction de désulfatation

50µl d'extrait protéique (surnageant de culture ou lysat bactérien) sont mis en présence de 50µl d'une solution de carraghénane à 1% (p/v) dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8,3. Les mélanges sont incubés à 37°C en bain-marie pendant une nuit. Pour chaque échantillon, un blanc est effectué dans des conditions similaires en ayant préalablement inactivé l'extrait enzymatique à 100°C durant une quinzaine de minutes.

B.3.2 Dosage du sulfate libéré par HPAEC

Les milieux réactionnels sont dilués par 2 avec de l'eau milliQ (*Millipore*) puis centrifugés en centricons (Amicon® Ultra, *Millipore*) avec un seuil de coupure à 10kDa. Cette centrifugation est réalisée à 7700 g pendant 90 min à température ambiante. Le filtrat obtenu est ensuite dosé par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC : *High performance anions exchange chromatography*) sur un système Dionex. 20µl d'échantillon

sont injectés grâce à un injecteur automatique (AS3000, *Thermo*). La séparation des anions présents dans les échantillons est effectuée par une colonne Ion-Pac AS11 (4 x 200 mm, *Dionex*) munie d'une pré-colonne AG-11 (4 x 50 mm, *Dionex*). Après équilibration du système, l'élution des échantillons est réalisée en mode isocratique, à partir de solutions d'eau mQ (éluant A) et de soude 100 mM (éluant B), à un débit de 1ml/min (Pompe GP40, *Dionex*). Pour chaque analyse, un gradient de soude est effectué après 10 min d'élution pour nettoyer la colonne. Le programme est le suivant : 0-10 min : 12-12% B ; 10-18 min : 12-100% B ; 18-22 min : 100-100% B ; 22-25 min : 100-12% B ; 25-30min : 12-12% B. La détection des anions se fait par conductimétrie avec un détecteur ED40 (*Dionex*) muni d'un suppresseur ASRS ultra-II-4mm (*Dionex*) fonctionnant à un courant de 200 mA. Le logiciel « Chroméléon » version 6.8 a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. Grâce à un étalonnage préalable, les aires des pics de sulfate sont converties en parties par million (ppm). La différence entre la valeur de l'échantillon et celle du blanc donne la quantité de sulfate libéré en ppm lors de la réaction enzymatique de désulfatation.

B.4 Identification de l'activité sulfatase par ¹H-RMN

La position du groupement sulfate clivé et donc l'identification du produit formé lors de l'hydrolyse enzymatique, est réalisée par RMN. Pour le criblage, les réactions de désulfatation ont été effectuées en mettant 700 µl de carraghénane à 1% (p/v) en présence de 300 µl d'extrait bactérien. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 37°C en bain-marie durant 72h puis lyophilisés. Les échantillons sont alors échangés deux fois contre du D₂O avant d'être redissous dans 700 µl de D₂O à 99,97% pour être à une concentration approximative de 10 mg/ml. Les spectres ¹H-RMN sont enregistrés à 70°C sur un spectrophotomètre BRUKER Avance DRX 500 par le service RMN de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO, Brest). Les protons anomériques des carraghénanes présentent des déplacements chimiques (δ) caractéristiques compris entre 5 et 5,6 ppm environ.

D'un point de vue plus technique, les spectres 500,13 MHz ¹H-RMN des polymères ont été enregistrés avec un angle d'impulsion de 30°C en utilisant 32K ou 64K points de données. Les expériences ont été menées avec les paramètres suivants : fenêtre spectrale, 10 330 Hz ; temps d'acquisition, 1,58 s ; temps de relaxation, 2 s ; résolution digitale 0,31 Hz/point. Les nombres de scans ont varié de 32 à 128 selon les échantillons.

C. Protocoles de purification des sulfatases de *P. atlantica*

Toutes les étapes de purification décrites dans les paragraphes suivants ont été réalisées à 20°C à l'aide d'un système Akta Purifier.

C.1 Purification et caractérisation de la 4S-*ι*-carraghénane-sulfatase

C.1.1 Purification de l'enzyme par chromatographie

La 4S-*ι*-carraghénane-sulfatase a été purifiée à partir du lysat bactérien de *Pseudoalteromonas atlantica*. La bactérie est cultivée comme décrit au § II.A. avec une induction au *ι*-carraghénane. Le culot bactérien est ensuite préparé comme au § II. B. mais en utilisant du tampon Tris-HCl 50 mM à un pH 7,5.

Le lysat dialysé (environ 35ml filtré à 0,45µm) est chargé à l'aide d'une superloop à un débit de 2 ml/min, sur une colonne échangeuse d'anions faible DEAE Sépharose Fast Flow (Hiprep 20 ml, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5. La résine est ensuite lavée avec ce même tampon jusqu'à obtenir une absorbance négligeable à 280 nm. L'élution des protéines est réalisée à un débit de 2,5 ml/min par un gradient segmenté, croissant en NaCl de 0 à 1M : 10 volumes de colonne de 0 à 500 mM de NaCl et 2 volumes de colonne de 500 mM à 1M NaCl. Les fractions collectées sont de 3 ml et testées pour leur capacité à désulfater le *ι*-carraghénane. Les incubations sont réalisées tel qu'au § II. C. 1. mais dans les conditions optimales de l'enzyme (§ II. A. 4.), soit à une température de 34°C et à un pH de 7,5. L'essentiel de la 4S-*ι*-sulfatase est éluée entre 20 et 40 min d'élution soit entre 100 et 200 mM NaCl.

Un pool de fractions contenant un maximum d'activité sulfatase est alors dialysé (MWCO 3500 Da) sous agitation pendant une nuit à 4°C contre du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 afin d'éliminer le NaCl. Cet extrait est ensuite déposé sur une colonne échangeuse d'anions forte Q Fast Flow (Hitrap 1ml, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5. La résine est lavée avec ce même tampon et les protéines sont éluées avec un gradient segmenté, croissant en NaCl de 0 à 1M : 15 volumes de colonne de 0 à 500 mM NaCl et 5 volumes de colonne de 500 mM à 1 M NaCl, à un débit de 1ml/min.

Les fractions collectées, de 1ml, sont incubées en présence de ι -carraghénane pour mesurer l'activité sulfatase. Celle-ci est éluée dès les premières minutes d'éluion dès 100 mM NaCl.

C.1.2 Pureté de l'enzyme par gel d'électrophorèse (SDS-PAGE)

La pureté des fractions actives est analysée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (Criterion XT 12% Bis-Tris, *Biorad*). A 15 μ l d'échantillon sont ajoutés 5 μ l de tampon de charge réalisé par 2% SDS (*Amresco*), 5% β -mercaptoéthanol (98%, *Sigma*), 20% glycérol (*CarloErba*), 62,5 mM Tris-HCl à pH 6,8 et 0,5% bleu de bromophénol (*Sigma*). Les échantillons sont ensuite portés à ébullition pendant 3 min afin de dénaturer les protéines. 15 μ l de chaque mélange sont alors déposés sur le gel. En alternance aux échantillons, les dépôts de 5 μ l de marqueur de taille (Precision Plus Protein, *Biorad*) permettent d'évaluer le poids moléculaire des protéines comprises entre 10 et 250 KDa. La migration est réalisée à température ambiante, à 110 volts (pour 1 gel) durant 2h, dans un tampon de migration composé de MOPS (*Sigma*) 200 mM, Tris 250 mM et SDS 5g/l. La révélation du gel est effectuée par une coloration au bleu de Coomassie ou au bleu de Coomassie colloïdal (*Candiano et al., 2004*) pour les analyses en spectrométrie de masse.

C.1.3 Identification de la protéine par spectrométrie de masse

(réalisé par la plateforme BIBS de l'INRA de Nantes)

L'identification de la protéine responsable de l'activité sulfatase a été réalisée par la plateforme BIA « Biopolymères-Intéractions-Assemblages » de l'INRA de Nantes.

La bande pure a été excisée du gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie colloïdal, pour être envoyée au service de Spectrométrie de masse. La protéine a été digérée à la trypsine comme décrit dans la publication de *Larre et al. (2010)*. Brièvement, la bande est lavée avec 100 μ l de NH_4HCO_3 25mM, suivi d'une déshydratation avec 100 μ l de 50% (p/v) acétonitrile en NH_4HCO_3 25mM. Les protéines ont été réduites et alkylées par incubation d'1h à 57°C en présence de DTT 10mM suivi par 45 min d'incubation à température ambiante avec de l'iodoacétamide 55mM. La bande du gel a encore été lavée avec du NH_4HCO_3 et déshydratée comme décrit précédemment. Elle a alors été incubée avec 10 μ l de trypsine (sequencing grade, *Promega*) solubilisé à 12,5 ng/ μ l dans du NH_4HCO_3 25mM. La

réaction a été conduite pendant 1 nuit à 37°C. Le surnageant a été collecté et les fragments tryptiques analysés par MALDI-TOF et LC-MS/MS.

La spectrométrie de masse sur MALDI-TOF a été réalisée sur un M@LDI LR (Waters). 1µl d'échantillon a été mélangé avec 1µl de préparation de matrice (2,5 g/l cyano-4-hydroxycinnamic, 2,5g/l acide 2,5-hydroxy-benzoïque, 70% (v/v) acétonitrile, et 0,1% (p/v) acide trifluoroacétique) et déposé sur la sonde de prélèvement du MALDI. L'acquisition des spectres de masse est effectuée en fonction du ratio masse-sur-charge (m/z) sur une échelle allant de 800 à 3000. Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées en utilisant un système HPLC à nano-débit (Switchos-Ultimate II, *Dionex*) couplé à un analyseur de spectrométrie de masse hybride (Q-TOF Global, *Waters*) alliant un analyseur quadripolaire orthogonal et un analyseur à temps de vol. La séparation par chromatographie est effectuée sur une colonne capillaire en phase inverse (75µm i.d., Pepmap C18, *Dionex*) à un débit de 200nl/min en utilisant un gradient de 2 à 50% de 0,08% (p/v) acide formique en acétonitrile. Les données de masse sont enregistrées en mode « data dependent » : un spectre de masse est enregistré sur une échelle de ratio masse-sur-charge de 400 à 1500 en 1s, après quoi les trois ions les plus intenses sont sélectionnés et fragmentés dans la cellule de collision. Les données brutes obtenues par le MALDI-TOF ou le LC-MS/MS ont été traitées au moyen du logiciel « Protein Lynx Global Server » version 2.1 (*Waters*).

L'identification de la protéine a été réalisée en comparant les données collectées par le LC-MS/MS avec la base de données « Uniprot-Trembl » (publiée le 21 mars 2006). L'interrogation des banques de données a été effectuée *via* l'utilisation du logiciel « Mascot Server » version 2.2 (*Matrix Science*). La tolérance en masse a été mise à 120 ppm pour les ions parents (mode MS) et 0,3 Da pour les ions fragmentés (mode MS/MS), et l'oubli d'une coupe par peptide a été autorisée. Quelques spectres MS/MS ont subi un séquençage de-novo *via* le logiciel « Protein Lynx Global Server » version 2.1. L'ensemble de cette procédure a été facilitée par l'utilisation du programme OVNIP (26).

C.1.4 Etude enzymologique de la sulfatase

La température optimum a été déterminée en incubant 4 volumes de ι-carraghénane 1% (p/v) en Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 avec 1 volume de sulfatase native purifiée. Le pH optimum a été déterminé en testant une gamme de pH allant de 5,5 à 9,5 en utilisant du

tampon MES (pH 5,5 à 6,5), du Tris-HCl (pH 7,0 à 9,0) et du Bis-Tris propane (pH 6,5 à 9,5). Les incubations ont été réalisées à 34h pendant 8h. L'effet du NaCl sur l'activité sulfatase a été testé en ajoutant une concentration croissante de NaCl de 0 à 500 mM dans les milieux d'incubation. Afin d'estimer les paramètres de Michaelis (K_m et V_m), des cinétiques de désulfatation ont été entreprises avec les concentrations suivantes de ι -carraghénane : 0.0008, 0.0024, 0.008, 0.08, 0.2, 0.4, 0.8, et 1.6% (p/v). Les calculs des constantes ont été effectués en utilisant la concentration en unité ι -carrabiose au lieu de la concentration en carraghénane : 1% (p/v) de ι -carraghénane correspond à 22 mM de motifs ι -carrabiose. Ces incubations ont été réalisées à 34°C avec la sulfatase native purifiée et la vitesse initiale a été mesurée sur la partie linéaire de la cinétique. Pour l'ensemble de ces expériences, les concentrations en sulfate libre survenant des milieux d'incubation ont été mesurées par HPAEC comme décrit au § II. C. 2..

C.2 Purification partielle de la 4S- κ -carraghénane-sulfatase

La 4S-kappa-carraghénane-sulfatase a été fractionnée à partir du lysat bactérien de *Pseudoalteromonas atlantica*. La bactérie est cultivée comme décrit au § II.A. avec une induction au ι -carraghénane. Le culot bactérien est ensuite préparé comme au § II. B. mais en utilisant du tampon Tris-HCl 50 mM à un pH 7,0.

Le lysat dialysé (environ 35 ml filtré à 0,45 μ m) est chargé à l'aide d'une superloop à un débit de 2 ml/min, sur une colonne d'affinité Héparine Fast Flow (Hiprep 20 ml, GE Healthcare) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,0. La résine est ensuite lavée avec ce même tampon jusqu'à obtenir une absorbance négligeable à 280 nm. L'élution des protéines est réalisée à un débit de 2,5 ml/min par un gradient croissant en NaCl de 0 à 1M en 20 volumes de colonne. Les fractions collectées sont de 3 ml et testées pour leur capacité à désulfater le κ/μ -carraghénane. Les incubations sont réalisées tel qu'au § II. C. 1. mais dans les conditions optimales de l'enzyme, soit à une température de 30°C et à un pH de 7,0. La majorité de la 4S-kappa-sulfatase est éluée entre 1h et 1h30 d'élution soit entre 400 et 600 mM NaCl.

Un pool de fractions contenant un maximum d'activité sulfatase pour un minimum d'absorbance est filtré (Cellule Amicon Bioséparations, Millipore) sur une membrane de 100 kDa puis concentré sur une autre de 30 kDa. Cet extrait, redilué dans du tampon Tris-HCl 50

mM à pH 7,5, est alors déposé à l'aide d'une superloop sur une colonne échangeuse d'anions forte Q Fast Flow (Hitrap 5 ml, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée dans le même tampon. Après lavage de la résine, les protéines sont éluées avec un gradient croissant en NaCl de 0 à 1M en 20 volumes de colonne à un débit de 2 ml/min. Les fractions collectées, de 2,5 ml, sont incubées en présence de κ/μ -carraghénane pour mesurer l'activité sulfatase. Celle-ci est éluee dès les premières minutes d'éluion entre 4 et 20 min, équivalent de 160 à 380 mM NaCl. Les fractions d'intérêt sont analysées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE tel qu'au § III. A. 2. ; les deux bandes visibles sur le gel ont été identifiées par spectrométrie de masse (§ III. A. 3.).

C.3 Purification partielle de la 2S- α -carraghénane-sulfatase

La 2S-alpha-carraghénane-sulfatase a été fractionnée à partir du lysat bactérien de *Pseudoalteromonas atlantica*. La bactérie est cultivée comme décrit au § II.A. avec une induction au ι -carraghénane. Le culot bactérien est ensuite préparé comme au § II. B. mais en utilisant du tampon Tris-HCl 50 mM à un pH 7,0.

Une partie du lysat dialysé (environ 10 ml filtré à 0,45 μ m) est chargé à l'aide d'une superloop à un débit de 1ml/min, sur une colonne d'affinité Héparine Fast Flow (Hitrap 1ml, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,0. La résine est ensuite lavée avec ce même tampon jusqu'à obtenir une absorbance négligeable à 280nm. L'éluion des protéines est réalisée à un débit de 1ml/min par un gradient segmenté, croissant en NaCl de 0 à 1M : 15 volumes de colonne de 0 à 500 mM de NaCl et 5 volumes de colonne de 500 mM à 1M NaCl. Les fractions collectées, de 1 ml, sont testées pour leur capacité à désulfater l' α -carraghénane. Les incubations sont réalisées tel qu'au § II. C. 1. mais dans les conditions optimales de l'enzyme, soit à une température de 25°C et à un pH de 7,5. Les fractions actives sont déposées sur gel d'électrophorèse tel qu'au § III. A. 2.. Le « maximum de pureté » obtenu pour la 2S-alpha-sulfatase est élué entre 2 et 6 min d'éluion, soit entre 65 et 200 mM NaCl. Une tentative d'identification de la bande d'intérêt a été effectuée tel qu'au § III. A. 3..

D. Purification partielle de la ι -carraghénase de *P. atlantica*

D.1 Fractionnement de l'enzyme par chromatographie

La iota-carraghénase de *P. atlantica* a été mise en évidence dans le surnageant de culture. Afin d'induire la production de cette carraghénase, la bactérie a été cultivée en milieu ZoBell comme au § II. A. en présence de ι -carraghénane (1g/l). Le surnageant de culture est concentré 5 fois *via* une ultrafiltration (Cellule Amicon Bioséparations, *Millipore*) sur une membrane de 10kDa, sous pression d'azote (1,5 bars) et à 4°C. La quantité totale de protéines est mesurée avant et après concentration par le dosage de Bradford (*Biorad, Bradford, 1976*) par référence à la BSA (Bovine Serum Albumin, *Sigma*). Le surnageant concentré est ensuite dialysé (MWCO 3500 Da, *Spectra/Por*) contre du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 sous agitation pendant une nuit à 4°C.

L'extrait dialysé (environ 10 mg de protéines) est filtré sur 0,45 μ m avant d'être chargé par une superloop (2ml/min) sur une colonne échangeuse d'anions faible DEAE-Sépharose *Fast Flow* (Hiprep 20ml, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5. La résine est ensuite lavée avec ce même tampon afin d'obtenir une absorbance négligeable à 280 nm. L'élution des protéines est réalisée à un débit de 2,5 ml/min par un gradient segmenté, croissant en NaCl de 0 à 1M : 10 volumes de colonne de 0 à 500 mM de NaCl et 2 volumes de colonne de 500 mM à 1M NaCl. Les fractions collectées (3ml) sont testées pour leur capacité à hydrolyser le ι -carraghénane, comme décrit au § IV. B. La ι -carraghénase est éluée dans le pic à 300 mM NaCl entre 40 et 55 min d'élution.

Trois fractions présentant une forte activité carraghénase sont alors poolées et concentrées sur centricons (10kDa, Amicon® Ultra, *Millipore*). Cet extrait (4 ml environ) est déposé par une boucle d'injection de 5ml sur une colonne de gel filtration Superdex de 120 ml. L'élution est réalisée en mode isocratique par du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, à pH 7,5 à un débit de 1 ml/min. Les fractions (1ml) susceptibles de présenter l'activité sont incubées en présence de ι -carraghénane, et déposées en parallèle sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les bandes d'intérêt ont été analysées en spectrométrie de masse tel qu'au § III. A. 3.

D.2. Mesure de l'activité ι -carraghénase

D.2.1 Condition d'hydrolyse enzymatique

Pour mesurer l'activité ι -carraghénase, 35 μ l des fractions issues de la purification sont mises en présence de 35 μ l d'une solution de ι -carraghénane à 0,6% (p/v) dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8,5. Les réactions enzymatiques sont réalisées en microplaque et incubées à 35°C sous agitation constante pendant une nuit.

D.2.2 Dosage colorimétrique des extrémités réductrices

L'activité ι -carraghénase est révélée par un dosage colorimétrique des extrémités réductrices générées par coupure enzymatique. La méthode utilisée est une réaction d'oxydo-réduction par le réactif Ferricyanide (Kidby *et al.*, 1973). 50 μ l des mélanges réactionnels sont transférés en microplaque (type PCR) et dosés par 250 μ l de Ferricyanide 5X (ferricyanure $K_3Fe(CN)_6$ 1,5 g/l, carbonate de sodium hydrate 24 g/l, NaOH 0,5M, eau mQ QSP 1l) inspiré du protocole de criblage CRAZY (Fer *et al.*, 2012). Les blancs de chaque échantillon sont réalisés en inactivant directement les extraits enzymatiques avec le réactif Ferricyanide, puis en ajoutant le ι -carraghénane (dans les mêmes conditions que pour l'hydrolyse § III. B. 2.). La réaction de dosage est effectuée en thermocycleur (GeneAmp® PCR System 2700) par chauffage des échantillons à 95°C pendant 15 min. La présence d'extrémités réductrices est révélée par la décoloration du réactif Ferricyanide, passant du jaune à l'incolore, générée par la réduction du cation métallique (Figure CE-1). La lecture des densités optiques est faite à 420 nm dans un spectrophotomètre de microplaques (Victor², Wallac), après transfert de 200 μ l d'échantillons dans des microplaques adaptées.

Les extrémités réductrices formées sont exprimées, soit simplement en unité d'absorbance (δ DO), soit en μ g/ml équivalent glucose. Cette concentration est déterminée grâce à une droite d'étalonnage δ DO (densité optique) = f (concentration glucose) réalisée à partir de solutions de glucose de concentrations connues allant de 50 à 600 μ g/ml. Cette droite permet de remonter, de la différence d'absorbance entre les blancs et les échantillons, à la concentration en extrémités réductrices en μ g/ml équivalent glucose dans le milieu.

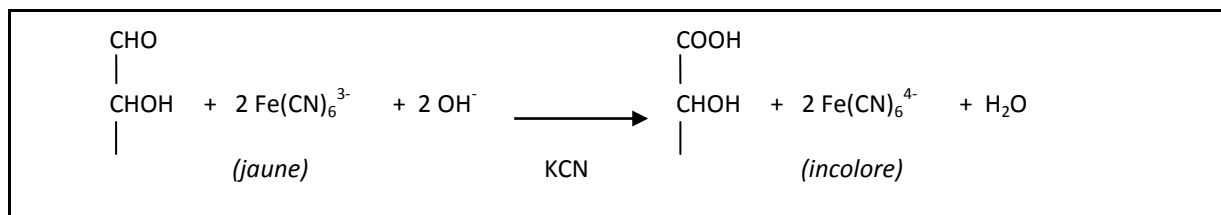


Figure CE-1 : Réaction du dosage des extrémités réductrices par le Ferricyanide (Robyt, 1998).

E. Détermination du mode d'action de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase Q15XH3 de *P. atlantica*

NB : L'analyse du mode d'action des sulfatases Q15XH1 et Q15XG7 a été réalisée sur le même principe que celui de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase, mais en utilisant la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* pour la dégradation des hybrides. La purification des oligosaccharides n'a pas été entreprise dans ces deux cas.

E.1. Production des hybrides ι -/ α -carraghénanes

Les hybrides ι / α -carraghénane sont produits à partir d'une solution de ι -carraghénane pur à 1% (p/v) dans du Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 à laquelle est ajoutée en excès la sulfatase Q15XH3 native semi-purifiée (fractions issues de la DEAE). Le milieu réactionnel est incubé à 30°C pendant 48h : un premier prélèvement est mis de côté avant rajout de sulfatase au milieu réactionnel, pour poursuivre l'incubation et obtenir ainsi des hybrides différents en ratio iota/alpha. Ce ratio sera déterminé en RMN (§ II. D.). Les fractions aliquotes issues de l'incubation sont bouillies pour inactiver l'enzyme, centrifugées (27 200 g, 30 min, 4°C), filtrées sur 0,45 μm (Millipore) et dialysées (MWCO 3500 Da, Spectra/Por) contre de l'eau mQ jusqu'à l'élimination maximale des sels. Ces solutions d'hybrides sont ensuite lyophilisées.

E.2. Hydrolyse enzymatique des hybrides

E.2.1 Pour l'analyse

Les hybrides sont remis en solution à 0,5 % (p/v) dans du tampon Tris-HCl 0,15 M à pH 8,0, avec un excès de ι -carraghénase issue d'*A. fortis* pendant 72h. Lors de l'utilisation de la ι -carraghénase de *P. atlantica*, les hybrides sont remis en solution dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8,5 et incubés à 35°C.

E.2.2 Pour la purification

Pour la production et la purification d'oligosaccharides hybrides ι/α -carraghénane, une hydrolyse a été réalisée sur 60 ml de solution d'hybride ι/α -carraghénane (produit tel qu'au § V. A.) à 0,5% (p/v) dans les mêmes conditions que pour l'analyse. En raison de la faible fraction résistante après hydrolyse (vérification faite par HPSEC), il n'a pas été nécessaire de l'éliminer. Après centrifugation (30 min à 39 200 g), le milieu d'incubation a été concentré par évaporation rotative à environ 5% (p/v) avant d'être purifié par chromatographie d'exclusion de taille (§ V. D.).

E.3. Analyse des hydrolysats par chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC)

Les analyses en HPLC-SEC ont été réalisées sur un système HPLC *Dionex Ultimate 3000* équipé d'une pompe, d'un injecteur d'échantillons, et d'un détecteur UV, auquel était couplé un détecteur d'indice de réfraction (*Wyatt Optilab*). Les milieux d'incubations (§ V. B. 1.) sont filtrés à la seringue sur 0,22 μm (Millipore) et injectés (100 μl) sur une colonne Superdex 200 (10/300, *GE Healthcare*) couplée à une Superdex peptide (10/300, *GE Healthcare*). La séparation des oligosaccharides a été réalisée en mode isocratique par une phase mobile de LiNO_3 100 mM filtré à 0,1 μm . L'éluion était effectuée à un débit de 0,5 ml/min sur une durée de 100 min pour un run.

E.4. Purification des oligo-carraghénanes par chromatographie d'exclusion de taille (SEC)

L'hydrolysate concentré (§ V. B. 2.), 5ml filtré sur 0,22 μ m, a été injecté par un injecteur automatique (819, *Gilson*) sur 3 colonnes Superdex™ 30 préparatives (600 x 26 mm, *Amersham Biosciences*) montées en série. La séparation des oligosaccharides est réalisée à 20°C en mode isocratique à un débit de 1 ml/min (Pompe 306, *Gilson*) avec du carbonate d'ammonium 100 mM, durant 1000 min. Le logiciel « Unipoint » (*Gilson*) permet l'acquisition et le traitement des données. Les oligosaccharides sont détectés par un réfractomètre (Spectra system RI-150, *Thermo Separation Products*) et récupérés en différentes fractions (5,5 ml) *via* un collecteur automatique (Liquid Handler 215, *Gilson*) entre 550 et 900 min d'élution. L'utilisation du carbonate d'ammonium comme éluant permet d'éviter l'étape de dialyse et ainsi d'analyser directement les différentes fractions par HPAEC. Les fractions de même composition seront alors poolées et lyophilisées.

Les oligosaccharides ont pu être séparés selon leur degré de polymérisation et de sulfatation. Pour les hydrolyses réalisées avec la iota-carraghénase d'*A. fortis*, les oligo- ι -carraghénanes sont élués à 585 min pour les DP6 et à 665 min pour les DP4. Les oligos hybrides ι/α -carraghénanes sont, quant à eux, élués vers 625 et 685 min pour les hexa- et tétrasaccharides respectivement. Les DP6 hybrides sont co-élués dans le même pic (même degré de sulfatation mais distribution différente).

E.5. Analyse des oligo-carraghénanes par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC)

20 μ l de chaque fraction (obtenues par SEC tel qu'au § V. D.) sont injectés (injecteur automatique 100XR, *Thermo Separation Products*) sur une colonne analytique échangeuse d'anions AS11 (4 x 250 mm, Ion Pac®, *Dionex*) équipée d'une pré-colonne AG11 (4 x 50 mm, Ion Pac®, *Dionex*). L'élution des échantillons est réalisée à un débit de 0,5 ml/min (Pompe GP40 Gradient, *Dionex*) par un gradient de soude, à partir de solutions d'eau mQ (éluant A) et de soude à 280 mM (éluant B), suivant un programme linéaire : 0-3,5 min : 3-3% ; 3,5-4,1 min : 3-5% ; 4,1-6,5 min : 5-10% ; 6,5-22 min : 10-50% ; 22-28 min : 50-

74,7% ; 28-28,1 min : 74,7-100%. Les oligosaccharides sont détectés par conductimétrie par un détecteur ED40 (*Dionex*) muni d'un supprimeur ASRS ultra-II-4mm (*Dionex*) sous un courant de 300 mA. L'acquisition des chromatogrammes est réalisée par le logiciel « Chroméléon » version 6.8.

E.6. Analyse des oligo-carraghénanes par ¹H-RMN 1D

Les oligo-carraghénanes sont échangés deux fois dans du D₂O puis redissous dans du D₂O à 99,97 % à approximativement 5 mg/ml. Les expériences ont été menées sur un spectromètre BRUKER Avance DRX 500 tel qu'au § II. D. mais conduites à 25°C. Les spectres 500,13 MHz ¹H-RMN des oligosaccharides ont été enregistrés avec un angle d'impulsion de 30° en utilisant 64K points de données avec les paramètres suivants : fenêtre spectrale, 7485 Hz ; temps d'acquisition, 4,38 s ; temps de relaxation, 2 s ; nombre de scans, 16 ; résolution digitale 0,11 Hz/point.

F. Surexpression des sulfatases du cluster de gènes

F.1. Surexpression et clonage des gènes (réalisé par S. Genicot-Joncour)

Les gènes Q15XH1, Q15XH3, Q14XH4, Q15XG7 issus du même cluster ainsi que le gène Q15XI1 ont été synthétisés par GeneArt pour une optimisation de l'usage des codons chez *E. coli*. Ces gènes ont ensuite été amplifiés par PCR, via la synthèse d'oligonucléotides spécifiques (*Eurogentec*, Belgique) pour chacune des enzymes d'intérêt. Les fragments PCR ont été purifiés à l'aide d'un kit « minielute RR » (*Qiagen*), puis digérés par les enzymes de restriction EcoRI et BamHI. Les produits de digestion sont alors purifiés et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gènes amplifiés sont ligués dans le plasmide pFO4, vecteur d'expression permettant d'insérer la séquence d'ADN dans *E. coli*, mais aussi d'en assurer son maintien. La transformation d'*E. coli* a ensuite été réalisée par choc thermique. Après la mise en culture des colonies, une PCR a été effectuée pour vérifier le succès des étapes de clonage et de transformation. Les plasmides recombinants pFO4 ont ensuite été

insérés dans des souches de surexpression d'*E. coli* : BL21 (DE3) et Origami (Novagen, USA). Après obtention des colonies, les clones validés sont conservés à -80°C en présence de glycérol.

F.2. Co-expression des sulfatases avec les enzymes de maturation

(réalisé par W. Helbert)

La co-expression a consisté à exprimer le plasmide pFO4 contenant la sulfatase et le plasmide pRSFDuet-1 contenant l'enzyme de maturation (FGE ou AnSME) dans la même souche d'*E. coli* BL21 (DE3). Les enzymes de maturation dans leur plasmide nous ont été gracieusement fournies par le Dr O. Berteau et son équipe, et la co-expression a été effectuée en suivant le protocole qu'ils ont mis en place. Deux antibiotiques ont été utilisés pour le maintien des plasmides : de l'ampicilline et la kanamycine.

F.3. Cultures bactériennes de *E. coli*

Les cultures ont été réalisées puis optimisées pour des volumes de 200 ml avant d'être effectuées à plus grande échelle pour les essais de purification (1 litre). Les protocoles des paragraphes suivants sont donc décrits pour des volumes de 200 ml.

Lors des cultures des sulfatases en présence des enzymes de maturation (FGE et AnSME), un 2^{ème} antibiotique, différent de l'ampicilline, a été ajouté au milieu de culture : la kanamycine, à une concentration finale de 50 µg/ml.

F.3.1 En milieu Luria Bertani (LB)

Le milieu Luria Bertani ou LB (Bertani G, 1951) a été réalisé par 10 g de Tryptone (Amresco), 5g Yeast Extract (*Extract of Autolyzed Yeast cells, BD*) et 10 g NaCl (*Sigma*) dissous dans 1 litre d'eau osmosée.

La première préculture consiste àensemencer 10 ml de LB à partir d'un glycérol d'une sulfatase surexprimée dans *E. coli*. A cette préculture est ajouté de l'ampicilline 10% (1µl/ml) afin de maintenir le plasmide. L'incubation est réalisée dans un agitateur de type New Brunswick pendant une nuit à 37°C et 180 rpm. La culture est ensuite effectuée en inoculant

100 ml de milieu LB + ampicilline en erlen de 1L, par 1 ml de la première préculture. La culture est alors incubée à 37°C durant 6h environ à 180 rpm, et la densité optique du milieu est suivie à 600 nm pour vérifier la prolifération de la bactérie. L'induction est ensuite effectuée en ajoutant à la culture 100 ml de milieu LB + ampicilline, et de l'IPTG pour une concentration finale de 2 mM. La culture est remise à incuber durant 20h à 180 rpm, à 20 ou 37°C selon la sulfatase étudiée.

Afin de séparer le culot bactérien du surnageant de culture, les cultures bactériennes sont centrifugées à 6200 g pendant 25 min à 4°C.

F.3.2 En milieu Graffinity

Le milieu Graffinity (Korf *et al.*, 2005) est connu pour favoriser l'expression des protéines grâce à une double induction au lactose et à l'IPTG.

La première préculture est réalisée de la même façon que pour une culture en milieu LB (§ VI. C. 1.) : ensemencement de 10 ml de LB par un glycérol de sulfatase surexprimée dans *E. coli*, avec ajout d'ampicilline 10% (1 µg/ml). Cette préculture est incubée à 37°C pendant 1 nuit à 180 rpm. La culture est ensuite réalisée en inoculant, par 1 ml de préculture, 100 ml de milieu LB + ampicilline auquel est ajouté du glucose (0,5% concentration finale). Cette culture est incubée à 37°C durant 6h environ à 180 rpm, et l'absorbance suivie à 600 nm. L'induction est ensuite effectuée en ajoutant à la culture : 100 ml de LB + ampicilline, du lactose (0,6% concentration finale), de l'HEPES à pH 7,0 (20 mM concentration finale), et de l'IPTG (2 mM concentration finale). La culture est à nouveau incubée pendant 20h à 180 rpm, à une température de 20°C.

Afin de séparer le culot bactérien du surnageant de culture, les cultures bactériennes sont centrifugées à 6200 g pendant 25 min à 4°C.

F.3.3 En milieu ZYP

Le milieu ZYP-5052 (William Studier F., 2005) est un milieu riche pour autoinduction dont la particularité est sa composition en divers métaux. Il favorise ainsi la culture de protéines recombinantes métallo-dépendantes.

La première préculture consiste àensemencer 2 ml de LB (§ VI. C. 1.) par un glycérol de sulfatase surexprimée dans *E. coli*, auquel est ajoutée l'ampicilline 10% (1 µg/ml). Cette préculture est incubée à 37°C pendant 1 nuit à 180 rpm. La culture est ensuite réalisée dans du milieu ZY : 10 g de Tryptone (*Amresco*) et 5g de Yeast Extract (*Extract of Autolized Yeast cells, BD*) dissous dans 1 litre d'eau mQ. Dans un erlen de 1 litre, 200 ml de milieu ZY sont doncensemencés par 200 µl de préculture, auxquels sont ajoutés : 200 µl de MgSO₄ 1M, 200 µl de « 1000x metals mix », 4 ml de 50 x 5052, 10 ml de 20 x NPS, et 200 µl ampicilline 10%. Cette culture est incubée à 20°C durant 48h à 180 rpm.

A la fin du temps d'incubation, le culot bactérien est isolé du surnageant de culture par centrifugation du milieu à 6200 g pendant 25 min à 4°C.

F.4. Préparations des extraits bactériens

Les culots bactériens, contenant les sulfatases surexprimées, sont resuspendus dans du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM à pH 7,5 avec ¼ de comprimé d'antiprotéase (*Complete, EDTA-Free, Roche*). Les cellules sont ensuite lysées à la presse de French, et les extraits obtenus ultracentrifugés à 46 500 g pendant 2h environ.

Les lysats sont ensuite dialysés (MWCO 3500Da, *Spectra/Por*) contre du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM à pH 7,5 pendant 3h, sous agitation à 4°C.

Pour les analyses RMN, les extraits de sulfatases surexprimées dans *E. coli* sont « nettoyés » par filtration sur membrane (Cellule Amicon Bioséparations, *Millipore*) via une ultrafiltration sur 100 kDa (dilution 5 avec le tampon de dialyse). Le filtrat récolté est ensuite reconcentré sur une membrane de 30 kDa.

F.5. Test d'activité sulfatase sur substrat synthétique (MUF-S)

La **MUF-S** (méthylumbelliferyl-sulfate, *Sigma*) est un substrat synthétique des sulfatases. La libération de la **MUF** (méthylumbelliférone) après la réaction de clivage du groupement sulfate est visualisée par la fluorescence de ce substrat (Figure CE-2).

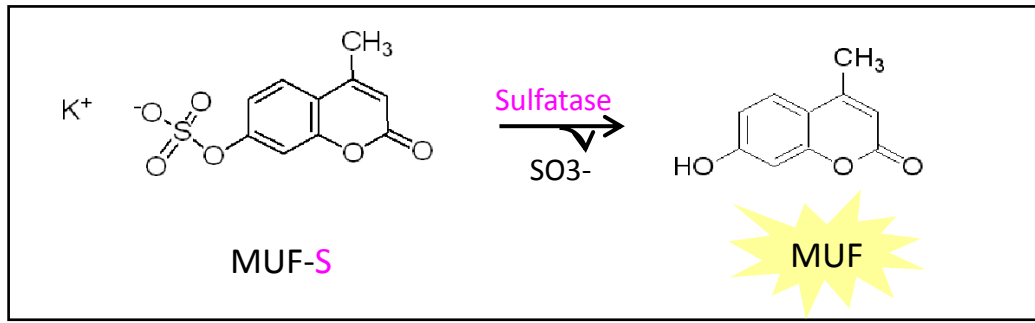


Figure CE-2 : Réaction chimique de la MUF en présence d'une sulfatase

Dans un insert placé dans un eppendorf opaque, sont incubés 100 µl de lysat bactérien avec 2 µl de MUF-S (2,5 mg/ml formamide). Les blancs sont réalisés de la même façon avec des extraits inactivés à 100°C puis centrifugés. L'ensemble des échantillons est incubé à 37°C dans une étuve durant une nuit. La fluorescence est ensuite mesurée par un Transilluminator (*Fisher Bioblock Scientific*) à l'aide du logiciel « Vision Capt » par comparaison relative des blancs avec les incubations des échantillons.

F.6. Test d'activité sulfatase sur carraghénane par chromatographie

50 µl de lysat bactérien (préparé tel qu'au § VI. D.) sont mis en présence de 50 µl d'une solution de carraghénane à 0,5% (p/v) dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5. A ce mélange est ajouté 10 µl de CaCl₂, connu pour favoriser l'activité des sulfatases à formylglycine. Les milieux réactionnels sont alors incubés à 30°C en bain-marie pendant une nuit. Pour chaque échantillon, un blanc est effectué dans des conditions similaires en ayant préalablement inactivé l'extrait enzymatique à 100°C durant une quinzaine de minutes. Le sulfate libéré lors de la réaction est ensuite mesuré comme décrit au § II. C. 2..

F.7. Purification des enzymes recombinantes

F.7.1 Sur mini-colonne nickel Sépharose de 200 µl

Une fraction aliquote de 600 µl de lysat bactérien (préparé tel qu'au § VI. D.) est mise en imidazole 15 mM puis déposée sur une mini-colonne Nickel Sépharose *High Performance*

(His SpinTrap, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée par 600 µl de tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, imidazole 15 mM à un pH de 7,5. La colonne est placée dans des tubes réceptacles de 2 ml puis centrifugée à 100 g pour éluer le tampon puis l'échantillon. La résine de la colonne est ensuite lavée par 600 µl du même tampon que pour l'équilibration. Les protéines sont alors éluées (toujours par centrifugation) par 2 ajouts successifs de 200 µl de tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, imidazole 1M à un pH de 7,5. Les petites fractions d'élution collectées (200 µl) sont mises sur gel d'électrophorèse (§ III. A. 2.) et testées pour leur capacité à désulfater le carraghénane (§ VI. F.).

F.7.2 Sur colonne nickel Sépharose de 20 ml

Le lysat bactérien obtenu à partir d'une culture d'1 litre en milieu LB (§ VI. C. 1.) est resuspendu dans du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM à un pH 7,5 avec ½ comprimé d'anti-protéase. Les cellules sont ensuite lysées à la presse de French, et l'extrait obtenu ultracentrifugé à 46 500 g pendant 2h. Le lysat est alors mis en dialyse (MWCO 3500 Da, *Spectra /Por*) contre du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, Imidazole 15 mM à un pH de 7,5 pendant 1 nuit à 4°C.

L'échantillon filtré (0,22 µm) est chargé à un débit de 2 ml/min *via* une superloop, sur une colonne de Nickel Sépharose™ 6 *Fast Flow* (His prep 20ml, *GE Healthcare*) préalablement équilibré dans le même tampon que celui de dialyse. Cette colonne d'affinité permet la purification de protéines His-tagguées. L'élution des protéines est effectuée à un débit de 2,5 ml/min par un gradient croissant en imidazole de 15 mM à 1M en 10 volumes de colonne. Les fractions collectées (2 ml) au niveau du pic d'absorbance sont mises sur gel d'électrophorèse (§ III. A. 2.) afin de vérifier la pureté de l'enzyme.

Pour les sulfatases Q15XH1 et Q15XG7, une deuxième étape fut nécessaire. Les fractions issues du pic d'élution de la colonne de nickel ont été rassemblées et concentrées sur centricons (10kDa, Amicon® Ultra, *Millipore*). Cet extrait (500 µl) a été déposé par une boucle d'injection de 5ml sur une colonne de gel filtration Superdex de 24 ml. L'élution a été réalisée en mode isocratique par du tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, à pH 7,5 à un débit de 0,5 ml/min. Les fractions (0,5 ml) susceptibles de présenter l'activité ont été incubées en présence de carraghénane, et déposées en parallèle sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE.

G. Caractérisation des oligo- α -carraghénanes purs

G.1. Production des oligo- α -carraghénanes

Les oligo- α -carraghénanes ont été produits à partir d'oligo- ι -carraghénanes purifiés, réalisés dans les mêmes conditions qu'au § V. B. 1. (DP6 et DP4 produits avec la ι -carraghénase d'*A. Fortis* et DP2 avec celle de *P. atlantica*). Ces différents oligo- ι -carraghénanes ont été convertis avec la 4S-iota-carraghénane-sulfatase purifiée (§ III. A.). La fin de la conversion a été établie par chromatographie HPSEC tel qu'au § V. C. Les échantillons ont ensuite été dessalés sur le même système, mais en utilisant uniquement la colonne Superdex peptide et du carbonate d'ammonium 50 mM. Les oligosaccharides d'intérêt ont été collectés manuellement directement à la sortie du détecteur.

G.2. Analyses RMN 1D et 2D des oligo- α -carraghénanes

(réalisé par la Service RMN de l'UBO de Brest)

Les analyses des oligo- α -carraghénanes ont été réalisées par des expériences RMN 1D ^1H , ^{13}C Jmod et 2D (COSYDQF, HMQC ^1H - ^{13}C , HMBC ^1H - ^{13}C) en utilisant des programmes standards de séquences BRUKER. Les expériences ont été effectuées à 25°C avec les paramétrages présentés ci-après.

Les spectres 500,13 MHz ^1H -RMN des oligosaccharides ont été enregistrés avec un angle d'impulsion de 30° en utilisant 64K points de données avec les paramètres suivants : fenêtre spectrale, 7485 Hz ; temps d'acquisition, 4,38 s ; temps de relaxation, 2 s ; nombre de scans, 16 ; résolution digitale 0,11 Hz/point.

Les spectres RMN 1D ^{13}C Jmod a été enregistré en utilisant 32K points de données avec une fenêtre spectrale de 30 120 Hz, un temps d'acquisition de 0,54 s et un temps de relaxation de 2 s ; le nombre de scans était de 41 092 avec une résolution digitale de 0,92 Hz/point.

Pour les expériences COSYDQF, un total de 48 fid, chacune consistant en 48 scans avec un temps de relaxation de 2 s et un temps d'acquisition de 0,37 s a été enregistré. La

fenêtre spectrale dans les deux dimensions était de 1398 Hz. Les données de la matrice ont été complétées à 1024*1024 avec une résolution digitale de 1,37 Hz/point.

Pour le spectre hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HMQC, un total de 140 fid, chacune consistant en 64 scans avec un temps de relaxation de 1,8 s et un temps d'acquisition de 0,37 s, a été enregistré. La fenêtre spectrale dans les dimensions F2 et F1 était respectivement de 1398 et 17 608 Hz. Les données de la matrice ont été complétées à 1024*1024 avec une résolution digitale de 1,37 Hz/point dans F2 et 17,19 Hz/point dans F1.

Pour le spectre hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HMBC, un total de 140 fid, chacune consistant en 96 scans avec un temps de relaxation de 2 s et un temps d'acquisition de 0,37 s, a été enregistré. La fenêtre spectrale dans les dimensions F2 et F1 était respectivement de 1398 et 17 608 Hz. Les données de la matrice ont été complétées à 1024*1024 avec une résolution digitale de 1,36 Hz/point dans F2 et 17,19 Hz/point dans F1.

ANNEXE CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

La RMN des carraghénanes

La ^{13}C -RMN s'est développée en amont de celle du proton et est devenue rapidement un outil de référence pour analyser la composition des agars et des carraghénanes. En effet, cette technique, rapide et non destructive, permet d'obtenir une caractérisation des motifs disaccharidiques de répétition majoritaires des carraghénanes. Elle permet notamment de discriminer facilement les unités D-galactose des unités L-galactose, qui sont caractéristiques des agarocolloïdes, car ces dernières présentent un signal anomérique déblindé de 3 ppm par rapport au D-galactose (Usov *et al.*, 1980). Par rapport à la RMN du proton, la RMN du carbone présente l'avantage de mieux séparer les différents signaux, notamment anomériques, rendant les attributions plus faciles. Dans le cas des carraghénanes, l'inconvénient de la ^{13}C -RMN est qu'elle nécessite une concentration importante des échantillons (jusqu'à 10 mg/ml) engendrant par conséquent une viscosité notable de ces polymères en solution, et entraînant un élargissement important des signaux sur les spectres. La viscosité peut néanmoins être réduite par dépolymérisation (sonication, hydrolyse acide, ou broyage mécanique) et par acquisition des données à haute température. Cela a notamment permis l'attribution des déplacements chimiques du λ -carraghénane (Falshaw & Furneaux, 1994), ce qui était auparavant impossible avec la largeur des signaux. Toutefois, la RMN du carbone demeure une méthode peu sensible, nécessitant une quantité importante d'échantillon et ne permettant pas la détection de composants minoritaires ou de contaminants.

La ^1H -RMN s'est développée un peu plus tard que celle du carbone, mais nécessite aujourd'hui un temps d'acquisition beaucoup plus court et une quantité bien moins importante de substrat (jusqu'à 1mg/ml en limite basse). Cette méthode est plus adaptée pour la quantification et la détection de composés minoritaires. La ^1H -RMN permet de résoudre dans le détail la structure d'oligosaccharides complexes. Elle permet de déterminer à la fois les différentes structures des galactopyranoses composant la chaîne de carraghénane, mais aussi celles des unités voisines. En effet, si l'on prend le cas d'une unité G4S par exemple, les

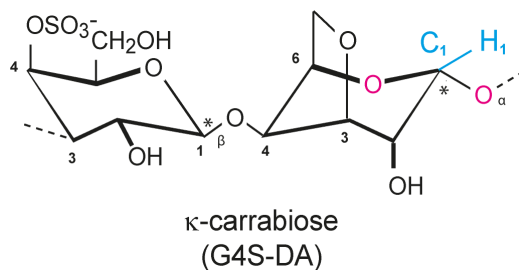


Figure CE-3 : Proton et carbone anomériques H₁ et C₁ d'une structure de κ-carraghénane

Les deux atomes d'oxygène provoquant le déblindage sont colorés en rose.

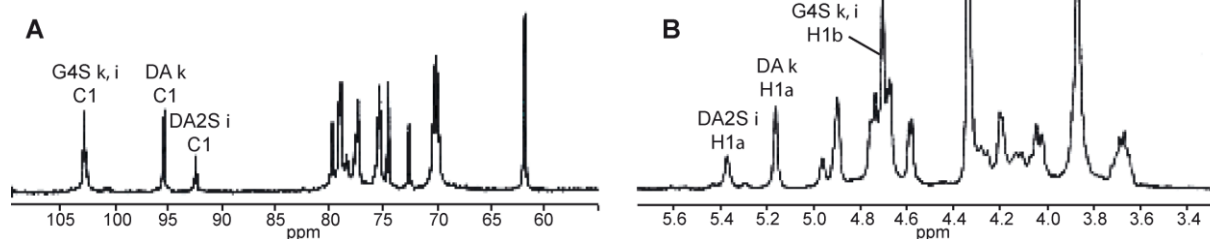


Figure CE-4 : Spectres ¹³C-RMN (A) et ¹H-RMN (B) d'un κ-ι-carraghénane

(van de Velde *et al.*, 2001)

Les déplacements chimiques des carbones et des protons anomériques sont indiqués

| | | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6a | H6b | | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6a | H6b |
|----------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|------|------|------|------|------|------|
| ι ¹ | G4S | 4.64 | 3.62 | 3.99 | 4.90 | 3.77 | 3.83 | 3.81 | DA2S | 5.30 | 4.67 | 4.84 | 4.69 | 4.67 | 4.25 | 4.10 |
| | κ ¹ | G4S | 4.61 | 3.60 | 3.95 | 4.81 | 3.77 | 3.81 | 3.79 | DA | 5.09 | 4.13 | 4.51 | 4.63 | 4.61 | 4.19 |
| α ² | G | 4.61 | 3.62 | 3.82 | 4.10 | 3.65 | - | - | D2S | 5.22 | 4.61 | 4.73 | 4.65 | 4.67 | 4.21 | 4.09 |
| | λ ⁴ | G2S | 4.78 | 4.50 | 3.97 | 4.32 | 3.75 | 3.87 | 3.82 | D2S,6S | 5.59 | 4.71 | 4.26 | 4.29 | 4.64 | 4.37 |
| β ³ | G | - | - | - | - | - | - | - | DA | 5.07 | - | - | - | - | - | - |
| | μ ³ | G4S | - | - | - | - | - | - | D6S | 5.24 | - | - | - | - | - | - |
| ν ³ | G4S | - | - | - | - | - | - | - | D2S,6S | 5.50 | - | - | - | - | - | - |

Tableau CE-1 : Déplacements chimiques des protons des différentes structures de carraghénanes (en ppm)

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

déplacements chimiques des protons comme des carbones, ne sont pas les mêmes si celle-ci est entourée de deux unités DA comme dans le cas du κ -carraghénane, ou de deux unités DA2S comme dans le cas du ι -carraghénane (Figure CE-4).

1. Importance des carbones/protons anomériques dans les structures de carraghénanes

La caractérisation RMN des structures de carraghénanes repose principalement par la mesure des déplacements chimiques des carbones et des protons anomériques, C1 et H1, des différents motifs carrabiose (Figure CE-3). L'anomérie est due à la cyclisation des oses qui change l'état d'hybridation du carbone. De ce fait, les signaux des carbones et protons anomériques se trouvent déblindés par la proximité des deux atomes d'oxygène électro-attracteurs liés au C1 (Figure CE-4). Les C1 des unités D et G sont isolés dans la zone des déplacements chimiques comprise entre 90 et 110 ppm, tandis que les protons H1 α des unités D sont cantonnés dans la zone comprise entre 5,0 et 5,7 ppm (Agrawal, 1992). La quantification s'effectue par intégration de ces différents signaux, et la caractérisation de nouveaux motifs carrabiose par comparaison avec les signaux anomériques des motifs déjà caractérisés.

La synthèse des données ^{13}C -RMN et ^1H -RMN des unités carrabiose caractérisées est présentée dans les tableaux CE-1 et CE-2. Les valeurs sont exprimées en référence au DDS (diméthyl-silapentane-sulfonate), selon les recommandations de l'IUPAC. En RMN du proton, les attributions ne sont complètes que dans les cas des κ -, ι -, α - et λ -carraghénanes. Les autres motifs ne sont présents que de façon minoritaire dans l'une des structures précédentes, aussi leur signaux ne sont pas assez intenses pour être totalement attribués, mise à part celle du proton anomérique H1 α . De plus, les autres signaux des protons se superposent souvent sous forme de doublet (ou doublet de doublet) dans la zone restreinte de 3,5 à 5,5 ppm, et deviennent donc difficilement interprétables.

| | | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
|-------------|-----|-------|------|------|------|-------|------|--------|-------|------|------|------|-------|------|
| μ^1 | G4S | 107.0 | 72.7 | 80.5 | 76.3 | 77.1 | 63.5 | D6S | 100.3 | 70.7 | 72.8 | 81.4 | 70.5 | 69.9 |
| ν^1 | G4S | 106.7 | 72.4 | 82.4 | 73.4 | 77.2 | 63.6 | D2S,6S | 100.5 | 78.6 | 70.4 | 82.1 | 70.4 | 70.0 |
| κ^1 | G4S | 104.7 | 71.7 | 81.0 | 76.3 | 77.0 | 63.5 | DA | 97.3 | 72.1 | 81.4 | 80.5 | 79.1 | 71.7 |
| ι^1 | G4S | 104.4 | 71.5 | 79.1 | 74.3 | 77.0 | 63.5 | DA2S | 94.3 | 77.2 | 80.0 | 80.6 | 79.29 | 72.0 |
| λ^8 | G2S | 105.8 | 79.9 | 76.5 | 66.5 | 77.3 | 63.6 | D2S,6S | 94.1 | 78.1 | 70.5 | 82.7 | 71.1 | 72.1 |
| θ^1 | G2S | 102.6 | 79.8 | 79.4 | 70.0 | 77.1 | 63.4 | DA2S | 97.8 | 77.1 | 79.6 | 81.8 | 79.2 | 72.4 |
| ξ_7^1 | G2S | 105.4 | - | - | 66.9 | - | - | D2S | 94.9 | - | - | - | - | - |
| | G2S | 106.9 | 72.7 | 81.1 | 67.8 | 77.5 | 63.3 | D | 98.3 | 71.3 | 73.0 | 80.6 | 72.6 | 63.6 |
| γ^2 | G | 106.4 | - | - | 67.4 | - | - | D6S | 98.4 | - | - | - | - | 70.4 |
| β^1 | G | 104.8 | 71.7 | 82.6 | 68.6 | 77.55 | 63.5 | DA | 96.8 | 72.4 | 81.6 | 80.3 | 79.3 | 71.7 |
| α^3 | G | 104.8 | 71.7 | 84.0 | 69.0 | 77.4 | 63.7 | DA2S | 96.8 | 77.5 | 80.2 | 80.4 | 79.2 | 72.1 |
| ω^4 | G6S | 104.8 | 71.5 | 82.4 | 68.1 | 75.0 | 69.3 | DA | 96.8 | 72.3 | 81.6 | 80.6 | 79.0 | 71.5 |
| ψ_5^6 | G6S | 107.4 | 73.0 | 80.9 | 75.5 | 77.2 | 63.9 | D6S | 100.3 | 71.1 | 73.0 | 81.4 | 70.9 | 70.4 |
| | GP | 104.1 | 71.3 | 78.8 | 69.6 | 68.8 | 67.7 | DA2S | 93.5 | 77.3 | 80.0 | 80.5 | 79.2 | 72.1 |

Tableau CE-2 : Déplacements chimiques des carbones (en ppm) des différentes structures de carraghénanes

Les déplacements chimiques sont exprimés en référence au DDS (diméthyl-silapentane-sulfonate) dans du D₂O. Les valeurs issues des références 2, 3, 4, 5, 6, 7, et 8 ont été corrigées de 2,1 ppm pour être exprimées en référence au DDS au lieu du TMS (tétraméthylsilane).

(1) (van de Velde *et al.*, 2004), (2) (Greer & Yaphe, 1984a), (3) 50°C (Falshaw *et al.*, 1996), (4) (Usov *et al.*, 1985), (Chiovitti *et al.*, 1998), (6) (Noseda & Cerezo, 1993), (7) 80°C (Usov *et al.*, 1980), (8) (Guibet *et al.*, 2006).

2. [Cas des oligo-carraghénanes](#)

Dès les premiers travaux d'analyse RMN sur des carraghénanes, les oligosaccharides produits par hydrolyse enzymatique ont aidé à attribuer les signaux dans les spectres des polymères correspondants (Bhattacharjee *et al.*, 1978). Les spectres d'oligo-carraghénanes sont en effet mieux résolus que ceux des carraghénanes, notamment pour des questions de viscosité, mais également de pureté des échantillons. Cependant les spectres d'oligo-carraghénanes sont plus complexes car les déplacements chimiques des protons et des carbones diffèrent selon leur position dans l'oligosaccharide : extrémité réductrice (r), interne ou non réductrice (nr). De plus, il s'établit à l'extrémité réductrice un équilibre entre les anomères α et β , qui peuvent s'interconvertir lors d'ouvertures et fermetures spontanées du cycle. Cette anomérie influence les déplacements chimiques de l'unité positionnée à l'extrémité réductrice, mais parfois également ceux de l'unité voisine (r') (Knutsen & Grasdalen, 1992b).

3. [Identification et positionnement des substituants](#)

Les travaux d'Izumi (Izumi, 1973) et de Harris (Harris & Turvey, 1970) sur des 3,6-anhydro-D-galactoses et sur des galactopyranoses substitués ont servi de point de départ pour l'analyse des agars et des carraghénanes. Par la suite, la résolution des structures et l'attribution des différents signaux ont été faites par comparaison avec les spectres déjà résolus, notamment ceux de l'agarose, du κ - et du ι -carraghénane. La position des substituants tels que le sulfate ou le méthyle est notamment déterminée par comparaison avec le galactane non substitué correspondant (Usov, 1984). A titre d'exemple, la position du sulfate dans la structure du κ -carraghénane (DA-G4S) a été déterminée en ^{13}C -RMN grâce au spectre du β -carraghénane (DA-G) (Usov *et al.*, 1980). En effet, la méthylation, sulfation ou glycosylation d'un groupement hydroxyle induit un déblindage (8-11 ppm) du carbone auxquels ils sont liés

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

Tableau CE-3 : Constantes de couplage spin-spin des carraghénanes (^1H -RMN)

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

(effet α du substituant) alors que les 2 carbones voisins sont légèrement blindés (2-4 ppm) (effet β) (Usov, 1984). La sulfatation provoque aussi un déblindage du proton géminale (distant de 2 liaisons) de 0,6 ppm, et son effet sur les protons vicinaux (distant de 3 liaisons) dépend de l'orientation axiale ou équatoriale des deux groupements (Harris & Turvey, 1970). La présence de substitution méthylées est caractérisée par le signal en singulet du CH₃, à 61,14 ppm en ¹³C-RMN et dans la région de 3,40 à 3,65 ppm en ¹H-RMN. La présence de groupements pyruvate est identifiée par le signal des protons du CH₃ à 1,44 ppm, et en ¹³C-RMN par le signal du CH₃ à 27,61 ppm, celui de l'acétal à 103,55 ppm et celui du carboxyle à 177,96 ppm.

4. Détermination du type de liaison

Par mesure du couplage scalaire ³J des protons anomériques H1, il est possible de déterminer la configuration α ou β des liaisons glycosidiques. En effet, la valeur de ce couplage dépend de l'angle dièdre H1-C1-C2-H2, formé entre les protons H1 et H2 distants de 3 liaisons (loi de Karplus). Les unités D ou DA, de conformation anomérique α , engendrent un angle dièdre H1-C1-C2-H2 d'environ 60° correspondant à une constante de couplage ³J_{H1-H2} relativement faible d'environ 2 à 4 Hz. A l'inverse, les unités G, de conformation anomérique β , forment un angle dièdre de 180° correspondant à une constante de couplage ³J_{H1-H2} bien plus importante allant de 7 à 9 Hz. Dans ce cas, le doublet du H1 sera observé vers 4,4-4,8 ppm (Agrawal, 1992). Le tableau CE-3 présente les constantes de couplage ³J mesurées pour les κ -, ι -, et λ -carraghénanes.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adrian, J. and Assoumani, M. (1979). Les propriétés chimiques et physiologiques des additifs épaississants et gélifiants (agents de texture). *Rev. Fr. Diet.*, **23**, 3-25.

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

Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y. and Yamasato, K. (1992). *Alteromonas atlantica* SQ. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., Bacteria that decompose algal polysaccharides. *International Journal of System. Bacteriology* **42**, 621-627.

Albersheim, P. and Darvill, A. G. (1985). Oligosaccharins. *Scientific American* **253**, 58-63.

Allsobro.Aj, Nunn, J. R. and Parolis, H. (1974). Linkage of 4-O-Methyl-L-Galactose in Sulfated Polysaccharide of *Aeodes-Ulvoidea* .8. *Carbohydrate Research* **36**, 139-145.

Amsler, C. D. and Fairhead, V. A. (2005). Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Adv. Bot. Res.* **43**, 1-91.

Anderson, N., Dolan, T. and Rees, D. (1973). Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Euचेuma spinosum* and *Euचेuma cottonii*. The covalent structure of ι-carrageenan. *Journal of Chemical Society* **19**, 2173-2176.

Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, M. M., Rees, D. A. and Samuel, J. W. (1969). X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: double helix models for κ- and ι-carrageenans. *Journal of Molecular Biology* **45**, 85-99.

Anderson, N. S., Dolan, T. C. S., Penman, A., Rees, D. A., Mueller, G. P., Stanciof.Dj and Stanley, N. F. (1968). Carrageenans .4. Variations in Structure and Gel Properties of Kappa-Carrageenan and Characterisation of Sulphate Esters by Infrared Spectroscopy. *Journal of the Chemical Society C-Organic*, 602-609.

Andrews, J. H. (1976). Pathology of Marine-Algae. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **51**, 211-253.

Armisen, R. and Galatas, F. (2000). Agar. In *Handbook of hydrocolloids*, (ed. G. O. P. a. P. A. Williams): Woodhead Publishing Limited.

Armstrong, E., Yan, L. M., Boyd, K. G., Wright, P. C. and Burgess, J. G. (2001). The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* **461**, 37-40.

Arnott, S., Scott, W. E., Rees, D. A. and McNab, C. G. A. (1974). L-Carrageenan - Molecular-Structure and Packing of Polysaccharide Double Helices in Oriented Fibers of Divalent-Cation Salts. *Journal of Molecular Biology* **90**, 253-267.

Aubert, M. and Pesando, D. (1971). Télémédiateurs chimiques et équilibre biologique océanique

Rev. Intern. Océanogr. Méd **21**, 17-22.

Azam, F. and Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 782-791.

Baird, A. and Bohlen, P. (1991). Peptide growth factors and their receptors. New- York: Springer Verlag.

Baldauf, S. L. (2008). An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution* **46**, 263-273.

Ballabio, A. and Shiparo, I. J. (2001). Steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, pp. 4241- 4262.: Scriver C. R. , .Beaudet, A.L. , Sly; A. S., Valle, D., eds.

Ballantine, D. L., Gerwick, W. H., Velez, S. M., Alexander, E. and Guevara, P. (1987). Antibiotic-activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine-algae. *Hydrobiologia* **151**, 463-469.

Barbeyron, T., Gerard, A., Potin, P., Henrissat, B. and Kloareg, B. (1998). The kappa-carrageenase of the marine bacterium *Cytophaga drobachiensis*. Structural and phylogenetic relationships within family-16 glycoside hydrolases. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 528-537.

Barbeyron, T., Henrissat, B. and Kloareg, B. (1994). The gene encoding the kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to beta-1,3-1,4-glucanases. *Gene* **139**, 105-109.

Barbeyron, T., L'Haridon, S., Corre, E., Kloareg, B. and Potin, P. (2001). *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp nov., a marine species of Flavobacteriaceae isolated from a red alga, and classification of [*Cytophaga*] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 985-997.

Barbeyron, T., Michel, G., Potin, P., Henrissat, B. and Kloareg, B. (2000). Iota-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 35499-35505.

Barbeyron, T., Potin, P., Richard, C., Collin, O. and Kloareg, B. (1995). Arylsulfatase from *Alteromonas carrageenovora*. *Microbiology-Uk* **141**, 2897-2904.

Bellion, C., Brigand, G., Prome, J.-C., Welti, D. and Bociek, S. (1983). Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de R.M.N.-13C. *Carbohydrate Research* **119**, 31-48.

Bellion, C., Hamer, G. and Yaphe, W. (1981). Analysis of kappa-iota hybrid carrageenans with kappa-carrageenase, iota- carrageenase and 13C-NMR. In *Xth International Seaweed Symposium*, ed.

Bellion, C., Hamer, G. and Yaphe, W. (1982). The degradation of *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii* carrageenans by ι-carrageenases and κ-carrageenases from marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **28**, 874-880.

- Benjdia, A., Deho, G., Rabot, S. and Berteau, O.** (2007). First evidences for a third sulfatase maturation system in prokaryotes from *E. coli* aslB and ydeM deletion mutants. *Febs Letters* **581**, 1009-1014.
- Benjdia, A., Subramanian, S., Leprince, J., Vaudry, H., Johnson, M. K. and Berteau, O.** (2008). Anaerobic sulfatase-maturing enzymes, first dual substrate radical S-adenosylmethionine enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 17815-17826.
- Benjdia, A., Subramanian, S., Leprince, J., Vaudry, H., Johnson, M. K. and Berteau, O.** (2010). Anaerobic sulfatase-maturing enzyme - A mechanistic link with glycy radical-activating enzymes? *Febs Journal* **277**, 1906-1920.
- Berland, B. R., Bonin, D. J., Cornu, A. L., Maestrin.Sy and Marino, J. P.** (1972). Antibacterial Substances of Marine Alga *Stichochrysis-Immobilis* (Chrysochyta). *Journal of Phycology* **8**, 383-392.
- Berland, B. R., Bonin, D. J., Daumas, R. A., Laborde, P. L. and Maestrin.Sy.** (1970). Variations of Physiological Characteristics of Alga *Monallantus salina* (Xanthophyceae) in Culture. *Marine Biology* **7**, 82-92.
- Berteau, O., Guillot, A., Benjdia, A. and Rabot, S.** (2006). A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 22464-22470.
- Bhakuni, D. S. and Rawat, D. S.** (2005). Bioactive marine natural products. New York, NY: Springer.
- Bhattacharjee, S. S., Yaphe, W. and Hamer, G. K.** (1978). ¹³C-NMR spectroscopic analysis of agar, kappa-carrageenan and iota-carrageenan. *Carbohydrate Research*. **60**, C1-C3.
- Bhattacharyya, S. O. and S.; O-Sullivan, I. K., S.; et al.** (2012). Exposure to the common food additive carrageenan leads to glucose intolerance, insulin resistance and inhibition of insulin signalling in HepG2 cells and C57BL/6J mice *Diabetologia* **55 (1)**, 194- 203.
- Bixler, H. J.** (1996). Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia* **327**, 35-57.
- Bixler, H. J., Johndro, K. and Falshaw, R.** (2001). Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications. *Food Hydrocolloids* **15**, 619-630.
- Bixler, H. J. and Porse, H.** (2011). A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology* **23**, 321-335.
- Bjerre-Petersen, E., Christensen, J. and Hemmingsen, P.** (1973). Furcellaran. In *Industrial Gum*, (ed. R. L. R.L. Whistler and J. N. BeMiller), pp. 123-136. New York: Academic Press.
- Black, W. A. P.** (1950). The seasonal variation in the cellulose content of the common Scottish Laminariaceae and Fucaceae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **29**, 379-387.
- Bojarova, P. and Williams, S. J.** (2008). Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**, 573-581.

- Boltes, I., Czapinska, H., Kahnert, A., von Bulow, R., Dierks, T., Schmidt, B., von Figura, K., Kertesz, M. A. and Uson, I.** (2001). 1.3 A structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure* **9**, 483-491.
- Bond, C. S., Clements, P. R., Ashby, S. J., Collyer, C. A., Harrop, S. J., Hopwood, J. J. and Guss, J. M.** (1997). Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* **5**, 277-289.
- Bongaerts, K., Reynaers, H., Zanetti, F. and Paoletti, S.** (1999). Equilibrium and nonequilibrium association processes of kappa-carrageenan in aqueous salt solutions. *Macromolecules* **32**, 675-682.
- Bonin, D. J.** (1969). Influence des différents facteurs écologiques sur la croissance de la diatomée marine *Chaetoceros affinis* Lauder en culture. *Téthys* **1**, 173-238.
- Bouarab, K., Potin, P., Correa, J. and Kloareg, B.** (1999). Sulfated Oligosaccharides Mediate the Interaction between a Marine Red Alga and Its Green Algal Pathogenic Endophyte. *Plant Cell* **11**, 1635-1650.
- Bourgoin, A., Zablackis, E. and Poli, J. B.** (2008). Characterization of alpha-carrageenan solution behavior by field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Food Hydrocolloids* **22**, 1607-1611.
- Buchanan, J., Percival, E. E. and Percival, E. G. V.** (1943). the polysaccharides of carrageen moss (*Chondrus crispus*). Part I. The linkage of the D- galactose residues and the ethereal sulphate. *J. Chem. Soc.*, 51- 54.
- Buck, C. B., Thompson, C. D., Roberts, J. N., Muller, M., Lowy, D. R. and Schiller, J. T.** (2006). Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *Plos Pathogens* **2**, 671-680.
- Buono, M. and Cosma, M. P.** (2010). Sulfatase activities towards the regulation of cell metabolism and signaling in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 769-780.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P. G.** (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327-33.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B.** (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37**, D233-D238.
- Carlson, B. L., Ballister, E. R., Skordalakes, E., King, D. S., Breidenbach, M. A., Gilmore, S. A., Berger, J. M. and Bertozzi, C. R.** (2008). Function and structure of a prokaryotic formylglycine-generating enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 20117-20125.
- Carlucci, M., Pujol, C., Ciancia, M., Nosedà, M., Matulewicz, M., Damonte, E. and Cerezo, A.** (1997). Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules* **20**, 97-105.

- Carlucci, M. J., Scolaro, L. A. and Damonte, E. B.** (2002). Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: Lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype. *Journal of Medical Virology* **68**, 92-98.
- Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., Nosedá, M. D., Cerezo, A. S. and Damonte, E. B.** (2004). Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. *Antiviral Research* **64**, 137-141.
- Carrico, I. S., Carlson, B. L. and Bertozzi, C. R.** (2007). Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. *Nature Chemical Biology* **3**, 321-322.
- Chabbert, Y. A.** (1963). L'antibiogramme. sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques. *de la tourelle, St Mandé*.
- Chen, L. C.-M. M., J.** (1972). The life history of *Chondrus crispus* in culture. *Canadian Journal of Botany* **50**, 1055-1060.
- Chiovitti, A., Bacic, A., Craik, D. J., Kraft, G. T. and Liao, M. L.** (2004). A nearly idealized 6'-O-methylated t-carrageenan from the Australian red alga *Clavulonium ovatum* (Acrotylaceae, Gigartinales). *Carbohydrate Research* **339**, 1459-1466.
- Chiovitti, A., Bacic, A., Craik, D. J., Kraft, G. T., Liao, M. L., Falshaw, R. and Furneaux, R. H.** (1998). A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red alga *Sarconema filiforme* (vol 310, pg 77, 1990). *Carbohydrate Research* **314**, 289-289.
- Chiovitti, A., Bacic, A., Craik, D. J., Munro, S. L. A., Kraft, G. T. and 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.
- Chopin, T., Kerin, B. F., Mazerolle, R.** (1999). Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research*, **47 (3)**, 167-188
- Ciancia, M., Matulewicz, M. and Cerezo, A.** (1997). Alkaline modification of carrageenans. Part III. Use of mild alkaline media and high ionic strengths. *Carbohydrate Polymers* **32**, 293-295.
- Ciancia, M., Nosedá, M. D., Matulewicz, M. C. and Cerezo, A. S.** (1993). Alkali-Modification of Carrageenans - Mechanism and Kinetics in the Kappa-Iota-Series, Mu-Nu-Series and Lambda-Series. *Carbohydrate Polymers* **20**, 95-98.
- Clare, A. S.** (1996). Marine natural product antifoulants: Status and potential. *Biofouling* **9**, 211-229.
- Coetzee, T., Suzuki, K. and Popko, B.** (1998). New perspectives on the function of myelin galactolipids. *Trends in Neurosciences* **21**, 126-130.
- Colin, S.** (2005). Développement d'enzymes recombinants issus des bactéries marines *P. carrageenovora* et SW5 pour la production d'oligo-fucoïdanes et d'oligo-lambda -carraghénanes. Thèse de l'Université de Compiègne.

- Collen, P. N., Lemoine, M., Daniellou, R., Guegan, J. P., Paoletti, S. and Helbert, W.** (2009). Enzymatic Degradation of kappa-Carrageenan in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* **10**, 1757-1767.
- Coombe, D. R., Parish, C. R., Jakobsen, K. B. and Underwood, P. A.** (1987). Sulfated Polysaccharides with Antimetastatic Activity Act by Inhibiting Tumor-Cell Secreted Endoglycosidases. *Cell Biology International Reports* **11**, 253-253.
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, J. C., Glavina del Rio, T., Hammon, N., Israni, S., Dalin, E., Tice, H. et al.** (2006). Complete sequence of *Pseudoalteromonas atlantica* T6c, (ed. GenBank).
- Corpe, W. A.** (1973). Microfouling: The role of primary film forming marine bacteria. In *Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling* ., vol. III, pp. 598-609. . Northwestern U.P: R. F. Acker, Brown, B.F., DePalma, J.R., and Iverson, W.P. Evanston (ed.,) .
- Corre, S. and Prieur, D.** (1990). Density and Morphology of Epiphytic Bacteria on the Kelp *Laminaria-Digitata*. *Botanica Marina* **33**, 515-523.
- Correa, J. A. and Sanchez, P. A.** (1996). Ecological aspects of algal infectious diseases. *Hydrobiologia* **327**, 89-95.
- Correc, G., Barabanova, A., Tuvikene, R., Truus, K., Yermak, I. and Helbert, W.** (2012). Comparison of the structures of hybrid kappa-/beta-carrageenans extracted from *Furcellaria lumbricalis* and *Tichocarpus crinitus*. *Carbohydrate Polymers* **88**, 31-36.
- Costa-Ramos, C. and Rowley, A. F.** (2004). Effect of extracellular products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the edible crab *Cancer pagurus*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 729-735.
- Craigie, J.** (1990). Cell Walls. In *Biology of the red algae*. pp. 221-257 (ed. K. Cole and R. Sheath). Cambridge: Cambridge University Press.
- Craigie, J. and Wong, H.** (1978). Carrageenan biosynthesis. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 369-377.
- Cronshaw, J., Myers, A. and Preston, R. D.** (1958). A chemical and physical investigation of the cell walls of some marine algae. *Biochimica Et Biophysica Acta* **27**, 89-103.
- Cuppo, F., Reynaers, H. and Paoletti, S.** (2002). Association of kappa-carrageenan induced by Cs⁺ ions in iodide aqueous solution: A light scattering study. *Macromolecules* **35**, 539-547.
- Daiyasu, H., Osaka, K., Ishino, Y. and Toh, H.** (2001). Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold. *Febs Letters* **503**, 1-6.
- Davies, G. J. and Henrissat, B.** (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859.
- Davison, J., Brunel, F., Phanopoulos, A., Prozzi, D. and Terpstra, P.** (1992). Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes determining sodium dodecyl sulfate biodegradation. *Gene* **114**, 19-24.

- Dawes, C. J., Stanley, N. F. and Stancioff, D. J.** (1977). Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry, and iota-carrageenan from floridian *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* **20**, 137-147.
- De Ruiter, G. and Rudolph, B.** (1997). Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science and Technology* **8**, 389-395.
- de Vries, J.** (2002). Interaction of carrageenan with other ingredients in dairy dessert gels. . In *11th Conference on Gums and Stabilisers for Food Industry*, vol. 278 (ed. P. P. Williams, GO), pp. 201-210. NE Wales Inst, Wrexham, Wales.
- Dewar, E. T. and Percival, E. G. V.** (1947). The Polysaccharides of Carrageen .2. The Gigartina-Stellata Polysaccharide. *Journal of the Chemical Society*, 1622-1626.
- Di Ninno, V. L., Mc Candless, E. L. and Bell, R. A.** (1979). Pyruvic acid derivative of carrageenan from a marine red alga (*Petrocelis* species). *Carbohydr. Res.* **71**, 61-64.
- Dierks, T., Dickmanns, A., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Mariappan, M., von Figura, K., Ficner, R. and Rudolph, M. G.** (2005). Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell* **121**, 541-552.
- Dierks, T., Lecca, M. R., Schlotterhose, P., Schmidt, B. and von Figura, K.** (1999). Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *Embo Journal* **18**, 2084-2091.
- Dierks, T., Lecca, M. R., Schmidt, B. and von Figura, K.** (1998). Conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases occurs by a common mechanism in the endoplasmic reticulum. *Febs Letters* **423**, 61-5.
- Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L. V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M. and von Figura, K.** (2003). Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* **113**, 435-444.
- Diez-Roux, G. and Ballabio, A.** (2005). Sulfatases and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **6**, 355-379.
- Dimitrieva, G. Y., Crawford, R. L. and Yuksel, G. U.** (2006). The nature of plant growth-promoting effects of a pseudoalteromonad associated with the marine algae *Laminaria japonica* and linked to catalase excretion. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 1159-1169.
- Dolan, T. C. S. and Rees, D. A.** (1965). Carrageenans .2. Positions of Glycosidic Linkages and Sulphate Esters in Lambda-Carrageenan. *Journal of the Chemical Society*, 3534-3539.
- Doty, M. S. and Santos, G. A.** (1978). Carrageenans from tetrasporic and cytocarpic *Eucheuma* species. *Aquatic Botany* **4**, 143-149.
- Doyle, J. P., Giannouli, P., Rudolph, B. and Morris, E. R.** (2010). Preparation, authentication, rheology and conformation of theta carrageenan. *Carbohydrate Polymers* **80**, 648-654.

- Duarte, M. E. R., Nosedá, M. D., Cardoso, M. A., Tulio, S. and Cerezo, A. S.** (2002). The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. *Carbohydrate Research* **337**, 1137-1144.
- Dubber, D. and Harder, T.** (2008). Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture* **274**, 196-200.
- Ebel, J.** (1998). Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioessays* **20**, 569-576.
- Egan, S., Thomas, T. and Kjelleberg, S.** (2008). Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 219-225.
- Elias, C. J., Coggins, C., Alvarez, F., Brache, V., Fraser, I. S., Lacarra, M., Lahteenmaki, P., Massai, R., Mishell, D. R., Phillips, D. M. et al.** (1997). Colposcopic evaluation of a vaginal gel formulation of iota-carrageenan. *Contraception* **56**, 387-389.
- Estevez, J. M., Ciancia, M. and Cerezo, A. S.** (2004). The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. *Carbohydrate Research* **339**, 2575-2592.
- Faham, S., Linhardt, R. J. and Rees, D. C.** (1998). Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 578-586.
- Falshaw, R. and Furneaux, R. H.** (1994). Carrageenan from the Tetrasporic Stage of *Gigartina-decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **252**, 171-182.
- Falshaw, R. and Furneaux, R. H.** (1995). Carrageenans from the Tetrasporic Stages of *Gigartina-clavifera* and *Gigartina alveata* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **276**, 155-165.
- Falshaw, R. and 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., Furneaux, R. H. and Stevenson, D. E.** (2005). Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **340**, 1149-1158.
- Falshaw, R., Furneaux, R. H., Wong, H., Liao, M. L., Bacic, A. and Chandkrachang, S.** (1996). Structural analysis of carrageenans from Burmese and Thai samples of *Catenella nipae* Zanardini. *Carbohydrate Research* **285**, 81-98.
- Farias, W. R. L., Valente, A. P., Pereira, M. S. and Mourao, P. A. S.** (2000). Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans - Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 29299-29307.

- Fer, M., Prechoux, A., Leroy, A., Sassi, J. F., Lahaye, M., Boisset, C., Nyvall-Collen, P. and Helbert, W.** (2012). Medium-throughput profiling method for screening polysaccharide-degrading enzymes in complex bacterial extracts. *Journal of Microbiological Methods* **89**, 222-229.
- Franco, B., Meroni, G., Parenti, G., Levilliers, J., Bernard, L., Gebbia, M., Cox, L., Maroteaux, P., Sheffield, L., Rappold, G. A. et al.** (1995). A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* **81**, 15-25.
- Fredericq, S., Hommersand, M. H. and Freshwater, D. W.** (1996). The molecular systematics of some agar- and carrageenan-containing marine red algae based on *rbcl* sequence analysis. *Hydrobiologia* **327**, 125-135.
- Frei, E. and Preston, R. D.** (1961). Variants in structural polysaccharides of algal cell walls. *Nature* **192**, 939-943.
- Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M.** (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* **10**, 16-22.
- Fujimura, T., Tsukahara, K., Moriwaki, S., Kitahara, T., Sano, T. and Takema, Y.** (2002). Treatment of human skin with an extract of *Fucus vesiculosus* changes its thickness and mechanical properties. *Journal of Cosmetic Science* **53**, 1-9.
- Gauthier, G., Gauthier, M. and Christen, R.** (1995). Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes-Coding for Small-Subunit Ribosomal-Rna Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into 2 Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* Gen-Nov, and Proposal of 12 New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 755-761.
- Genicot-Joncour, S. and** (2010). 4S-Iota -carrageenan sulfatase and use thereof to obtain alpha-carrageenan., vol. Patent WO/2010/122127
- Genicot-Joncour, S., Poinas, A., Richard, O., Potin, P., Rudolph, B., Kloareg, B. and Helbert, W.** (2009). The cyclization of the 3,6-anhydro-galactose ring of iota-carrageenan is catalyzed by two D-galactose-2,6-sulfurylases in the red alga *Chondrus crispus*. *Plant Physiol* **151**, 1609-1616.
- Girond, S., Crance, J. M., Vancuyckgandre, H., Renaudet, J. and Deloince, R.** (1991). Antiviral Activity of Carrageenan on Hepatitis-a Virus-Replication in Cell-Culture. *Research in Virology* **142**, 261-270.
- Glicksman M.** (1969). Gum technology in the food industry. Academic Press; New York. .
- Glicksman M.** (1976). Hydrocolloïds utilisation in fabricated foods. . *Cereal. Fds. World* **21**,, 17-23.
- Glöckner, F. O., Kube, M., Bauer, M., Teeling, H., Lombardot, T., Ludwig, W., Gade, D., Beck, A., Borzym, K., Heitmann, K. et al.** (2003). Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8298-8303.
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J. and Imhoff, J. F.** (2010). Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology-Progress Series* **409**, 267-299.

- Goulard, F., Diouris, M., Deslandes, E. and Floc'h, J. Y.** (1999). Nucleotides, nucleoside sugars and UDP-glucose-4-epimerase activity in the iota-carrageenophytes *Solieria chordalis* and *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae). *European Journal of Phycology* **34**, 21-25.
- Greer, C. W. and Yaphe, W.** (1984a). Characterization of Hybrid (Beta-Kappa-Gamma) Carrageenan from *Eucheuma-Gelatinae* Agardh, J. (Rhodophyta, Solieriaceae) Using Carrageenases, Infrared and C-13-Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy. *Botanica Marina* **27**, 473-478.
- Greer, C. W. and Yaphe, W.** (1984b). Hybrid (Iota-Nu-Kappa) Carrageenan from *Eucheuma-Nudum* (Rhodophyta, Solieriaceae), Identified Using Iota-Carrageenases and Kappa-Carrageenases and C-13-Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy. *Botanica Marina* **27**, 479-484.
- Greer, C. W. (1984)** A study of carrageenanses from marine bacteria. *PhD thesis*, McGill university, Montreal. 208 pp
- Greer, C. W. and Yaphe, W.** (1984c). Purification and properties of iota-carrageenase from a marine bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* **30**, 1500-1506.
- Groisillier, A., Herve, C., Jeudy, A., Rebuffet, E., Pluchon, P. F., Chevolut, Y., Flament, D., Geslin, C., Morgado, I., Power, D. et al.** (2010). MARINE-EXPRESS: taking advantage of high throughput cloning and expression strategies for the post-genomic analysis of marine organisms. *Microbial Cell Factories* **9**, 45
- Guibet, M., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Kervarec, N., Antonopoulos, A., Lafosse, M. and Helbert, W.** (2008). Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid kappa-/iota-carrageenans using carrageenases. *Biomacromolecules* **9**, 408-415.
- Guibet, M., Colin, S., Barbeyron, T., Genicot, S., Kloareg, B., Michel, G. and Helbert, W.** (2007). Degradation of lambda-carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* lambda-carrageenase: a new family of glycoside hydrolases unrelated to kappa- and iota-carrageenases. *Biochemical Journal* **404**, 105-114.
- Guibet, M., Kervarec, N., Genicot, S., Chevolut, Y. and Helbert, W.** (2006). Complete assignment of H-1 and C-13 NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* lambda-carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Research* **341**, 1859-1869.
- Hagelueken, G., Adams, T. M., Wiehlmann, L., Widow, U., Kolmar, H., Tummler, B., Heinz, D. W. and Schubert, W. D.** (2006). The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7631-7636.
- Hanson, S. R., Best, M. D. and Wong, C. H.** (2004). Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angewandte Chemie International Edition* **43**, 5736-5763.
- Harris, M. J. and Turvey, J. R.** (1970). Sulphates of monosaccharides and derivatives: Part IX. The conformations of glycoside sulphates in solution determined by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. **15**, 57-63.

- Hatada, Y., Mizuno, M., Li, Z. J. and Ohta, Y.** (2011). Hyper-production and characterization of the iota-Carrageenase useful for iota-carrageenan oligosaccharide production from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94(T), and Insight into the Unusual Catalytic Mechanism. *Marine Biotechnology* **13**, 411-422.
- Helenius, A.** (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **5**, 253-65.
- Henares, B. M., Enriquez, E. P., Dayrit, F. M. and Rojas, N. R. L.** (2010). Iota-carrageenan hydrolysis by *Pseudoalteromonas carrageenovora* IFO12985. *Philippine Journal of Science* **139** 131-138.
- Henrissat, B. and Davies, G.** (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 637-44.
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J. and Moore, B. S.** (2002). Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4431-4440.
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M. and Taylor, M. W.** (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 641-654.
- Hernandez-Guzman, F. G., Higashiyama, T., Pangborn, W., Osawa, Y. and Ghosh, D.** (2003). Structure of human estrone sulfatase suggests functional roles of membrane association. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 22989-22997.
- Hjerde, T., Smidsrød, O., Stokke, B. and Christensen, B.** (1998). Acid hydrolysis of κ - and ι -carrageenan in the disordered and ordered conformations: Characterization of partially hydrolysed samples and single-stranded oligomers released from the ordered structures. *Macromolecules* **31**, 1842-1851.
- Hoffman, M. and Decho, A. W.** (2000). Proteolytic enzymes in the marine bacterium *Pseudoalteromonas atlantica*: post-secretional activation and effects of environmental conditions. *Aquatic Microbial Ecology* **23**, 29-39.
- Hoffman, R.** (1993). Carrageenans Inhibit Growth-Factor Binding. *Biochemical Journal* **289**, 331-334.
- Hoffman, R., Burns, W. W. and Paper, D. H.** (1995). Selective-Inhibition of Cell-Proliferation and DNA-Synthesis by the Polysulfated Carbohydrate Iota-Carrageenan. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **36**, 325-334.
- Honke, K. and Taniguchi, N.** (2002). Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Medicinal Research Reviews* **22**, 637-654.
- Hopwood, J. J. and Ballabio, A.** (2001). Multiple sulfatase deficiency and the nature of the sulfatase family. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, (ed. C. Scriver A. Beadet D. Valle and W. Sly), pp. 3725–3732. New York: McGraw-Hill Professional.
- Iqbal, M., Grey, D., Sepansarkissian, G. and Fowler, M. W.** (1993). Interactions between the Unicellular Red Alga *Porphyridium-cruentum* and Associated Bacteria. *European Journal of Phycology* **28**, 63-68.

- Izumi, K.** (1973). NMR spectra of some 3,6-anhydro-galactose derivatives. *Carbohydrate Research* **27**, 278-281.
- John, M., Rohrig, H., Schmidt, J., Walden, R. and Schell, J.** (1997). Cell signalling by oligosaccharides. *Trends in Plant Science* **2**, 111-115.
- Johnston, K. and McCandless, E.** (1973). Enzymatic hydrolysis of potassium chloride soluble fraction of carrageenan : properties of " λ -carrageenases" from *Pseudomonas carrageenovora*. *Canadian Journal of Microbiology* **19**, 779-788.
- Jolie, R. P., Duvetter, T., Van Loey, A. M. and Hendrickx, M. E.** (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydr Res* **345**, 2583-95.
- Jouanneau, D., Boulenguer, P., Mazoyer, J. and Helbert, W.** (2010). Enzymatic degradation of hybrid iota-/nu-carrageenan by *Alteromonas fortis* iota-carrageenase. *Carbohydr Res* **345**, 934-40.
- Jouanneau, D., Boulenguer, P., Mazoyer, J. and Helbert, W.** (2011). Hybridity of carrageenans water- and alkali-extracted from *Chondracanthus chamissoi*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata*, and *Sarcothalia radula*. *Journal of Applied Phycology* **23**, 105-114.
- Kahnert, A. and Kertesz, M. A.** (2000). Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 31661-31667.
- Kakkar, V. V., Stringer, M. D., Hedges, A. R., Parker, C. J., Welzel, D., Ward, V. P., Sanderson, R. M., Cooper, D. and Kakkar, S.** (1989). Fixed Combinations of Low-Molecular Weight or Unfractionated Heparin Plus Dihydroergotamine in the Prevention of Postoperative Deep-Vein Thrombosis. *American Journal of Surgery* **157**, 413-418.
- Khotimchenko, Y. S.** (2010). The antitumor properties of nonstarch polysaccharides: Carrageenans, alginates, and pectins. *Russian Journal of Marine Biology* **36**, 401-412.
- Kidby, D. K. and Davidson, D. J.** (1973). A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal. Biochem.* **55**, 321-325.
- Kim, D. E., Kim, K. H., Bae, Y. J., Lee, J. H., Jang, Y. H. and Nam, S. W.** (2005). Purification and characterization of the recombinant arylsulfatase cloned from *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Protein Expr Purif* **39**, 107-15.
- Kim, J. H., Byun, D. S., Godber, J. S., Choi, J. S., Choi, W. C. and Kim, H. R.** (2004). Purification and characterization of arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. AS6330. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**, 553-9.
- Kloareg, B. and Quatrano, R. S.** (1988). Structure of the Cell-Walls of Marine-Algae and Ecophysiological Functions of the Matrix Polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology* **26**, 259-315.
- Knutsen, S. and Grasdalen, H.** (1992). Analysis of carrageenans by enzymic degradation, gel filtration and ^1H NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **19**, 199-210.

- Knutsen, S., Myslabodski, D., Larsen, B. and Usov, A.** (1994). A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina* **37**, 163-169.
- Knutsen, S. H. and Grasdalen, H.** (1987). Characterization of Water-Extractable Polysaccharides from Norwegian *Furcellaria-Lumbricalis* (Huds) Lamour (Gigartinales, Rhodophyceae) by Ir and Nmr-Spectroscopy. *Botanica Marina* **30**, 497-505.
- Knutsen, S. H. and Grasdalen, H.** (1992b). The use of neocarrabiose oligosaccharides with different length and sulphate substitution as model compounds for ¹H-NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. **229**, 233-244.
- Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E. and Grasdalen, H.** (1990). Characterization of Carrageenan Fractions from Norwegian *Furcellaria-Lumbricalis* (Huds) Lamour by H-1-Nmr Spectroscopy. *Carbohydrate Research* **206**, 367-372.
- Knutsen, S. H., Sletmoen, M., Kristensen, T., Barbeyron, T., Kloareg, B. and Potin, P.** (2001). A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by iota- and kappa -carrageenase. *Carbohydrate Research* **331**, 101-106.
- Kobayashi, T., Uchimura, K., Koide, O., Deguchi, S. and Horikoshi, K.** (2012). Genetic and Biochemical Characterization of the *Pseudoalteromonas tetraodonis* Alkaline kappa-Carrageenase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **76**, 506-511.
- Kolender, A. A. and Matulewicz, M. C.** (2004). Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of beta-carrageenan by H-1 NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **339**, 1619-1629.
- Kolender, A. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Matulewicz, M. C. and Cerezo, A. S.** (1997). The system of sulfated alpha-(1->3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: Structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carbohydrate Research* **304**, 53-60.
- Kong, M. K. and Chan, K.** (1979). Study on the Bacterial-Flora Isolated from Marine-Algae. *Botanica Marina* **22**, 83-97.
- Koshland, D. E.** (1953). Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **28**, 416-436.
- Kubaneck, J., Jensen, P. R., Keifer, P. A., Sullards, M. C., Collins, D. O. and Fenical, W.** (2003). Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6916-6921.
- Laclaire, J. W. and Dawes, C. J.** (1976). Autoradiographic and Histochemical Localization of Sulfated Polysaccharides in *Eucheuma-Nudum* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* **12**, 368-375.
- Lahaye, M. and Robic, A.** (2007). Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* **8**, 1765-1774.

- Landgrebe, J., Dierks, T., Schmidt, B. and von Figura, K.** (2003). The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene* **316**, 47-56.
- Landry, S. and Rochas, C.** (1987). Mechanical properties of mixed gels of carrageenan. *Food Hydrocolloids* **1**, 591-591.
- Larre, C., Penninck, S., Bouchet, B., Lollier, V., Tranquet, O., Denery-Papini, S., Guillon, F. and Rogniaux, H.** (2010). Brachypodium distachyon grain: identification and subcellular localization of storage proteins. *J Exp Bot* **61**, 1771-83.
- Lawson, C. J. and Rees, D. A.** (1970). An Enzyme for Metabolic Control of Polysaccharide Conformation and Function. *Nature* **227**, 392-393.
- Lawson, C. J., Rees, D. A., Stanciof, D. J. and Stanley, N. F.** (1973). Carrageenans .8. Repeating Structures of Galactan Sulfates from *Furcellaria-Fastigiata*, *Gigartina-Canaliculata*, *Gigartina-Chamissoi*, *Gigartina-Atropurpurea*, *Ahnfeltia-Durvillaei*, *Gymnogongrus-Furcellatuse*, *Eucheuma-Cottonii*, *Eucheuma-Spinosum*, *Eucheuma-Isiforme*, *Eucheuma-Uncinatum*, *Aghardhiella-Tenera*, *Pachymenia-Hymantophora*, and *Gloiopeltis-Cervicorniso*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 2177-2182.
- Lee, R. E.** (2008). Phycology, (ed., pp. 534: Cambridge University Press.
- Leloir, L. F.** (1964). Nucleoside Diphosphate Sugars and Saccharide Synthesis. The fourth Hopkins Memorial Lecture. *Biochemical Journal* **91**, 1b2-8.
- Leloir, L. F.** (1971). Two Decades of Research on Biosynthesis of Saccharides. *Science* **172**, 1299-1303.
- Lemoine, M., Collen, P. N. and Helbert, W.** (2009). Physical state of kappa-carrageenan modulates the mode of action of kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Biochemical Journal* **419**, 545-553.
- Lemonnier-Le Penhuizic, C., Chatelet, C., Kloareg, B. and Potin, P.** (2001). Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. italica. *Plant Science* **160**, 1211-1220.
- Lineweaver, H. and Burk, D.** (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. chem. Soc.* **56**, , 658-666.
- Llamas, I., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Martinez-Canovas, M. J., Molina, I. and Quesada, E.** (2011). *Halomonas stenophila* sp. nov., a halophilic bacterium that produces sulphate exopolysaccharides with biological activity. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2508-14.
- Loiseaux, S. and Rozier, C.** (1978). Culture axénique de *Pylaiella littoralis* (L) Kjellm. (Phéophycées). *Rev. Algol. NS* **13**, 333-340.
- Long, M., Ruan, L., Li, F., Yu, Z. and Xu, X.** (2011). Heterologous expression and characterization of a recombinant thermostable alkylsulfatase (sdsAP). *Extremophiles* **15**, 293-301.

Longford, S. R., Tujula, N. A., Crocetti, G. R., Holmes, A. J., Holmstrom, C., Kjelleberg, S., Steinberg, P. D. and Taylor, M. W. (2007). Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. *Aquatic Microbial Ecology* **48**, 217-229.

Lucas, C. E. (1947). The Ecological Effects of External Metabolites. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **22**, 270-295.

Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmer, T., Gieselmann, V., von Figura, K. and Saenger, W. (1998). Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* **37**, 3654-3664.

Lustigman, B., Lee, L. H., Thees, N. and Masucci, J. (1992). Production of Antibacterial Substances by Macroalgae of the New-York New-Jersey Coast, USA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **49**, 743-749.

Maire, I. (2003). Une maladie génétique rare: le déficit multiple en sulfatases/ Identification of the gene causing multiple sulfatase deficiency. *Medecine sciences* **19**, 1056- 1058.

Malleron, A., Benjdia, A., Berteau, O. and Le Narvor, C. (2012). Chondroitin-4-O-sulfatase from *Bacteroides thetaiotaomicron*: exploration of the substrate specificity. *Carbohydrate Research* **353**, 96-99.

Manley, S. L. and Burns, D. J. (1991). Formation of Nucleoside Diphosphate Monosaccharides (Ndp-Sugars) by the Agarophyte *Pterocladia-Capillacea* (Rhodophyceae). *Journal of Phycology* **27**, 702-709.

Matulewicz, M. C., Ciancia, M., Nosedá, M. D. and Cerezo, A. S. (1990). Methylation Analysis of Carrageenans from Tetrasporic and Cystocarpic Stages of *Gigartina-Skottsbergii*. *Phytochemistry* **29**, 3407-3410.

McCandless, E. and Craigie, J. (1979). Sulfated Polysaccharides in red and brown algae. *Annual Review of Plant Physiology* **30**, 41-53.

McCandless, E., Craigie, J. and Walter, J. (1973). Carrageenans in the Gametophytic and Sporophytic Stages of *Chondrus Crispus*. *Planta* **112**, 201-212.

McCandless, E., West, J. and Guiry, M. (1983). Carrageenan patterns in the Gigartinaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **11**, 175-182.

McCandless, E. L., West, J. A. and Guiry, M. D. (1982). Carrageenan patterns in the Phylloporaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **10**, 275-284.

McCandless, E. L., Craigie, J. S. and Walter, J. A. (1973). Carrageenans in Gametophytic and Sporophytic Stages of *Chondrus crispus*. *Planta* **112**, 201-212.

McCarter, J. D. and Withers, S. G. (1994). Mechanisms of Enzymatic Glycoside Hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 885-892.

McGraw, D. J. (2006). The founding of modern marine microbiology: Claude Zobell and his Magnum Opus, 1946. *Newsletter of the Commission of the History of Oceanography* **18**, 5-18.

- McLean, M. W. and Williamson, F. B.** (1979a). Glycosulphatase from *Pseudomonas carrageenovora*. Purification and some properties. *European Journal of Biochemistry* **101**, 497-505.
- McLean, M. W. and Williamson, F. B.** (1979b). kappa-Carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*. *European Journal of Biochemistry* **93**, 553-558.
- McLean, M. W. and Williamson, F. B.** (1981). Neocarratetraose 4-O-monosulphate beta-hydrolase from *Pseudomonas carrageenovora*. *European Journal of Biochemistry* **113**, 447-456.
- McNaught, A.** (1997). Nomenclature of carbohydrates (Recommendations 1996). *Journal of Carbohydrate Chemistry* **16**, 1191.
- Medeiros, G. F., Mendes, A., Castro, R. A. B., Bau, E. C., Nader, H. B. and Dietrich, C. P.** (2000). Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1475**, 287-294.
- Medigue, C., Krin, E., Pascal, G., Barbe, V., Bernsel, A., Bertin, P. N., Cheung, F., Cruveiller, S., D'Amico, S., Duilio, A. et al.** (2005). Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Res* **15**, 1325-35.
- Melino, S., Capo, C., Dragani, B., Aceto, A. and Petruzzelli, R.** (1998). A zinc-binding motif conserved in glyoxalase II, beta-lactamase and arylsulfatases. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 381-382.
- Michaelis, L. and Menten, M. L.** (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**, 333-369.
- Michel, G., Chantalat, L., Duee, E., Barbeyron, T., Henrissat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O.** (2001a). The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of Clan-B glycoside hydrolases. *Structure* **9**, 513-525.
- Michel, G., Chantalat, L., Fanchon, E., Henrissat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O.** (2001b). The iota-carrageenase of *Alteromonas fortis*. A beta-helix fold-containing enzyme for the degradation of a highly polyanionic polysaccharide. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40202-40209.
- Michel, G., Flament, D., Barbeyron, T., Vernet, T., Kloareg, B. and Dideberg, O.** (2000). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the iota-carrageenase from *Alteromonas fortis*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* **56**, 766-768.
- Michel, G., Helbert, W., Kahn, R., Dideberg, O. and Kloareg, B.** (2003). The structural bases of the processive degradation of iota-carrageenan, a main cell wall polysaccharide of red algae. *Journal of Molecular Biology* **334**, 421-433.
- Michel, G., Nyval-Collen, P., Barbeyron, T., Czjzek, M. and Helbert, W.** (2006). Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**, 23-33.

- Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M. and Kloareg, B.** (2010). The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist* **188**, 82-97.
- Millard, P. and Evans, L. V.** (1982). Sulfate Uptake in the Unicellular Marine Red Alga *Rhodella-Maculata*. *Archives of Microbiology* **131**, 165-169.
- Miller, I. J.** (2003). The chemical structure of galactans from some New Zealand red algae. *Botanica Marina* **46**, 572-577.
- Mollion, J., Moreau, S. and Christiaen, D.** (1986). Isolation of a New Type of Carrageenan from *Rissoella-Verruculosa* (Bert) J Ag (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* **29**, 549-552.
- Mori, J.** (1939). Carbohydrase acting on the mucilage from *Chondrus ocellatus* I. *Journal of the agricultural chemical society of Japan* **19**, 1070-1074.
- Mori, J.** (1943). Carbohydrase acting on the mucilage from *Chondrus ocellatus* II.. *Journal of the agricultural chemical society of Japan* **19**, 740-742.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S. and Rosen, S. D.** (2002). Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49175-49185.
- Morrice, L. M., Mclean, M. W., Long, W. F. and Williamson, F. B.** (1983a). Beta-Agarase-I and Beta-Agarase-II from *Pseudomonas atlantica* - Substrate Specificities. *European Journal of Biochemistry* **137**, 149-154.
- Morrice, L. M., Mclean, M. W., Long, W. F. and Williamson, F. B.** (1983b). Porphyran Primary Structure - an Investigation Using Beta-Agarase-I from *Pseudomonas atlantica* and C-13-Nmr Spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* **133**, 673-684.
- Morrice, L. M., Mclean, M. W., Long, W. F. and Williamson, F. B.** (1984). Porphyran Primary Structure. *Hydrobiologia* **116**, 572-575.
- Morris, E. R., Rees, D. A. and Robinson, G.** (1980). Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology* **138**, 349-362.
- Muller, I., Kahnert, A., Pape, T., Sheldrick, G. M., Meyer-Klaucke, W., Dierks, T., Kertesz, M. and Uson, I.** (2004). Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry* **43**, 3075-3088.
- Myette, J. R., Soundararajan, V., Shriver, Z., Raman, R. and Sasisekharan, R.** (2009). Heparin/Heparan Sulfate 6-O-Sulfatase from *Flavobacterium heparinum* Integrated structural and biochemical investigation of enzyme active site and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 35177-35188.
- Nagorskaia, V. P., Reunov, A. V., Lapshina, L. A., Ermak, I. M. and Barabanova, A. O.** (2008). Influence of kappa/beta-carrageenan from red alga *Tichocarpus crinitus* on development of local infection induced by tobacco mosaic virus in Xanthi-nc tobacco leaves. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 360-4.

- Neufeld, E. F. and Muenzer, J.** (2001). The Mucopolysaccharidoses. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, (ed. C. Scriver A. Beadet D. Valle and W. Sly), pp. 3421-3452. New York: McGraw-Hill Professional.
- Noseda, M. D. and Cerezo, A. S.** (1993). Room-Temperature, Low-Field C-13-Nmr Spectra of Degraded Carrageenans .3. Autohydrolysis of a Lambda Carrageenan and of Its Alkali-Treated Derivative. *International Journal of Biological Macromolecules* **15**, 177-181.
- O'Neil, M.** (1955). 3,6 -anhydrogalactose as a constituent of κ - carrageenan. *J. Am. chem. Soc.* **77**, 2837- 2839.
- O'Neill, A. N.** (1955). Derivatives of 4-O-b-D-galactopyranosyl-3,6 - anhydro-D-galactose from κ -carrageenan. *J. Am. chem. Soc.* **77**, 6324-6326.
- Obaya, A. J.** (2006). Molecular cloning and initial characterization of three novel human sulfatases. *Gene* **372**, 110-117.
- Ohta, Y. and Hatada, Y.** (2006). A novel enzyme, lambda-carrageenase, isolated from a deep-sea bacterium. *Journal of Biochemistry* **140**, 475-481.
- Painter, T. J.** (1960). The Polysaccharides of *Furcellaria Fastigiata* .1. Isolation and Partial Mercaptolysis of a Gel-Fraction. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **38**, 112-118.
- Paoletti, S., Smidsrod, O. and Grasdalen, H.** (1984). Thermodynamic Stability of the Ordered Conformations of Carrageenan Poly-Electrolytes. *Biopolymers* **23**, 1771-1794.
- Parenti, G., Meroni, G. and Ballabio, A.** (1997). The sulfatase gene family. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**, 386-391.
- Parish, C. R., Coombe, D. R., Jakobsen, K. B., Bennett, F. A. and Underwood, P. A.** (1987). Evidence that sulfated polysaccharides inhibit tumor-metastasis by blocking tumor-cell-derived heparanases. *International Journal of Cancer* **40**, 511-518.
- Patier, P., Potin, P., Rochas, C., Kloareg, B., Yvin, J. C. and Lienart, Y.** (1995). Free or silica-bound oligokappa-carrageenans elicit laminarinase activity in *Rubus* cells and protoplasts. *Plant Science* **110**, 27-35.
- Paul, P., Suwan, J., Liu, J., Dordick, J. S. and Linhardt, R. J.** (2012). Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 1491-1500.
- Paul, V. J., Arthur, K. E., Ritson-Williams, R., Ross, C. and Sharp, K.** (2007). Chemical defenses: From compounds to communities. *Biological Bulletin* **213**, 226-251.
- PearcePratt, R. and Phillips, D. M.** (1996). Sulfated polysaccharides inhibit lymphocyte-to-epithelial transmission of human immunodeficiency virus-1. *Biology of Reproduction* **54**, 173-182.

- Penesyán, A., Marshall-Jones, Z., Holmstrom, C., Kjelleberg, S. and Egan, S.** (2009). Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. *Fems Microbiology Ecology* **69**, 113-124.
- Penman, A. and Rees, D.** (1973). Carrageenans. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Euचेuma isiforme*, *Euचेuma uncinatum*, *Aghardhiella tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of ξ -carrageenan. *J.C.S. Perkin I*, 2182-2187.
- Pereira, L., Critchley, A. T., Amado, A. M. and Ribeiro-Claro, P. J. A.** (2009). A comparative analysis of phycocolloids produced by underutilized versus industrially utilized carrageenophytes (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* **21**, 599-605.
- Pereira, L. and Mesquita, J. F.** (2004). Population studies and carrageenan properties of *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* **16**, 369-383.
- Piculell, L., Sparrman, T., Ramzi, M., Borgstrom, J. and Quist, P. O.** (1998). Iota-carrageenan is excluded from the chiral nematic phase of kappa-carrageenan. *Macromolecules* **31**, 5152-5154.
- Popper, Z. A., Michel, G., Herve, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., Kloareg, B. and Stengel, D. B.** (2011). Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. In *Annual Review of Plant Biology, Vol 62*, vol. 62 (ed. S. S. Merchant W. R. Briggs and D. Ort), pp. 567-588. Palo Alto: Annual Reviews.
- Popper, Z. A. and Tuohy, M. G.** (2010). Beyond the Green: Understanding the Evolutionary Puzzle of Plant and Algal Cell Walls. *Plant Physiology* **153**, 373-383.
- Potin, P.** (1992) Recherche, production, purification et caractérisation de galactane-hydrolases pour la préparation d'oligosaccharides des parois d'algues rouges. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*. 186pp.
- Potin, P.** (2008). Oxydative burst and related responses in biotic interactions of algae. In *Algal chemical ecology*, (ed. C. H. Amsler), pp. 245-271.
- Potin, P., Bouarab, K., Kupper, F. and Kloareg, B.** (1999). Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 276-283.
- Potin, P., Richard, C., Barbeyron, T., Henrissat, B., Gey, C., Petillot, Y., Forest, E., Dideberg, O., Rochas, C. and Kloareg, B.** (1995). Processing and hydrolytic mechanism of the *cgkA*-encoded kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*. *European Journal of Biochemistry* **228**, 971-975.
- Potin, P., Sanseau, A., Le Gall, Y., Rochas, C. and Kloareg, B.** (1991). Purification and characterization of a new kappa-carrageenase from a marine *Cytophaga*-like bacterium. *European Journal of Biochemistry* **201**, 241-247.

- Préchoux, A., Genicot, S. and Helbert, W.** (2012). Method for transforming iota-carrageenan into alpha-carrageenan by means of a new class of 4S-iota-carrageenan sulfatase. *WIPO Patent Application WO/2012/049437*.
- Préchoux, A., Genicot, S. and Helbert, W.** (2012). Controlling carrageenan structure using a novel formylglycine-dependent sulfatase, an endo-4S-iota-carrageenan sulfatase. *Marine Biotechnology*.
- Préchoux, A. & Helbert, W.** (2012) Kappa-carraghénane-sulfatase, procédé de fabrication et utilisation. EP 12/306384.
- Preston, R. D.** (1974). The physical biology of plant cell walls. London: Chapman & Hall.
- Prosselkov, P. V., Gross, W., Igamberdiev, A. U. and Schnarrenberger, C.** (1996). Purification and characterization of UDP-D-galactose 4-epimerase from the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Physiologia Plantarum* **98**, 753-758.
- Provasoli, L. and Pintner, I. J.** (1980). Bacteria Induced Polymorphism in an Axenic Laboratory Strain of Ulva-Lactuca (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* **16**, 196-201.
- Puglisi, M. P., Engel, S., Jensen, P. R. and Fenical, W.** (2007). Antimicrobial activities of extracts from Indo-Pacific marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology* **150**, 531-540.
- Raman, R., Myette, J. R., Shriver, Z., Pojasek, K., Venkataraman, G. and Sasisekharan, R.** (2003). The heparin/heparan sulfate 2-O-sulfatase from *Flavobacterium heparinum*. A structural and biochemical study of the enzyme active site and saccharide substrate specificity. *J Biol Chem* **278**, 12167-74.
- Rebuffet, E., Barbeyron, T., Jeudy, A., Jam, M., Czjzek, M. and Michel, G.** (2010). Identification of Catalytic Residues and Mechanistic Analysis of Family GH82 I-Carrageenases. *Biochemistry* **49**, 7590-7599.
- Recksiek, R., Selmer, T., Dierks, T., Schmidt, B. and von Figura, K.** (1998). Sulfatases, trapping of the sulfated enzyme intermediate by substituting the active site formylglycine. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 6096-6103.
- Reed, M. J., Purohit, A., Woo, L. W., Newman, S. P. and Potter, B. V.** (2005). Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocrine Reviews* **26**, 171-202.
- Rees, D.** (1969). Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **24**, 267-332.
- Rees, D. A.** (1961). Enzymic Desulphation of Porphyrin. *Biochemical Journal* **80**, 449-453.
- Rees, D. A.** (1963). Carrageenan System of Polysaccharides .1. Relation between the Kappa- and Lambda-Components. *Journal of the Chemical Society*, 1821-1832.
- Rees, D. A.** (1972). Polysaccharide Gels - Molecular View. *Chemistry & Industry*, 630-636.
- Rees, D. A., Morris, E., Thom, D. and Madden, J.** (1982). The polysaccharides: G.O. Aspinall. New York, U.S.A., Academic Press.

Rees, D. A. and Smith, P. J. C. (1975). Polysaccharide Conformation .8. Test of Energy Functions by Monte-Carlo Calculations for Monosaccharides. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 830-835.

Rees, D. A. and Welsh, E. J. (1977). Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **16**, 214-223.

Renn, D. W., Santos, G. A., Dumont, L. E., Parent, C. A., Stanley, N. F., Stancioff, D. J. and Guiseley, K. B. (1993). Beta-Carrageenan - Isolation and Characterization. *Carbohydrate Polymers* **22**, 247-252.

Riquelme, C., Rojas, A., Flores, V. and Correa, J. A. (1997). Epiphytic bacteria in a copper-enriched environment in northern Chile. *Marine Pollution Bulletin* **34**, 816-820.

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

Robyt, JF (1998) 3.5 Reducing reaction of carbohydrates, in *Essentials of carbohydrate chemistry*, Eds Charles R. Cantor, Springer-Verlag, Berlin.

Rochas, C. and Rinaudo, M. (1984). Mechanism of Gel Formation in Kappa-Carrageenan. *Biopolymers* **23**, 735-745.

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

Rodriguez, A., Espejo, A. J., Hernandez, A., Velasquez, O. L., Lizaraso, L. M., Cordoba, H. A., Sanchez, O. F., Almeciga-Diaz, C. J. and Barrera, L. A. (2010). Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**, 1193-201.

Ross, A. G. (1953). Some Typical Analyses of Red Seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **4**, 333-335.

Sandsdalen, E., Haug, T., Stensvag, K. and Styrvold, O. B. (2003). The antibacterial effect of a polyhydroxylated fucophlorethol from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **19**, 777-782.

Santiago-Vazquez, L. Z., Bruck, T. B., Bruck, W. M., Duque-Alarcon, A. P., McCarthy, P. J. and Kerr, R. G. (2007). The diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirripathes lutkeni*. *Isme Journal* **1**, 654-659.

Sardiello, M., Annunziata, I., Roma, G. and Ballabio, A. (2005). Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics* **14**, 3203-3217.

Sasisekharan, R., Raman, R. and Prabhakar, V. (2006). Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annual Review of Biomedical Engineering* **8**, 181-231.

- Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, K., Iqbal, M. M., Yumoto, I., Ezura, Y. and Christen, R.** (1998). *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 769-774.
- Sawabe, T., Narita, M., Tanaka, R., Onji, M., Tajima, K. and Ezura, Y.** (2000). Isolation of *Pseudoalteromonas elyakovii* strains from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **66**, 249-254.
- Scheel, D.** (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 305-310.
- Schmidt, B., Selmer, T., Ingendoh, A. and Vonfigura, K.** (1995). A Novel Amino-Acid Modification in Sulfatases That Is Defective in Multiple Sulfatase Deficiency. *Cell* **82**, 271-278.
- Seisun, D.** (2012). Overview of the Food Hydrocolloids Market. *Gums and Stabilisers for the Food Industry* **16**, 3-8.
- Semenova, E. V., Shlykova, D. S., Semenov, A. M., Ivanov, M. N., Shelyakov, O. V. and Netrusov, A. I.** (2009). Bacteria epiphytes of brown macro alga in oil utilization in North sea ecosystems. *Moscow univ. Biol. Sci. Bull.* **64**, 107-110.
- Sinnott, M. L.** (1990). Catalytic Mechanisms of Enzymatic Glycosyl Transfer. *Chemical Reviews* **90**, 1171-1202.
- Smidsrød, O. and Grasdalen, H.** (1982). Some physical properties of carrageenan in solution and gel state. *Carbohydrate Polymers* **2**, 270-272.
- Smith, D. B. and Cook, W. H.** (1953). Fractionation of Carrageenin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **45**, 232-233.
- Somssich, I. E. and Hahlbrock, K.** (1998). Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* **3**, 86-90.
- Souza, H. K. S., Hilliou, L., Bastos, M. and Goncalves, M. P.** (2011). Effect of molecular weight and chemical structure on thermal and rheological properties of gelling kappa/iota-hybrid carrageenan solutions. *Carbohydrate Polymers* **85**, 429-438.
- Stancioff, D.** (1981). Reflections on the interrelationships between red seaweed source, chemistry and uses. In *Xth Proceeding in International Seaweed Symposium*, vol. 10 (ed., pp. 113-121).
- Stanley, D. J. and Stanley, N. F.** (1969). Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **6**, 595-609.
- Steigedal, M., Sletta, H., Moreno, S., Maerk, M., Christensen, B. E., Bjerkan, T., Ellingsen, T. E., Espin, G., Ertesvag, H. and Valla, S.** (2008). The *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the in vivo control of alginate monomer composition and for functional cyst formation. *Environ Microbiol* **10**, 1760-70.

Steinberg, P. D., De Nys, R. and Kjelleberg, S. (2002). Chemical cues for surface colonization. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 1935-1951.

Steinberg, P. D., Schneider, R. and Kjelleberg, S. (1997). Chemical defenses of seaweeds against microbial colonization. *Biodegradation* **8**, 211-220.

Stortz, C. A., Bacon, B. E., Cherniak, R. and Cerezo, A. S. (1994). High-Field Nmr-Spectroscopy of Cystocarpic and Tetrasporic Carrageenans from *Iridaea-Undulosa*. *Carbohydrate Research* **261**, 317-326.

Stortz, C. A. and Cerezo, A. S. (1993). The Systems of Carrageenans from Cystocarpic and Tetrasporic Stages from *Iridaea undulosa* - Fractionation with Potassium-Chloride and Methylation Analysis of the Fractions. *Carbohydrate Research* **242**, 217-227.

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-34.

Tatewaki, M. (1983). Morphogenesis of *Monostroma oxyspermum* (Kutz) Doty (Chlorophyceae) in Axenic Culture, Especially in Bialgal Culture. *Journal of Phycology* **19**, 409-416.

Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D. and Wagner, M. (2007). Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**, 295-347.

Thanh, T. T. T., Yuguchi, Y., Mimura, M., Yasunaga, H., Takano, R., Urakawa, H. and Kajiwara, K. (2002). Molecular characteristics and gelling properties of the carrageenan family, 1 - Preparation of novel carrageenans and their dilute solution properties. *Macromolecular Chemistry and Physics* **203**, 15-23.

Therkelsen, G. H. (1993). Carrageenan. industrial gums., pp. 145- 180: R.L. Whistler and J.N. BeMiller. SanDiego. CA Academic press.

This, H. (1996). La gastronomie moléculaire et physique., (ed., pp. 343: Université de Paris VI.

Thomas, F., Barbeyron, T., Tonon, T., Genicot, S., Czjzek, M. and Michel, G. (2012). Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: from their emergence in marine Flavobacteria to their independent transfers to marine Proteobacteria and human gut Bacteroides. *Environ Microbiol* **14**, 2379-94.

Tobacman, J. K. (2001). Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environmental Health Perspectives* **109**, 983-994.

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

Tong, H. K., Lee, K. H. and Wong, H. A. (1980). The Molecular-Weight and Viscosity of the Water-Soluble Polysaccharide(S) from *Euचेuma spinosum*. *Carbohydrate Research* **81**, 1-6.

Towle, G. A. (1973). Carrageenan. In *industrial gums. polysaccharides and their derivatives*: Whistler eds.

- Turvey, J. R. and Williams, E. L.** (1970). Structures of Some Xylans from Red Algae. *Phytochemistry* **9**, 2383-2388.
- Tuvikene, R., Truus, K., Robal, M., Volobujeva, O., Mellikov, E., Pehk, T., Kollist, A., Kailas, T. and Vaher, M.** (2010). The extraction, structure, and gelling properties of hybrid galactan from the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Baltic Sea, Estonia). *Journal of Applied Phycology* **22**, 51-63.
- Tveter-Gallagher, E., Cheney, D. L. and Mathieson, A.** (1981). Uptake and incorporation of 35S into carrageenan among different strains of *Chondrus crispus*. In *International Seaweed Symposium*, (eds).
- Uchida, M., Maeda, T. and Shiba, T.** (2002). Phylogenic analysis of three marine bacteria that have an ability to decompose *Laminaria japonica*. *Fisheries Science* **68**, 703-705.
- Uchida, M., Nakayama, A. and Abe, S.** (1995). Distribution and Characterization of Bacteria Capable of Decomposing Brown-Algae Fronds in Waters Associated with Laminaria Vegetation. *Fisheries Science* **61**, 117-120.
- Uhlinger, D. J. and White, D. C.** (1983). Relationship between Physiological Status and Formation of Extracellular Polysaccharide Glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 64-70.
- Usov, A. I.** (1984). Nmr-Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides - Agars, Carrageenans, and Xylans. *Botanica Marina* **27**, 189-202.
- Usov, A. I. and Arkhipova, V. S.** (1981). Polysaccharides of Algae .30. Methylation of Chi-Carrageenan Type Polysaccharides of the Red Seaweeds *Tichocarpus crinitius* (Gmel) Rupr, *Furcellaria fastigiata* (Huds) Lam and *Phyllophora nervosa* (De-Cand)Grev. *Bioorganicheskaya Khimiya* **7**, 385-390.
- Usov, A. I., Bilan, M. I. and Shashkov, A. S.** (1997). Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). *Carbohydrate Research* **303**, 93-102.
- Usov, A. I., Yarotsky, S. V. and Shashkov, A. S.** (1980). ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymers*. **19**, 977-990.
- van de Velde, F.** (2008). Structure and function of hybrid carrageenans. *Food Hydrocolloids* **22**, 727-734.
- van de Velde, F., Antipova, A. S., Rollema, H. S., Burova, T. V., Grinberg, N. V., Pereira, L., Gilsenan, P. M., Tromp, R. H., Rudolph, B. and Grinberg, V. Y.** (2005). The structure of kappa/iota-hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. *Carbohydrate Research* **340**, 1113-1129.
- van de Velde, F., Peppelman, H., Rollema, H. and Tromp, R.** (2001). On the structure of kappa/iota-hybrid carrageenans. *Carbohydrate Research* **331**, 271-283.
- van de Velde, F., Pereira, L. and Rollema, H. S.** (2004). The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydrate Research* **339**, 2309-2313.

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

Verhaeghe, E. J. G. (2002). Carraghénanes et cancer du colon : étude expérimentale chez des rats à flore humaine, Mécanismes d'action ». *Thèse de doctorat* de l'Université Paul-Sabatier, Toulouse.

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

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

Viebke, C., Borgstrom, J. and Piculell, L. (1995). Characterization of Kappa-Carrageenan and Iota-Carrageenan Coils and Helices by MALLS/GPC. *Carbohydrate Polymers* **27**, 145-154.

Viebke, C., Piculell, L. and Nilsson, S. (1994). On the Mechanism of Gelation of Helix-Forming Biopolymers. *Macromolecules* **27**, 4160-4166.

von Figura, K., Gieselmann, V. and Jaeken, J. (2001). Metachromatic leukodystrophy. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, (ed. C. Scriver, A. Beaudet, D. Valle and W. Sly), pp. 3695-3724. New York: McGraw-Hill Professional.

Vreeland, V. and Kloareg, B. (2000). Cell wall biology in red algae: divide and conquer. *Journal of Phycology* **36**, 793-797.

Vreeland, V., Waite, J. H. and Epstein, L. (1998). Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *Journal of Phycology* **34**, 1-18.

Vreeland, V., Zabackis, E. and Laetsch, W. M. (1992). Monoclonal-Antibodies as Molecular Markers for the Intracellular and Cell-Wall Distribution of Carrageenan Epitopes in *Kappaphycus* (Rhodophyta) during Tissue-Development. *Journal of Phycology* **28**, 328-342.

Waldow, A., Schmidt, B., Dierks, T., von Bulow, R. and von Figura, K. (1999). Amino acid residues forming the active site of arylsulfatase A - Role in catalytic activity and substrate binding. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 12284-12288.

Wang, G., Shuai, L., Li, Y., Lin, W., Zhao, X. W. and Duan, D. L. (2008). Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on Hole-Rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology* **20**, 403-409.

Wang, W., Zhang, P., Yu, G. L., Li, C. X., Hao, C., Qi, X., Zhang, L. J. and Guan, H. S. (2012). Preparation and anti-influenza A virus activity of kappa-carrageenan oligosaccharide and its sulphated derivatives. *Food Chemistry* **133**, 880-888.

Watt, D. K., O'Neill, S. A., Percy, A. E. and Brasch, D. J. (2002). Isolation and characterisation of a partially methylated galacto-glucurono-xylo-glycan, a unique polysaccharide from the red seaweed *Apophloeia lyallii*. *Carbohydrate Polymers* **50**, 283-294.

- Weigl, J., Turvey, J. R. and Yaphe, W.** (1966). The enzymatic hydrolysis of κ -carrageenan with κ -carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*. *Fifth International Seaweed Symposium*, 329-331.
- Weigl, J. and Yaphe, W.** (1966). The enzymic hydrolysis of carrageenan by *Pseudomonas carrageenovora*: purification of a kappa-carrageenase. *Canadian Journal of Microbiology* **12**, 939-947.
- Weinberger, F. and Friedlander, M.** (2000a). Endogenous and exogenous elicitors of a hypersensitive response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* **12**, 139-145.
- Weinberger, F. and Friedlander, M.** (2000b). Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes. *Journal of Phycology* **36**, 1079-1086.
- Weinberger, F., Friedlander, M. and Hoppe, H. G.** (1999). Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* **35**, 747-755.
- Welti, D.** (1977). Carrageenan Part XII : The 30 MHz proton magnetic resonance spectra of methyl-beta-D-galactopyranoside, methyl-3,6-anhydro-alpha-D-galactopyranoside, agarose, kappa-carrageenan and the segments of iota-carrageenan and agarose sulphate. *Journal of chemical research*, 3566-3587.
- Wiese, J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenberg, T. and Imhoff, J. F.** (2009). Diversity of Antibiotic-Active Bacteria Associated with the Brown Alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Marine Biotechnology* **11**, 287-300.
- Witvrouw, M. and DeClercq, E.** (1997). Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology* **29**, 497-511.
- Witvrouw, M., Desmyter, J. and Declercq, E.** (1994). Antiviral Portrait Series .4. Polysulfates as Inhibitors of Hiv and Other Enveloped Viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **5**, 345-359.
- Woelkerling, W. J.** (1990). An introduction in Biology of the red algae: Cambridge University Press, Cambridge.
- Wong, K. and Craigie, J.** (1978). Sulfohydrolase Activity and Carrageenan Biosynthesis in *Chondrus Crispus* (Rhodophyceae). *Plant Physiology* **61**, 663-666.
- Yamada, T., Ogamo, A., Saito, T., Uchiyama, H. and Nakagawa, Y.** (2000). Preparation of O-acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti-HIV activity and low anticoagulant effect. *Carbohydrate Polymers* **41**, 115-120.
- Yan, L. M., Boyd, K. G., Adams, D. R. and Burgess, J. G.** (2003). Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in bacilli. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3719-3727.
- Yan, L. M., Boyd, K. G. and Burgess, J. G.** (2002). Surface attachment induced production of antimicrobial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Marine Biotechnology* **4**, 356-366.

- Yang, B., Bhattacharyya, S., Linhardt, R. and Tobacman, J.** (2012). Exposure to common food additive carrageenan leads to reduced sulfatase activity and increase in sulfated glycosaminoglycans in human epithelial cells. *Biochimie* **94**, 1309-1316.
- Yaphe, W.** (1957). The Use of Agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae). *Canadian Journal of Microbiology* **3**, 987-993.
- Yaphe, W. and Baxter, B.** (1955). The enzymatic hydrolysis of carrageenin. *Applied Microbiology* **3**, 380-383.
- Yermak, I. M., Kim, Y. H., Titlynov, E. A., Isakov, V. V. and Solov'eva, T. F.** (1999). Chemical structure and gel properties of carrageenans from algae belonging to the Gigartinales and Tichocarpaceae, collected from the Russian Pacific coast. *Journal of Applied Phycology* **11**, 41-48.
- Yuan, H. M., Song, J. M., Li, X. G., Li, N. and Liu, S.** (2011). Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of kappa-carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. *Journal of Applied Phycology* **23**, 59-65.
- Zablackis, E. and Santos, G. A.** (1986). The Carrageenan of *Catenella-Nipae* Zanard, a Marine Red Alga. *Botanica Marina* **29**, 319-322.
- Zablackis, E., Vreeland, V., Doboszewski, B. and Laetsch, W. M.** (1991). Differential Localization of Carrageenan Gelling Sequences in *Kappaphycus alvarezii* Var Tambalang (Rhodophyta) with FITC-Conjugated Carrageenan Oligosaccharides. *Journal of Phycology* **27**, 241-248.
- Zhang, W., Piculell, L., Nilsson, S. and Knutsen, S.** (1994). Cation specific and cation binding to low sulfated carrageenans. *Carbohydrate Polymers* **23**, 105-110.
- Zhou, G. F., Sun, Y. P., Xin, H., Zhang, Y. N., Li, Z. and Xu, Z. H.** (2004). *In vivo* antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight Lambda-Carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research* **50**, 47-53.
- Zhou, G. F., Xin, H., Sheng, W. X., Sun, Y. P., Li, Z. and Xu, Z. H.** (2005). *In vivo* growth-inhibition of S 180 tumor by mixture of 5-Fu and low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research* **51**, 153-157.
- Zinoun, M. and Cosson, J.** (1996). Seasonal variation in growth and carrageenan content of *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae, Gigartinales) from the Normandy coast, France. *Journal of Applied Phycology* **8**, 29-34.
- ZoBell, C.** (1941). Studies on marine bacteria I The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res* **4**, 42-75.



BREVETS ET
PUBLICATIONS

BREVETS

Préchoux, A., Genicot, S. and Helbert, W. (2012). Method for transforming iota-carrageenan into alpha-carrageenan by means of a new class of 4S-iota-carrageenan sulfatase. *WIPO Patent Application* WO/2012/049437.

Préchoux, A. & Helbert, W. (2012) Kappa-carraghénane-sulfatase, procédé de fabrication et utilisation. EP 12/306384.

PUBLICATIONS

Préchoux, A., Genicot, S. and Helbert, W. (2012). Controlling carrageenan structure using a novel formylglycine-dependent sulfatase, an endo-4S-iota-carrageenan sulfatase. *Marine Biotechnology*.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 avril 2012 (19.04.2012)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/049437 A2

- (51) Classification internationale des brevets :
C12P 19/04 (2006.01) C07H 15/14 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/052421
- (22) Date de dépôt international :
17 octobre 2011 (17.10.2011)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1058420 15 octobre 2010 (15.10.2010) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
HELBERT, William [FR/FR]; 9, rue Louis Hémon, F-29680 Roscoff (FR). PRECHOUX, Aurélie [FR/FR]; Menez Briz Vihan, F-29370 Elliant (FR). GENICOT-JONCOUR, Sabine [FR/FR]; 20, rue Pol Pasquet, F-29250 Saint-pol-de-leon (FR).
- (74) Mandataire : ENDERLIN, Eric; 122 Rue Edouard Vaillant, F-92593 Levallois-Perret Cedex (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g)
— avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a)

(54) Title : METHOD FOR TRANSFORMING IOTA-CARRAGEENAN INTO ALPHA-CARRAGEENAN BY MEANS OF A NEW CLASS OF 4S-IOTA-CARRAGEENAN SULFATASE

(54) Titre : PROCEDE DE TRANSFORMATION DU IOTA-CARRAGHENANE EN ALPHA-CARRAGHENANE A L'AIDE D'UNE NOUVELLE CLASSE DE 4S-IOTA-CARRAGHENANE SULFATASE

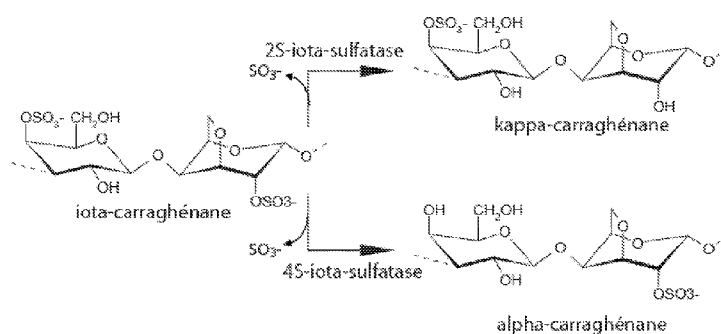


Figure 3

(57) Abstract : The invention relates to a method for transforming iota-carrageenan into alpha-carrageenan by means of a new class of 4S-iota-carrageenan sulfatase. The invention also relates to carrageenans obtained by said conversion method. The invention can be especially applied to the agro-food, pharmaceutical and cosmetic industries.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à un procédé de transformation du iota-carraghénane en alpha-carraghénane à l'aide d'une nouvelle classe de 4S-iota-carraghénane sulfatase. La présente invention est également relative aux carraghénanes obtenus par ledit procédé de conversion. La présente invention trouve notamment une application en industrie agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.



WO 2012/049437 A2

Procédé de transformation du iota-carraghénane en alpha-carraghénane à l'aide d'une nouvelle classe de 4S-iota-carraghénane sulfatase

5

DESCRIPTION

Domaine technique

La présente invention se rapporte à un procédé de transformation du iota-carraghénane en alpha-carraghénane à l'aide d'une nouvelle classe de 4S-iota-carraghénane sulfatase. La présente invention se rapporte également aux carraghénanes obtenus par ledit procédé de conversion.

La présente invention trouve notamment une application en industrie agro-alimentaire, pharmacie et cosmétique.

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([])
renvoient à la liste des références présentée à la fin du texte.

Etat de la technique

Les carraghénanes sont des galactanes sulfatés extraits de la paroi des algues rouges marines. Les carraghénanes sont composés d'un enchaînement de D-galactosides liés alternativement par des liaisons alpha(1-3) et bêta(1-4). Ces polysaccharides anioniques se distinguent essentiellement par la présence ou non d'un pont 3,6 anhydro sur le résidu galactose lié en alpha(1-3), et par leur taux de sulfatation. Par exemple les trois unités de répétition disaccharidique – appelées motif carrabiose – rencontrées dans les carraghénanes les plus exploités industriellement sont caractérisées par la présence de un (kappa-carrabiose), deux (iota-carrabiose) ou trois sulfates (lambda-carrabiose) (figure 1). Les carraghénanes peuvent être composés principalement d'un motif carrabiose, par exemple le kappa-carraghénane de l'algue *Kappaphycus alvarezzi* est composé d'environ 90% de motif kappa-carrabiose et 10% de iota-carrabiose. Le iota-carraghénane extrait d'*Eucheuma denticulatum* est

composé de 85% d'unités iota-carrabiose et 15% d'unités kappa-carrabiose.

Les compositions en unité carrabiose peuvent être très variables et dépendent essentiellement de l'origine botanique de l'algue. On parle de
5 kappa-carraghénane quand le polysaccharide est riche en motif kappa-carrabiose et que ces propriétés physico-chimiques sont proches de celles du kappa-carraghénane de *K. alvarezzi* souvent utilisé comme référence. (Bixler et al., Food Hydrocolloids, 15 : 619-630, 2001) [1].

Toute une gamme de structures intermédiaires de kappa/iota-carraghénanes hybrides a été décrite en fonction de l'origine botanique
10 des polysaccharides (figure 2 ; Bixler et al., 2001, précité) [1]. Le type de carraghénane présent dans la paroi des algues peut également être corrélé au stade de vie des algues. En effet dans le cas de *Chondrus crispus*, les gamétophytes sont riches en kappa/iota-carraghénanes tandis que les sporophytes contiennent essentiellement du lambda-carraghénane. Les saisons et tous les facteurs environnementaux pouvant affecter la croissance des algues (éclairage, température, sels, etc...) auront également un effet sur la structure et la composition en carraghénane. Par conséquent, en fonction de l'origine et/ou des
15 procédures d'extraction, un large spectre de structures de type kappa-, iota- et lambda-carraghénanes peut être observé.

Ces polysaccharides ont des propriétés rhéologiques uniques et sont utilisés comme agents de texture en industrie agro-alimentaire, pharmacie et cosmétique. Ces polysaccharides possèdent un large spectre de
25 propriétés fonctionnelles qui s'explique par leur grande diversité structurale. Les kappa- et iota-carraghénanes ont la propriété de former des gels iono- et thermo-dépendants. Le kappa-carraghénane va former des gels rigides en présence de potassium alors que le iota-carraghénane forme des gels souples et élastiques en présence de calcium. La grande
30 diversité de structure chimique des carraghénanes et leur hybridité

naturelle confèrent à chaque extrait d'algue des propriétés fonctionnelles caractéristiques.

Environ 50 000 tonnes de carraghénanes sont vendus annuellement (Bixler and Porse, J. Appl. Phycol., 2010, online) [2]. Toutefois, le tonnage des carraghénanes exploités est limité par la quantité d'algue rouge disponible. Actuellement, deux espèces d'algue rouge sont largement cultivées : *Kappaphycus alvarezzi* et *Eucheuma denticulatum* dont sont extraits le kappa- et le iota-carraghénane, respectivement. De nombreuses algues sauvages (non cultivées) sont également collectées en grande quantité car leurs carraghénanes, de nature kappa/iota-hybrides, présentent des propriétés fonctionnelles très intéressantes. Cependant la tonne de ces algues est deux fois voire dix fois plus chère que celle des algues cultivées.

En outre, à chaque application industrielle correspondent des extraits de carraghénanes provenant d'une espèce ou de plusieurs espèces d'algues rouges. Les solutions pour satisfaire les besoins industriels dans n'importe quel domaine résident essentiellement dans la formulation (le mélange) des carraghénanes (Bixler and Porse, 2010, précité) [2].

Par conséquent, un procédé biotechnologique qui permettrait d'obtenir des carraghénanes hybrides à partir des algues cultivées serait économiquement très rentable. Il présenterait l'avantage d'être moins dépendant de la source d'algues, et ouvrirait de nouvelles perspectives quant à l'exploitation et la valorisation de la biomasse d'algues rouges.

Afin de contrôler la structure chimique et, par extension, les propriétés physico-chimiques des carraghénanes, les Inventeurs ont donc entrepris la purification et la production d'enzymes capables de modifier et de corriger les structures des carraghénanes. Les modifications recherchées consistent en la désulfatation des carraghénanes par des enzymes appelées sulfatases qui conduisent en la conversion du iota- en kappa- ou alpha-carraghénane, ou à des structures hybrides de type kappa/iota- ou iota/alpha-carraghénane (figure 3). Ils ont ainsi démontré

l'existence de carraghénane-sulfatases pouvant agir directement sur le polymère sans action préalable de carraghénases. Ils ont réussi à purifier à partir d'une population bactérienne *Pseudoalteromonas carrageenovora*, une première 4S-iota-carraghénane sulfatase appartenant à la famille des amidohydrolases, et qui convertit le iota- en alpha-carraghénane par désulfatation (élimination d'un groupe SO_3^-) spécifique en position 4 du iota-carraghénane (Demande de Brevet français FR 09/52642) [3]. En utilisant la même stratégie que pour la première 4S-iota-carraghénane sulfatase, les Inventeurs ont réussi à purifier à partir de *Pseudoalteromonas atlantica*, une seconde 4S-iota-carraghénane sulfatase appartenant à la famille des formylglycine-dépendent sulfatases. Ils ont tout d'abord réussi à déterminer trois peptides de ladite protéine : NGQFDNTVIVFTSDNGGK (SEQ ID NO 1), FDQTFQVGDNTR (SEQ ID NO 2), et ETEYITDGLSR (SEQ ID NO 3), qui une fois confrontés à la banque TrEMBL, ont mis en évidence une correspondance avec la protéine Q15XH3 de *P. atlantica* T6c dont le gène (Patl_0889) a été annoté comme une sulfatase (Protein_ID ABG39415.1 ; Copeland et al., 2006) [4].

Les 4S-iota-carraghénane sulfatases pourraient donc permettre de calibrer « l'hybridité » des carraghénanes. Ainsi, toute sulfatase agissant sur le iota-carraghénane pourrait représenter une innovation majeure car elle permettrait de fabriquer des alpha- et iota/alpha- carraghénanes qui sont très peu abondants dans la nature, et différents en terme de séquence peptidique mais également de propriétés biochimiques. Toutefois il est apparu que les sulfatases agissant sur les carraghénanes pouvaient ne pas présenter d'homologie avec les autres sulfatases connues – les sulfatases les plus étudiées étant les enzymes agissant sur l'héparine, un polysaccharide d'origine animal.

Il existe donc un réel besoin de purifier des enzymes de modification des motifs de sulfatation des carraghénanes afin de pallier aux défauts, inconvénients et obstacles de l'art antérieur, en particulier d'un procédé

permettant de maîtriser « l'hybridité » des carraghénanes utilisant lesdites enzymes, de réduire les coûts et de contrôler l'approvisionnement et les propriétés fonctionnelles des carraghénanes ainsi obtenus.

5 Description de l'invention

Les Inventeurs ont mis en évidence de manière tout à fait inattendue que la seconde 4S-iota-carraghénane sulfatase identifiée (Q15XH3) est capable de convertir le motif iota-carrabiose en motif alpha-carrabiose. Le motif iota-carrabiose peut être présent dans un oligo-saccharide ou un polysaccharide qui peut être composé également d'autres motifs carrabiose.

La présente invention a donc pour objet un procédé de transformation du iota-carraghénane en alpha-carraghénane comprenant la catalyse enzymatique de la conversion du motif iota-carrabiose en motif alpha-carrabiose par une enzyme dont la séquence peptidique comprend les peptides de séquences suivantes :

NGQFDNTVIVFTSDNGGK (SEQ ID NO 1),

FDQTFQVGDNTR (SEQ ID NO 2), et

ETEYITDGLSR (SEQ ID NO 3).

On entend par « iota- et alpha-carraghénane » au sens de la présente invention, des iota- et alpha-carraghénanes et/ou iota- et alpha-carraghénanes hybrides, par exemple contenus en solution, solution partiellement gélifiée ou gel. Ainsi, le iota-carraghénane pur gélifie sous ses propres charges, alors que des carraghénanes hybrides tels que le iota-nu-carraghénane et les oligo-iota-carraghénanes sont peu gélifiants.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de l'invention, ladite enzyme a la séquence peptidique suivante :

MTFNKKVSTLLWGTLIAISVGNASADAGQSKADESNEKPNILFVLADDL

GYNDVGFNGSTDIKTPNLDGLAKNGMTFDAAYVAHPFCGPSRAAIMTGR

YPHKIGAQFNLPEDNSNVGVSADLFIAQTMKSAGYFTGAMGKWHLGEA

SEYHPNKHGFDEFYGFLLGGHNYFPEQFEAAYNKRVAQGMTNINMYLT

PLEHNGKEVRETEYITDGLSREAVNFVDKAAAKKKPFFLYLAYNAPHVPL
QAKEEDMAMFSSQIKDKKRRTYAGMVYAVDRGVGRIVEQLKKNQFDNT
VIVFTSDNGGKLGQGANNYPKKEGKGSVQEGGFRTPLVHWPKHMKAG
SRFSHPVLALDLYPTFAGLGGAVLPEDKKLDGKDIWADIQANTAPHKDEFI
5 YVLRHRNGYS DAAARRNQFKAVKNHNDDWKLYNIAQDISEDNDISAQHP
DILRDMVSSMESWSWNNQQPKWFHQSAEGAQWRLKAMPFRDQTFQV
GDNTRSNSKKGH (SEQ ID NO 4)

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de l'invention,
ladite enzyme est une 4S-iota-carraghénane sulfatase. Par exemple, il
10 peut s'agir d'une 4S-iota-carraghénane sulfatase de séquence présentant
au moins 30% d'identité de séquence avec SEQ ID NO : 4, de préférence
au moins 50% d'identité de séquence avec SEQ ID NO : 4, tout
préférentiellement au moins 80% avec SEQ ID NO : 4.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de l'invention,
15 l'enzyme est produite par une cellule hôte comprenant un acide nucléique
codant pour ladite enzyme et/ou un vecteur comprenant une séquence
d'acide nucléique codant pour ladite enzyme.

On entend par « cellule hôte » au sens de la présente invention une
cellule procaryote ou eucaryote. Des cellules hôtes couramment utilisées
20 pour l'expression de cellules recombinantes incluent notamment des
cellules de bactéries telles que *Escherichia coli* ou *Bacillus*, des cellules de
levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*, des cellules de
champignons tels que *Aspergillus niger*, des cellules d'insectes, et des
cellules de mammifères (notamment humaine) telles que les lignées
25 cellulaires CHO, HEK 293, PER-C6, etc... La transformation des cellules
procaryotes et eucaryotes est une technique bien connue de l'homme du
métier, par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, ou
des méthodes chimiques. En fonction de la cellule à transformer, l'homme
du métier pourra aisément déterminer les moyens nécessaires à
30 l'introduction et à l'expression de l'acide nucléique chez la cellule hôte
choisie. Ainsi le vecteur d'expression et la méthode d'introduction du

vecteur d'expression au sein de la cellule hôte seront sélectionnés en fonction de la cellule hôte choisie. La cellule hôte transformée par un vecteur d'expression ou un acide nucléique va exprimer le polypeptide correspondant de manière stable. L'homme du métier peut aisément
5 vérifier que la cellule hôte exprime le polypeptide de manière stable, par exemple en utilisant la technique du Western blot.

On entend par « vecteur » au sens de la présente invention, des vecteurs d'expression et/ou de sécrétion de séquences d'acide nucléique dans une cellule hôte déterminée. Ils peuvent par exemple être des
10 vecteurs d'origine plasmidique ou virale, comportant, outre la séquence d'acide nucléique, les moyens nécessaires à son expression. Ces moyens peuvent par exemple inclure un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Le vecteur d'expression peut également
15 comprendre d'autres éléments tels qu'une origine de réplication, un site de clonage multiple, un enhanceur, un peptide signal qui pourra être fusionné en phase avec le polypeptide produit lors du clonage, et un ou plusieurs marqueurs de sélection.

On entend par « acide nucléique » au sens de la présente invention, aussi bien des molécules d'ADN que des molécules d'ARN, ce qui inclut notamment des molécules d'ADNc et des molécules d'ARNm. L'acide nucléique peut être sous forme double brin (par exemple dans le cas d'un acide nucléique compris dans un vecteur d'expression) ou sous forme simple brin (par exemple dans le cas de sondes ou d'amorces).

25 La présente invention a également pour objet les carraghénanes susceptibles d'être obtenus par le procédé de l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de l'invention, les carraghénanes obtenus possèdent des motifs alpha-carrabioses dès lors que le carraghénane de départ possédait dans sa structure des motifs iota-carrabioses. Par exemple, les motifs iota-carrabioses du carraghénane
30 extrait d'*E. denticulatum* (85% iota-carrabiose et 15% kappa-carrabiose)

peuvent être convertis en un carraghénane possédant 85% d'alpha-carrabiose et 15% de kappa-carrabiose. La réaction enzymatique peut être contrôlée et le taux de conversion de iota-carrabiose en alpha-carrabiose peut varier de 0 à 100%. Les propriétés rhéologiques des carraghénanes
5 obtenus seront modulées en fonction du taux de conversion.

D'autres avantages pourront encore apparaître à l'homme du métier à la lecture des exemples ci-dessous, illustrés par les figures annexées, donnés à titre illustratif.

10 Brève description des figures

- La figure 1 représente la structure chimique des motifs de répétition des trois principaux carraghénanes (kappa κ , iota ι , et lambda λ) exploités industriellement.
- La figure 2 représente les compositions hybrides kappa/iota-carraghénanes en fonction de la source d'algues rouges (Bixler et al.,
15 2001, précité) [1].
- La figure 3 représente le schéma des réactions enzymatiques catalysées par les 4S- et 2S-iota-carraghénane sulfatases.
- La figure 4 représente le gel d'électrophorèse (SDS-PAGE)
20 coloré au bleu de Coomassie colloïdal de plusieurs fractions collectées après l'étape de chromatographie échangeuse d'anions (Q Sepharose Fast Flow). La protéine de 55 kDa est indiquée à l'aide d'une flèche.
- La figure 5 représente la séquence en acides aminés de la protéine de *Pseudoalteromonas atlantica* T6c (Q15XH3). En gras, les trois
25 séquences peptidiques déterminées par spectrométrie de masse. En italique souligné, la signature de la modification post-traductionnelle de la cystéine. En encadré, les acides aminés du site catalytique dont la lysine (K) et l'histidine (H) qui sont les acides aminés catalytiques.
- La figure 6 représente l'environnement génomique du gène de
30 la nouvelle 4S-iota-carraghénane sulfatase (Q15XH3) dans *P. atlantica*.

– La figure 7 représente le spectre ^1H RMN du iota-carraghénane (B) incubé avec la protéine purifiée de *Pseudoalteromonas atlantica* (Q15XH3) (A)

5

EXEMPLES

Exemple 1 : Identification d'une nouvelle 4S-iota-carraghénane sulfatase issue de *Pseudoalteromonas atlantica*

Criblage des activités carraghénane-sulfatases de
10 *Pseudoalteromonas atlantica*

Le criblage a été réalisé en utilisant la bactérie marine *Pseudoalteromonas atlantica* T6c (souche ATCC T6c / BAA-1087) dont le génome a été complètement séquencé (http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/pseat/pseat.home.html).

15 *Cultures bactériennes*

La production des extraits bactériens a été réalisée à partir de la bactérie marine *Pseudoalteromonas atlantica* cultivée en milieu Zobell [Bacto peptone (*Amresco*) 5g/l, extraits de levure (BD, *Extract of Autolysed Yeast cells*) 1g/l, eau de mer filtrée 800ml complétée à 1l par de l'eau
20 déminéralisée] en présence de kappa- (*Kappaphycus alvarezii*, CP Kelco X6913, à 1g/l), de iota- (*Eucheuma denticulatum*, H030058-534, à 1g/l) ou de lambda-carraghénane (sporophyte de *Gigartina skottsbergii*, CP Kelco, X7055).

La première préculture a consisté à ensemercer 10ml de milieu
25 Zobell à partir d'un glycérol de *P. atlantica* conservé à -80°C . L'incubation a été réalisée dans un agitateur de type New Brunswick pendant 36h, à 18°C et 180rpm. Pour la deuxième préculture, 50ml de milieu Zobell contenant 50mg d'un des carraghénanes (kappa-, iota- ou lambda-) ont été
30 ensemençés avec environ 1ml de la première préculture, de manière à avoir une absorbance de 0,1, à 660nm. Cette deuxième préculture a été incubée à 18°C jusqu'à ce que la densité optique atteigne une valeur de 1

à 1,2, à 660nm, soit environ 8h. Pour la culture finale, 950ml de milieu Zobell contenant le même carraghénane que précédemment, ont été ensemencés avec les 50ml de la deuxième préculture, et incubés à 18°C pendant 36h.

- 5 Afin de séparer le culot bactérien du surnageant de culture, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 6200g pendant 20 minutes, à 4°C.

Préparation des extraits bactériens

10 Le surnageant de culture est concentré par précipitation à 90% de saturation en sulfate d'ammonium (61.5g de sulfate d'ammonium pour 100ml d'échantillon). Le culot obtenu après centrifugation (25min., 10000rpm) est remis en solution dans du tampon Tris-HCl 50mM pH 8.3. Il est ensuite dialysé dans des membranes (Spectra/por, MWCO 3500Da) contre du tampon Tris-HCl 50 mM pH8.3

15 Le culot bactérien a été resuspendu dans du tampon Tris-HCl (Sigma) 50mM à pH 8,3. Les cellules ont ensuite été lysées à la presse de French, et le lysat obtenu a été ultracentrifugé à 27000g, pendant 2h45. Un demi-comprimé d'anti-protéase (Complete, EDTA-free, Roche) a été ajouté au surnageant obtenu.

20 L'extrait a ensuite été dialysé (Spectra/Por, MWCO 3500Da) contre du tampon Tris-HCl 50mM à pH 8,5, pendant une nuit, sous agitation à 4°C.

Dosage du sulfate libéré

25 La production des activités sulfatases a été évaluée en mesurant la quantité de sulfate relarguée après incubation des différents carraghénanes en présence d'extraits bactériens. Les essais ont été conduits avec les surnageants de culture concentrés et les culots bactériens. Pour chaque échantillon analysé, un blanc est réalisé de manière similaire en ayant préalablement inactivé l'extrait enzymatique

30 durant une quinzaine de minutes à 100°C.

Les milieux réactionnels ont été dilués par 2 avec de l'eau milliQ (Millipore) puis centrifugés en microcons (Amicon) avec un seuil de coupure de 10kDa. Cette centrifugation a été réalisée à 3300g pendant 90min à température ambiante. Le filtrat obtenu a ensuite été dosé par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC : High Performance Anion Exchange Chromatography) sur un système Dionex. 20 μ l d'échantillon ont été injectés grâce à un injecteur automatique (AS3000, Thermo). La séparation des anions présents dans les échantillons a été effectuée grâce à une colonne Ion-Pac AS11 (4x200mm, Dionex) munie d'une pré-colonne AG-11 (4x50mm, Dionex). Le système a été équilibré en NaOH 12mM. L'élution a été réalisée par un gradient isocratique en NaOH à un débit de 1ml/min (pompe GP40, Dionex). La détection des anions a été faite par conductimétrie avec un détecteur ED40 (Dionex) muni d'un suppresseur ASRS ultra-II-4mm (Dionex) fonctionnant à un courant de 198mA. Le logiciel utilisé pour l'acquisition et le traitement des données a été le logiciel Chroméléon 6.8. Grâce à une courbe étalon, l'aire des pics de sulfate a été convertie en parties par million (ppm). La différence entre la valeur de l'échantillon et celle du blanc a donné la quantité de sulfate libéré en ppm lors de la réaction enzymatique de désulfatation. Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

| Extrait bactérien | Induction | Substrat | | | | |
|-------------------|-----------|----------|--------------|--------|--------------|--------------|
| | | kappa | iota | lambda | kappa/mu | iota/nu |
| Surnageant | kappa | 0,22 | 0 | 0,04 | 0,08 | 0,28 |
| | iota | 1,36 | 39,36 | 1,26 | 21,96 | 18,96 |
| | lambda | 0,26 | 3,24 | 0,74 | 0,1 | 5,76 |
| Culot | kappa | 0,04 | 3,4 | 0,08 | 0,4 | 4,28 |
| | iota | 4,5 | 80,82 | 3,64 | 8,94 | 63,58 |
| | lambda | 0,36 | 12,9 | 0,04 | 1,08 | 17,3 |

Les résultats en gras correspondent aux conditions pour lesquelles les plus fortes activités sulfatases ont été observées.

Purification et séquence protéique d'une nouvelle 4S-iota-carraghénane sulfatase

Préparation de l'extrait bactérien

Le culot bactérien issu de la culture induite au iota-carraghénane et
5 obtenu tel que précédemment décrit, contenant l'activité sulfatase, a été
resuspendu dans du tampon Tris-HCl (Sigma) 50mM à pH 7,5. Les cellules
ont ensuite été lysées à la presse de French, et le lysat obtenu a été ultra-
centrifugé à 27200g pendant 2h45. Un demi-comprimé d'anti-protéase
(Complete, EDTA-free, Roche) a été ajouté au surnageant obtenu afin de
10 limiter la dégradation des protéines.

Afin d'éliminer les molécules de petite taille (et notamment le sulfate
libre) de l'extrait, celui-ci a été dialysé (Spectra/Por, MWCO 3500Da)
contre du tampon Tris-HCl 50mM à pH 7,5 pendant une nuit, sous agitation
à 4°C.

15 *Purification*

Les expériences de purification ont été entreprises sur les sulfatases
agissant sur le iota-carraghénane. Les étapes de purification ont été
réalisées à l'aide d'un système Akta Purifier.

Le lysat a été déposé sur une colonne de chromatographie
20 échangeuse d'anions faible DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare –
45 x 1 cm) préalablement équilibrée dans du tampon tris-HCl 50mM à pH
7,5. L'échantillon (environ 35ml) a été chargé à l'aide d'une superloop (ou
boucle d'injection) à un débit de 2ml/min. La résine a ensuite été lavée
avec ce même tampon jusqu'à obtenir une absorbance négligeable à
25 280nm. L'élution des protéines a été réalisée à un débit de 2ml/min par un
gradient segmenté, croissant en NaCl de 0 à 1M : 10 volumes de colonne
de 0 à 500mM de NaCl et 2 volumes de colonne de 500mM à 1M NaCl.
Les fractions collectées d'un volume de 5,5ml ont été testées pour leur
capacité à désulfater le iota-carraghénane.

30 Une fraction contenant un maximum d'activité sulfatase a ensuite été
dialysée (membrane Spectra/Por, MWCO 3500Da) pendant 48h contre du

tampon Tris-HCl 50mM à pH 7,5, sous agitation à 4°C. 1ml de cette fraction a été déposé sur une résine échangeuse d'anions forte Q Fast Flow (GE Healthcare – Hitrap 1ml) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50mM à pH7,5. La résine a été lavée avec ce même tampon et les protéines ont été éluées avec un gradient croissant de NaCl de 0 à 1M réalisé de la manière suivante : 15 volumes de colonne de 0 à 500mM NaCl et 5 volumes de colonne de 500mM à 1M NaCl, à un débit de 1ml/min. Les fractions collectées, de 1ml ; ont été incubées en présence de iota-carraghénane pour mesurer l'activité sulfatase. Le degré de pureté des fractions a été visualisé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE.

La pureté des fractions actives a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (Biorad, Criterion XT 12% Bis-Tris). A 15µl d'échantillon ont été ajoutés 5µl de tampon de charge 2% SDS (Amresco), 5% β-mercaptoéthanol (98% Sigma), 20% glycérol (CarloErba), 62,5mM Tris-HCl à pH 6,8 et 0,5% de bleu de Bromophénol (Sigma). Les échantillons ont ensuite été portés à ébullition pendant 3min afin de dénaturer les protéines. Les 20µl de mélange ont alors été déposés sur le gel. Les dépôts de 5µl de marqueurs de taille (Biorad, *Precision Plus Protein*) ont permis d'évaluer le poids moléculaire des protéines comprises entre 10 et 250kDa. La migration a été faite à température ambiante, à 110volts (pour 1 gel) durant 2h, dans un tampon de migration composé de MOPS (Sigma) 200mM, Tris 250mM pH 8,1 et SDS 5g/l. La révélation du gel a été réalisée à l'aide d'une coloration au bleu de Coomassie colloïdal (Candiano et al., *Electrophoresis*, 25(9) : 1327-1333, 2004) [5]. Le poids moléculaire de la protéine purifiée a été estimé à environ 55 kDa (figure 4).

Séquence protéique et nucléique

La bande de la protéine a été excisée du gel, digérée à la trypsine et les peptides obtenus ont été séquencés par spectrométrie de masse sur la plate-forme RIO « Biopolymères » localisée à l'INRA de Nantes. Les trois séquences déterminées [NGQFDNTVIVFTSDNGGK (SEQ ID NO : 1),

FDQTFQVGDNTR (SEQ ID NO : 2), et ETEYITDGLSR (SEQ ID NO : 3)]
ont été confrontées à la banque TrEMBL. Les trois peptides correspondent
à 100% à la protéine Q15XH3 (figure 5, SEQ ID NO : 4) de
Pseudoalteromonas atlantica T6c dont le gène (Patl_0889) a été annoté
5 comme une sulfatase (Copeland et al., 2006, précité) [4]. La protéine
présente la séquence consensus de 12 acides aminés (C/S-X-P-S/X-R-
XXX-L/X-G/X-R/X, SEQ ID NO : 5) requise pour la conversion de la
cystéine en formylglycine (FGly) et les acides aminés catalytiques présents
dans la séquence conservée (G-Y/V-X-S/T-XXX-G-K-X-X-H, SEQ ID NO :
10 6). L'environnement génomique du gène de la nouvelle sulfatase converge
vers une implication de cette protéine dans la dégradation du iota-
carraghénane (figure 6). En effet, le gène de Q15XH3 est localisé dans un
cluster de gènes qui contient d'autres sulfatases (dont Q15XG7 qui
possède 41% d'identité avec Q15XH3), deux protéines inconnues, mais
15 surtout, plusieurs gènes du cycle citrique (oxydation des sucres) et de
métabolisme du D-galactose sont clairement identifiés. Les fonctions des
sulfatases présentes dans ce cluster sont probablement liées à la
désulfatation du iota- et/ou alpha-carraghénane.

Activité sulfatase

20 Afin de mesurer l'activité sulfatase, 100µl d'échantillon à doser ont
été mis en présence de 100µl d'une solution de iota-carraghénane (CP-
Kelco n°1256) à 1% dans du tampon Tris-HCl 50mM à pH 7,5. Les
réactions enzymatiques ont été réalisées à 34°C en bain-marie durant 48h.
Pour chaque échantillon, un blanc a été effectué dans des conditions
25 similaires en ayant préalablement inactivé l'extrait enzymatique durant
15min, à 100°C.

La position du groupement sulfaté clivé et donc l'identification du
produit formé lors de l'hydrolyse enzymatique, a été réalisée par RMN.
Pour cette analyse, les réactions de désulfatation ont été faites en incubant
30 700µl de iota-carraghénane à 1% (CP-Kelco n°1256) en présence de
300µl d'extrait bactérien. Les mélanges réactionnels ont été incubés à

34°C en bain-marie durant 72h puis lyophilisés. Les échantillons ont alors été échangés deux fois dans du D₂O puis redissous dans 700µl de D₂O à 99,97% pour être à une concentration approximative de 10mg/ml. Les spectres ¹H-RMN ont été enregistrés à 70°C sur un spectrophotomètre
5 BRUKER Avance DRX 500 par le service RMN (Université de Bretagne Occidentale, Brest). Les protons anomériques des carraghénanes présentent des déplacements chimiques (δ) caractéristiques compris entre 5 et 5,6 ppm environ. Les résultats montrent que la désulfatation du iota-carraghénane par la protéine pure a conduit à la production d'alpha-carraghénane (figure 7A), comme dans le cas de la première 4S-iota-carraghénane sulfatase purifiée mais dont le poids moléculaire était de 115
10 kDa (Demande de Brevet français FR 09/52642, précité) [3].

Une nouvelle sulfatase capable de convertir du iota- en alpha-carraghénane a donc été identifiée. Elle se distingue de l'unique 4S-iota-carraghénane sulfatase connue à ce jour qui appartient à la famille des amidohydrolases.
15

La séquence de la nouvelle carraghénane sulfatase (Q15XH3) montre qu'elle appartient à la famille des FGly-sulfatases. Cette FGly-sulfatase est la première carraghénane sulfatase de cette famille qui
20 contient d'autres enzymes agissant sur des carbohydrates. Des sulfatases agissant sur les glycosaminoglycanes (i.e. héparine) et des cérébrosides ont été décrites.

Listes des références

1. Bixler et al., Food Hydrocolloids, 15 : 619-630, 2001
2. Bixler and Porse, J. Appl. Phycol., 2010, online
- 5 3. Demande de Brevet français FR 09/52642
4. Copeland et al., « Complete sequence of *Pseudoalteromonas atlantica* T6c”, EMBL ACCESSION N° CP000388, PROTEIN_ID ABG39415.1, 2006
- 10 5. Candiano et al., Electrophoresis, 25(9) : 1327-1333, 2004

REVENDICATIONS

1. Procédé de transformation du iota-carraghénane en alpha-carraghénane comprenant la catalyse enzymatique de la conversion du motif iota-carrabiose en motif alpha-carrabiose par une enzyme dont la séquence peptidique comprend les peptides de séquences suivantes :

NGQFDNTVIVFTSDNGGK (SEQ ID NO 1),

FDQTFQVDNTR (SEQ ID NO 2), et

ETEYITDGLSR (SEQ ID NO 3).

10

2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel la séquence peptidique de l'enzyme est

MTFNKKVSTLLWGTLIAISVGNASAAADAGQSKADESNEKPNILFVLADDL

GYNDVGFNGSTDIKTPNLDGLAKNGMTFDAAYVAHPFCGPSRAAIMTGR

15 YPHKIGAQFNLPEDNSNVGVSADLFIAQTMKSAGYFTGAMGKWHLGEA

SEYHPNKHGFDEFYGFLLGGHNYFPEQFEAAYNKRVAQGMTNINMYLT

PLEHNGKEVRETEYITDGLSREAVNFVDKAAAKKKPFFLYLAYNAPHVPL

QAKEEDMAMFSQIKDKKRRTYAGMVYAVDRGVGRIVEQLKKNQFDNT

VIVFTSDNGGKLGQGANNYPLKEGKGSVQEGGFRTPLVHWPKHMKAG

20 SRFSHPVLLALDLYPTFAGLGGAVLPEDKKLDGKDIWADIQANTAPHKDEFI

YVLRHRNGYSDAARRNQFKAVKNHNDDWKLYNIAQDISDNDISAQHP

DILRDMVSSMESWSWNNQQPKWFHQSAEGAQWRLKAMPFRDQTFQV

GDNTRSNSKKGH (SEQ ID NO 4)

25 3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, dans lequel ladite enzyme est une 4S-iota-carraghénane sulfatase.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel l'enzyme est produite par une cellule hôte comprenant un acide nucléique codant pour ladite enzyme et/ou un vecteur comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour ladite enzyme.

30

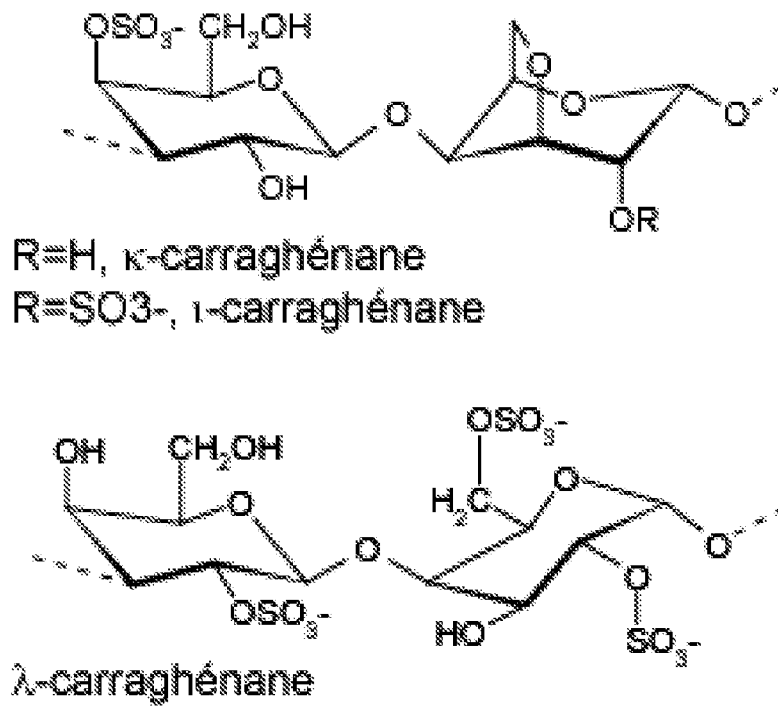


Figure 1

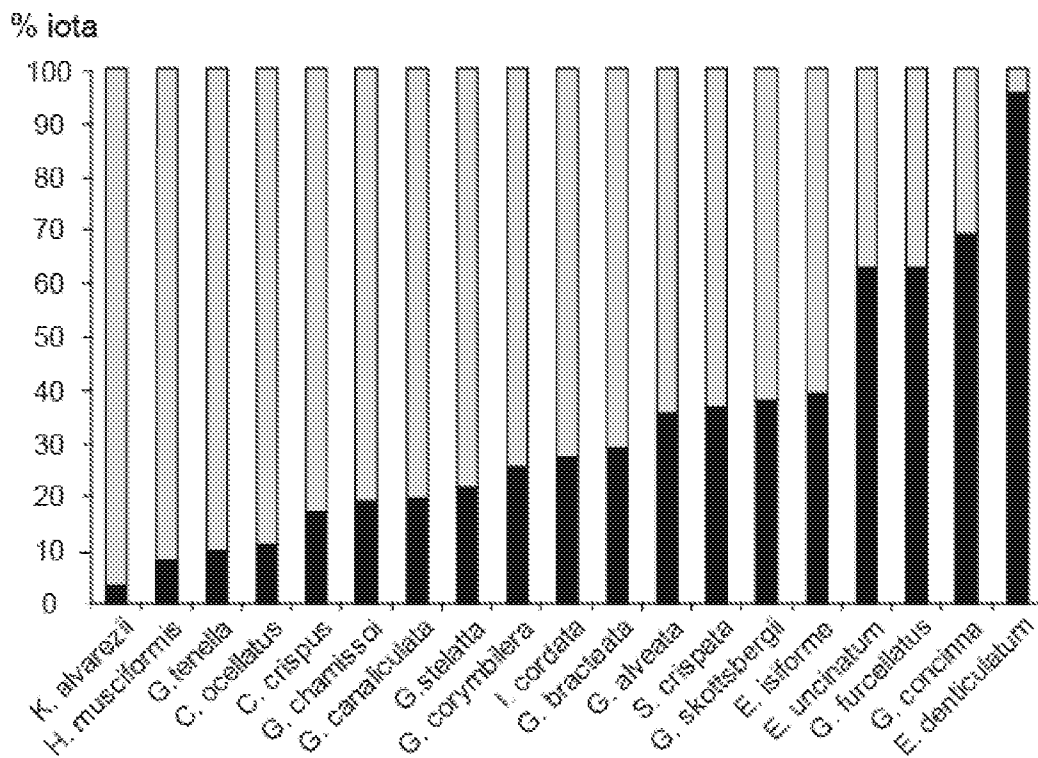


Figure 2

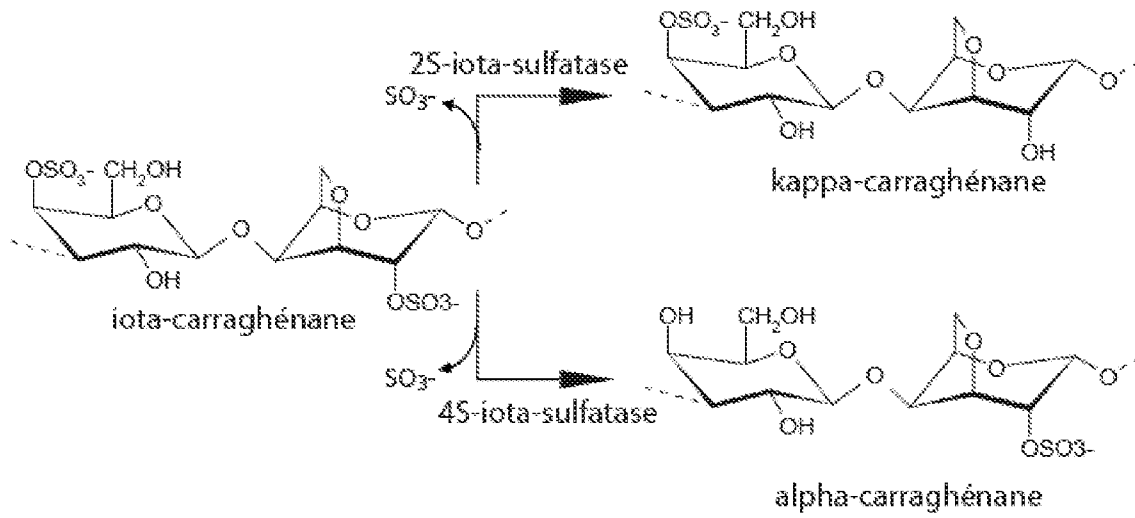


Figure 3

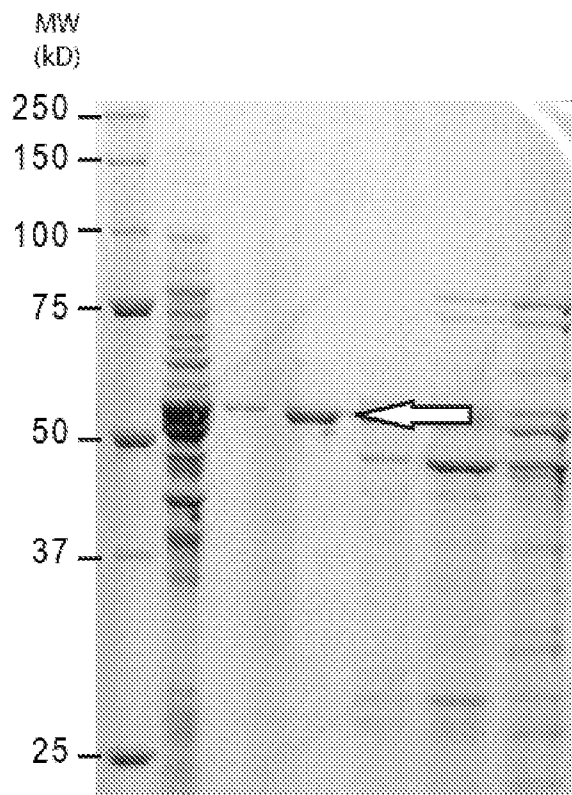


Figure 4

>Q15XH3

MTFNKKVSTLLWGTLIAISVGNASAADAGQSKADESNEKPNILFVLADDLGYNDVGF
 NGSTDIKTPNLDGLAKNGMTFDAAYVAHPFCGPSRAAIMTG RYPHKIGAQFNLPED
 NSNVGVSADELFIAQTMKSA GYFTGAM GKWHLGEASEYHPNKHGFDEFYGFLLGG
 GHNYFPEQFEAAYNKRVAQGMTNINMYLTPLEHNGKEVRETEYITDGLSREAVNFV
 DKAANKKPPFLYLAYNAPHVPLQAKEEDMAMFSQIKDKKRRTYAGMVYAVDRGV
 GRIVEQLKKNGQFDNTVIVFTSDNGGKLGQGANNYPLKEGKGSVQEGGFRTPLV
 HWPKHMKAGSRFSHPVLALDLYPTFAGLGGAVLPEDKKLDGKDIWADIQANTAPHK
 DEFIYVLRHRNGYSDAAARRNQFKAVKNHNDWKLYNIAQDISEDNDISAQHPDILR
 DMVSSMESWSWNNQQPKWFHQSAEGAQWRLKAMPRFDQTFQVGDNTRSNSKK
 GH

Figure 5

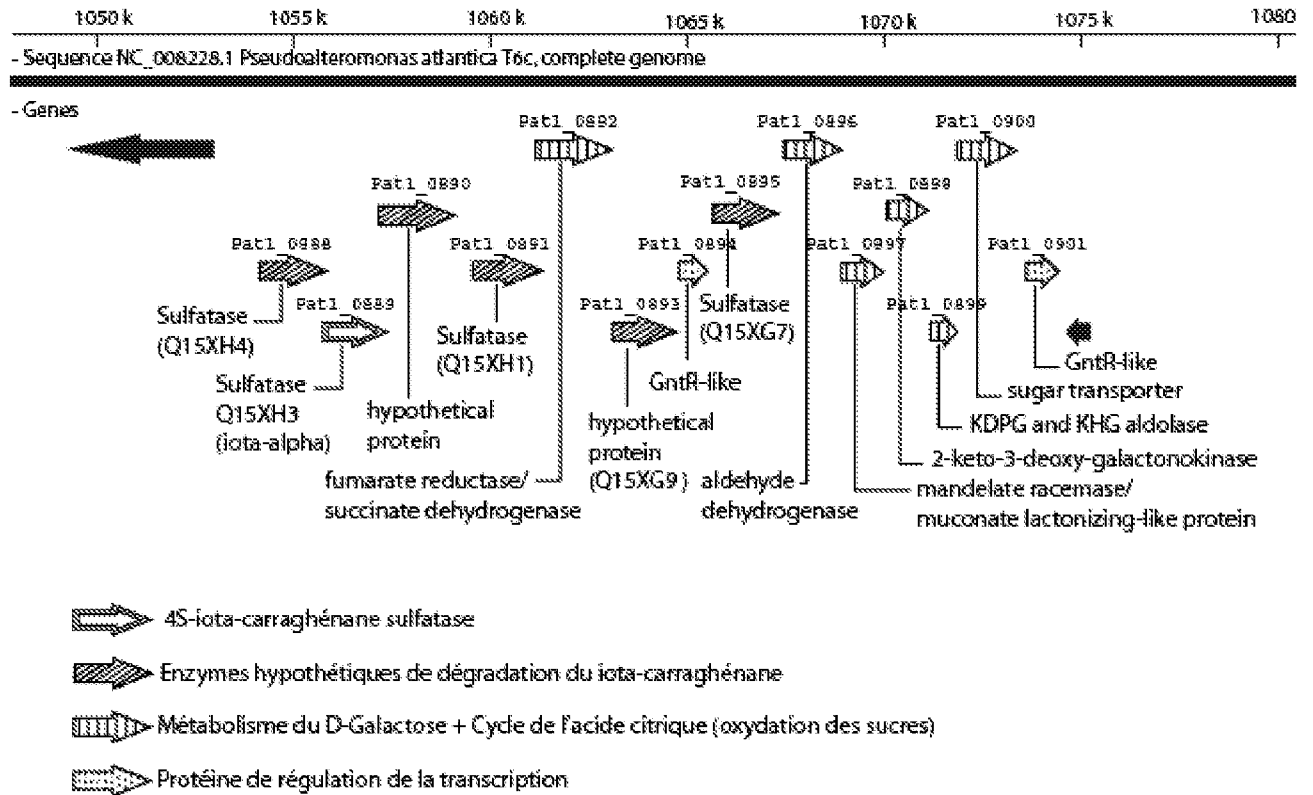


Figure 6

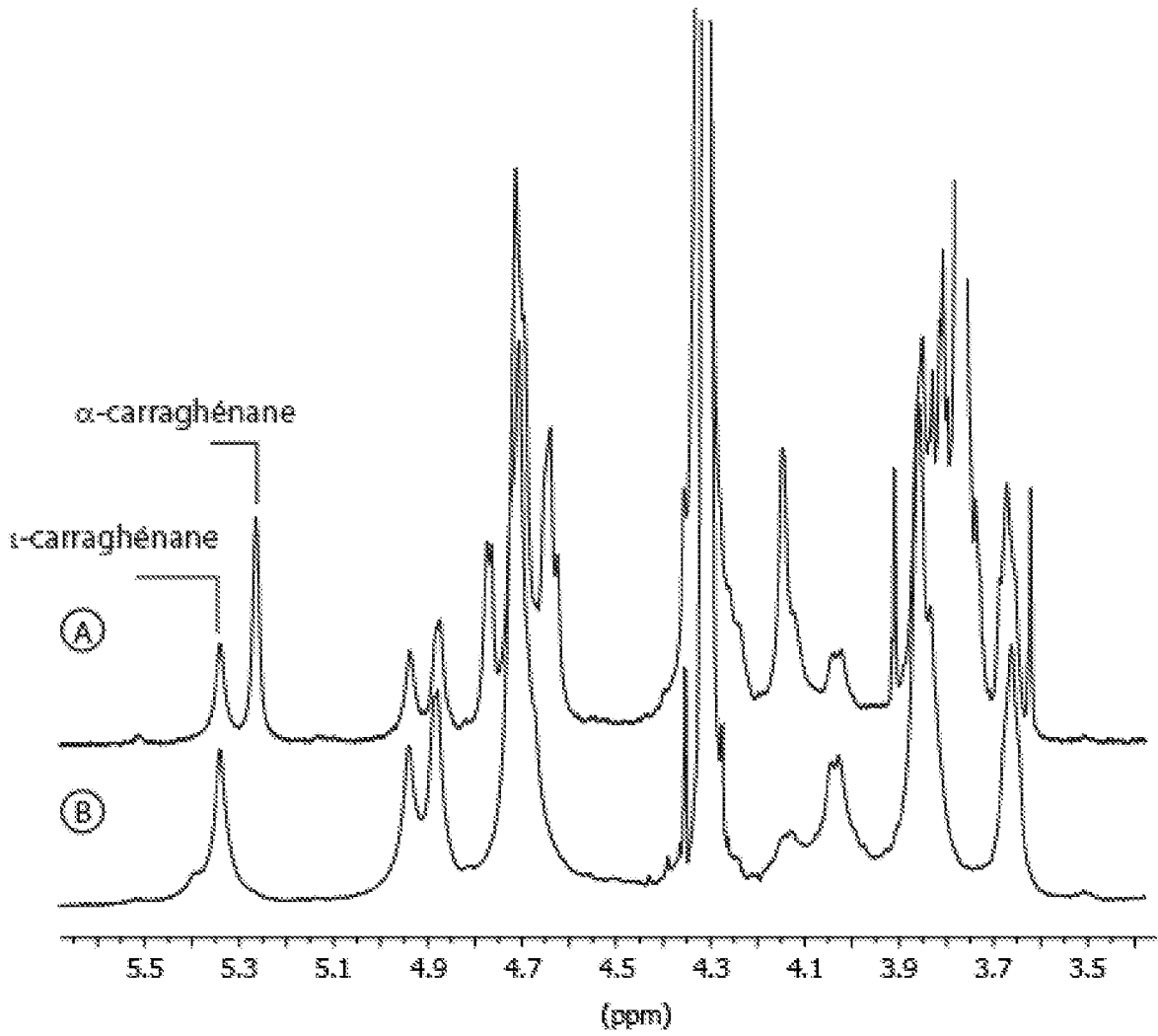


Figure 7

Nouveau procédé de préparation de kappa-/beta-carraghénane. Gène d'une nouvelle 4S-kappa-carraghénane-sulfatase.

1) Introduction: Diversité structurale et fonctionnelle des carraghénanes

Les carraghénanes définissent des familles de galactanes sulfatés isolés de la matrice extracellulaire des algues rouges marines. Ces polysaccharides anioniques ont des propriétés rhéologiques uniques et sont utilisés comme agents de texture en industrie agro-alimentaire, parapharmaceutique et cosmétique. Les carraghénanes sont extraits des algues rouges telles que *Furcellaria lumbricallis*, *Eucheuma denticulatum*, *Kappaphycus alvarezii* et *Chondrus crispus*. Ce sont les polysaccharides marins les plus exploités (50 000 t/an) devant les alginates (26 500 t/an) et les agars (9 600 t/an). En 2010, les carraghénanes (561 millions de dollars) se situaient en quatrième position du marché des hydrocolloïdes, après l'amidon, la gélatine et les pectines (Seinsun, 2012).

Les carraghénanes sont composés d'un enchaînement de D-galactoses liés alternativement par des liaisons $\alpha(1-3)$ et $\beta(1-4)$. Les unités de répétition sont donc des disaccharides appelés unités carrabioses. Les unités de répétition sont classées en fonction de la présence ou non d'un **pont 3,6 anhydro** sur le résidu galactose lié en $\alpha(1-3)$ et par leur **taux de sulfatation**. Par exemple, le β -carrabiose se caractérise par l'absence de groupement sulfate alors que le κ -, le ι - et le λ -carrabiose, possèdent un, deux ou trois sulfates par unité disaccharidique, respectivement (Figure 1).

Les κ - et ι -carraghénanes sont composés principalement - mais pas uniquement - des motifs idéaux κ - et ι -carrabioses. D'autres motifs comme les précurseurs biosynthétiques (μ - et ν -carraghénanes) ou bien des structures désulfatées (β -carrabiose), méthylées ou pyruvatées peuvent également être présentes dans la chaîne de polysaccharide. Par conséquent, en fonction des sources d'algues et des conditions d'extraction on peut observer un **large spectre de structures de carraghénanes**.

Les κ - et ι -carraghénanes ont la propriété de former des gels iono- et thermo-dépendants. Le κ -carraghénane va former des gels rigides en présence de potassium alors que le ι -carraghénane forme des gels souples et élastiques en présence de calcium. La grande diversité des structures chimiques des carraghénanes et leur hybridité naturelle confèrent à chaque extrait d'algues des propriétés fonctionnelles caractéristiques.

Le furcellaran désigne le carraghénane extrait de l'algue rouge *Furcellaria lumbricallis* (Danish moss). Ce carraghénane est composé d'unités κ - et β -carrabioses distribuées aléatoirement le long de la chaîne du polysaccharide. Cette distribution se distingue d'une organisation plutôt en bloc des unités κ - et β -carrabioses observée dans le cas des κ -/ β -carraghénanes d'*Eucheuma gelatinae* et de *Tichocarpus crinitus* (Greer and Yaphe, 1984 ; Correc et al., 2012) Le furcellaran permet de former des gels qui présentent des propriétés de rigidité proches de celle du κ -carraghénane mais en raison du plus faible taux de sulfatation, les concentrations salines nécessaires à la gélification sont plus faibles (Bjerre-Petersen et al. 1973 ; Zhang et al. 1994).

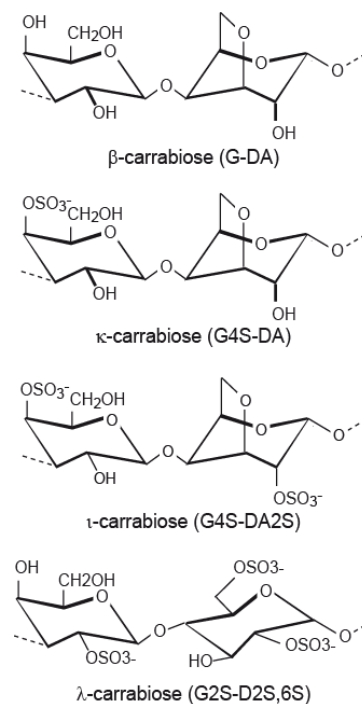


Figure 1 : Structures chimiques des β -, κ -, ι - et λ -carrabioses.

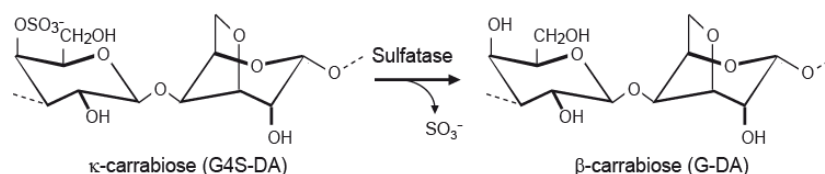


Figure 2 : Schéma de la réaction enzymatique de désulfatation catalysée par une 4S-κ-carraghénane-sulfatase permettant la transformation du κ- en β-carrabiose.

Tableau 1 : Criblage des activités carraghénane-sulfatases de *Pseudoalteromonas atlantica* en fonction des conditions d'induction. Les données sont exprimées en surface de pics des chromatogrammes. Les cases colorées en gris correspondent aux conditions pour lesquelles les plus fortes activités sulfatases ont été observées.

| Extrait bactérien | Induction | Substrat | | | | |
|-------------------|-----------|----------|-------|--------|----------|---------|
| | | Kappa | Iota | Lambda | Kappa/Mu | Iota/Nu |
| Surnageant | Kappa | 0,22 | 0 | 0,04 | 0,08 | 0,28 |
| | Iota | 1,36 | 39,36 | 1,26 | 21,96 | 18,96 |
| | Lambda | 0,26 | 3,24 | 0,74 | 0,1 | 5,76 |
| Culot | Kappa | 0,04 | 3,4 | 0,08 | 0,4 | 4,28 |
| | Iota | 4,5 | 80,82 | 3,64 | 8,94 | 63,58 |
| | Lambda | 0,36 | 12,9 | 0,04 | 1,08 | 17,3 |

2) Contrôler le taux de sulfatation des carraghénanes

Les propriétés rhéologiques des carraghénanes dépendent de leurs poids moléculaires, de la présence de ponts 3,6 anhydro et surtout du taux de sulfatation. Par conséquent, ajouter ou éliminer des groupements sulfate permet de moduler les propriétés des carraghénanes. La désulfatation par voie chimique n'est pas spécifique; quelles que soient leurs positions sur les résidus galactose ou anhydrogalactose, les groupements sulfate sont indistinctement éliminés. De plus, les procédés chimiques impliquent des conditions drastiques qui entraînent une dépolymérisation importante des carraghénanes conduisant à la diminution, voire la perte, des propriétés de gélification des macromolécules désulfatées (voir revue Usov et al., 2011).

Dans ce contexte, la désulfatation par voie enzymatique offre l'avantage d'être spécifique et de ne pas modifier le degré de polymérisation des carraghénanes. La première carraghénane-sulfatase a été mise en évidence par Weigl and Yaphe W. (1966). Cette enzyme isolée de la bactérie *Pseudoalteromonas carrageenovora* est une exo-sulfatase qui élimine le sulfate en position 4 de l'extrémité non réductrice d'oligo-κ-carraghénanes (McLean and Williamson, 1979). Depuis, nous avons montré l'existence d'endo-sulfatases convertissant le polymère de ι-carraghénane en α-carraghénane. Ces enzymes permettent de contrôler la structure chimique des carraghénanes sans dépolymérisation (Préchoux et al. Brevet 2010 ; Genicot-Joncour and Helbert, 2009).

Les travaux réalisés précédemment ont été conduits sur le ι-carraghénane. Nous avons poursuivi nos recherches de sulfatases en se focalisant sur la désulfatation du κ-carraghénane. L'objectif résidait dans la préparation, de façon contrôlée, d'analogues du furcellaran (κ-/β-carraghénane) dont l'exploitation a fortement décliné, en raison notamment de la diminution de la ressource de *F. lumbricallis* causée par son exploitation intensive.

3) Résultats

3-1) Criblage des activités carraghénane-sulfatases de *Pseudoalteromonas atlantica*

Le criblage a été réalisé en utilisant la bactérie *Pseudoalteromonas atlantica* T6c (ATCC BAA-1087) dont le génome a été complètement séquencé (http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/pseat/pseat.home.html).

Nous avons cultivé *P. atlantica* en milieu Zobell en présence de κ -, de ι - ou de λ -carraghénane. La production des activités sulfatases a été évaluée en mesurant la quantité de sulfate libéré après incubation des différents carraghénanes en présence d'extraits bactériens. Les essais ont été conduits avec des surnageants de culture concentrés et des culots bactériens. Le relargage de sulfate a été suivi par chromatographie échangeuse d'anions (système Dionex). Les résultats présentés dans le Tableau 1 indiquent que la présence de ι -carraghénane dans le milieu de culture stimule la production des carraghénane-sulfatases par la bactérie. Les enzymes agissant sur le ι -carraghénane sont les plus actives et une 4S- ι -carraghénane-sulfatase a été isolée précédemment (Préchoux et al, brevet 2010). Une activité non négligeable avait été détectée sur l'hybride κ -/ μ -carraghénane suggérant la présence d'une nouvelle carraghénane-sulfatase.

3-2) Purification d'une nouvelle κ -carraghénane-sulfatase

La purification de la κ -carraghénane sulfatase a été entreprise en mettant en œuvre différentes étapes de chromatographie. Le protocole conduisant à la plus grande pureté e l'activité sulfatase a été obtenu après un fractionnement sur colonne d'affinité Héparine Fast Flow (Hicaprep 20 ml, GE Healthcare) et sur une colonne échangeuse d'anions forte Q Fast Flow (Hitrap 5 ml, GE Healthcare). Le gel SDS-PAGE présentée à la Figure 3 a révélé que l'extrait purifié qui possède le maximum d'activité (fraction F12) et convertit le κ - en β -carraghénane (Figure 4) contient deux fractions protéiques majoritaires à 35 kDa et 60kDa. Les deux bandes ont été excisées du gel, digérées à la trypsine et les peptides obtenus ont été séquencés par spectrométrie de masse sur la plate-forme RIO "Biopolymères" localisée à l'INRA de Nantes.

La fraction à 30kDa est composée d'une fructose-bisphosphate aldolase (Q15QK5), d'un régulateur de transcription (Q15VE2), mais pas de protéines ressemblant à une sulfatase. Par contre, la bande à 60kDa contient la protéine Q15XH1 (uniprot) de *P. atlantica* dont le gène (*Patl_0891*) a été annoté comme une sulfatase (http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/pseat/pseat.home.html) avec un poids moléculaire de 63kDa. Neuf peptides couvrant 27% de la séquence de la protéine ont été identifiés. La protéine Q15XH1 possède toutes les caractéristiques des sulfatases à Formylglycine

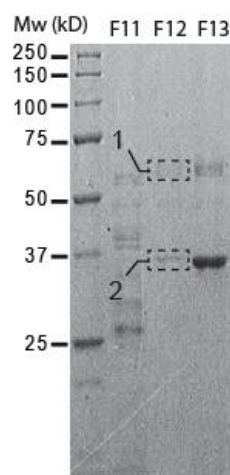


Figure 3 : Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) coloré au bleu de Coomassie colloïdal de plusieurs fractions collectées après l'étape de chromatographie échangeuse d'anions (Q Sépharose Fast Flow).

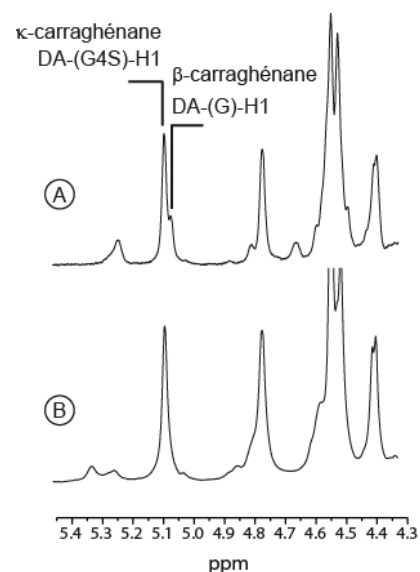


Figure 4 : Spectre ^1H RMN du κ -carraghénane (B) incubé avec la protéine Q15XH1 purifiée (A).

>Q15XH1

| | | | | | | |
|-------------------|-------------------|----------------------------|--------------|------------|-------------------|----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| <u>MRKYLIMLLI</u> | <u>LAGCSPVLAD</u> | VPKNTA VAAS | KAAPT KKP NV | LFISIDDLRP | ELGSYGS DIA | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | |
| ITPNLDALAK | RGVQFNQAHA | <u>QQAI</u> C GPSRA | SILTGIRPDS | LDVHHNYQLF | RHKLEDVVTL | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| PQHFANNGYE | AFYVVGKIFHH | TDKDEALSWN | VEPAYHKLPP | GLAKPKRYAL | KANQKIQQDN | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | |
| RKAMFAKYGE | QAKFGLGSGP | AYESADV PDT | AYHDGYNTEL | AIATMKEQLN | NRDKPLFIGF | |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| GMMKPHLPWI | APQKYWDLYN | PDDITLAEND | TAPIDGAAMG | LHASFELRTF | SNIPKKGPIA | |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | |
| PTLARTLKHA | YLANISYVDA | <u>QIGKMLAALE</u> | EQGILDNTIV | IVWSDHGWHL | GEMGIW GKAT | |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | |
| NYDIATR VPL | <u>IIATPDMKKD</u> | IQGQKTDALV | ELVDIYPTLS | ALAGLNNLPQ | WEGQSMVPLL | |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | |
| TNPAHSWKPA | VFSQFPTPAL | REWGAYPLRS | GMRETYFGPL | IKRVEQRIKD | <u>QQKDKWDREL</u> | |
| 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | |
| FEQHLMGNAI | <u>RTERYRLVAW</u> | <u>QDTRLAKNSR</u> | PLYLELYDHQ | HDPNESINVA | KQHPKQVAKL | |
| 550 | 560 | | | | | |
| LKQLYAGWQI | <u>SKASLREPSI</u> | AGQTR | | | | |

Figure 5: Séquence en acides aminés de la protéine Q15XH1 de *Pseudoalteromonas atlantica* T6c. Les séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse sont soulignées. Le peptide signal de la protéine est surligné en gris. La signature de la modification post-traductionnelle de la cystéine (CXPXR) est indiquée en caractères gras.

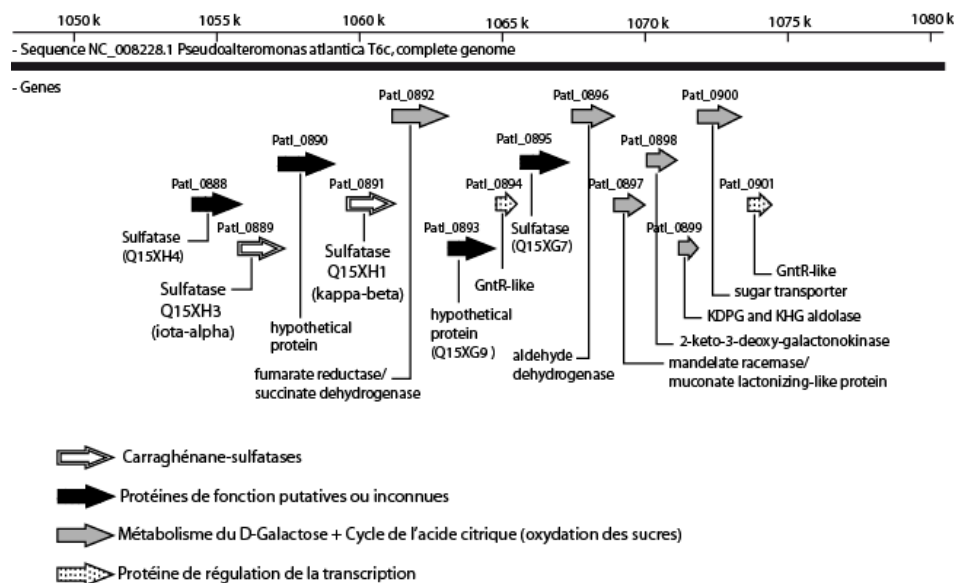


Figure 6 : Environnement génomique du gène de la nouvelle κ -carraghénane-sulfatase (Q15XH1)

(FGly-sulfatase). Elle présente la séquence consensus de 12 acides aminés (C/S-X-P-S/X-R-XXX-L/X-G/X-R/X) requise pour la conversion de la cystéine en résidu C α -Formylglycine (FGly) et les acides aminés catalytiques présents dans la séquence conservée G-Y/V-X-S/T-XXX-G-K-X-X-H (Figure 5). D'autres protéines étaient également présentes dans la fraction 60kDa telles que la protéine Q15PD3 correspondant à une chaperonine.

Un autre élément soutenant l'activité κ -carraghénane-sulfatase de la protéine Q15XH1 réside dans sa localisation génomique (Figure 6). En effet, le gène de la Q15XH1 (*PatL_0891*) se situe dans le même cluster de gènes que celui de la ι -carraghénane-sulfatase (Q15XH3) précédemment identifiée. Ce cluster inclut plusieurs gènes du cycle citrique (oxydation des sucres) et du métabolisme du D-galactose suggérant leur rôle dans la dégradation des carraghénanes.

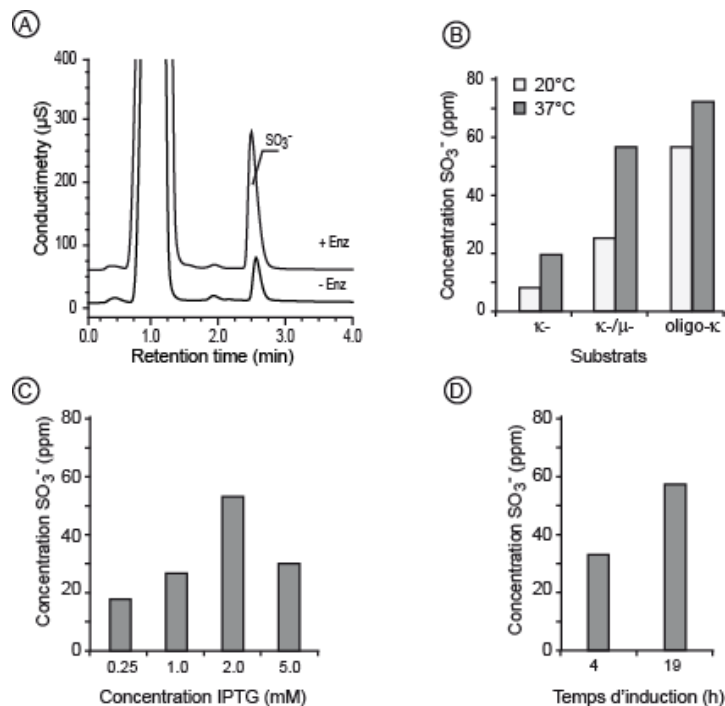


Figure 7 : A) Suivi par chromatographie échangeuse d’ions des ions sulfate (SO_3^-) libérés dans le milieu réactionnel au cours de l’incubation du κ -carraghénane avec (+Enz) ou sans κ -carraghénane sulfatase (-Enz). B-D) Concentration des ions sulfate libérés dans le milieu d’incubation en fonction des conditions température (B), de concentration d’IPTG (C) et de temps d’induction (D) des culture d’*E. coli*.

3-3) Optimisation des conditions d’expression de la κ -carraghénane sulfatase active.

Le gène de la κ -carraghénane-sulfatase a été cloné dans le plasmide PfO4 et exprimé dans *E. coli* BL21(DE3) selon les conditions décrites par Groisillier *et al.* (2010). Cependant, bien que *E. coli* puisse catalyser la modification post-traductionnelle de la cystéine du site actif en C α -formylglycine, les taux de modification sont généralement très faibles. Les conditions de culture et d’induction ont donc été optimisées pour la production d’enzyme active.

L’activité sulfatase a été mesurée par dosage de la concentration des ions sulfate présents dans le milieu d’incubation par chromatographie échangeuse d’anions (Figure 7A). L’activité κ -carraghénane-sulfatase est la plus abondante quand *E. coli* est cultivée à 37°C (Figure 7B). Cette activité est la plus forte sur les oligo- κ -carraghénanes, suivi par l’hybride κ -/ μ -carraghénane et le κ -carraghénane. Ceci s’explique par l’accessibilité de l’enzyme au substrat. La concentration d’IPTG de 2 mM et un temps d’induction de 19 h permettent d’obtenir les meilleures activités sulfatase. Les oligos présentent une meilleure réactivité que les polymères. Le κ -/ μ -carraghénane qui est peu gélifiant est plus désulfaté que le κ -carraghénane standard.

La resuspension du culot bactérien après culture, ainsi que la lyse des cellules ont été réalisées dans du tampon Tris-HCl 50mM additionné de 200mM NaCl. La force ionique utilisée était nécessaire à la solubilité de la protéine surexprimée.

La sulfatase recombinante active peut être fractionnée et reconcentrée par des étapes de filtration des extraits d’*E. coli*. Les extraits ont été filtrés après la lyse des cellules sur membrane de 100kDa. Le filtrat a été ensuite concentré sur membrane de 30kDa. Les seuils de coupure des membranes utilisés ont été sélectionnés par connaissance du poids moléculaire de la sulfatase de 63kDa.

4) Conclusions

- Nous avons identifié une nouvelle sulfatase capable de convertir du κ - en β -carraghénane. Elle se distingue des autres endo-carraghénane-sulfatases par la spécificité de la réaction. En effet, les endo-carraghénane-sulfatases connues convertissent le ι - en α -carraghénane.
- La protéine active peut être obtenue de façon recombinante selon un protocole optimisé. La protéine recombinante - comme la protéine native (extraite de *P. atlantica*) - catalyse la conversion des unités κ -carrabioses présentes dans les oligo- κ -carraghénanes, κ -/ μ -carraghénane et κ -carraghénane.
- Cette nouvelle enzyme permet de préparer des hybrides de κ -/ β -carraghénane dont la composition dépendra des conditions d'incubation. Ces carraghénanes sont des analogues du furcellaran qui est obtenu actuellement soit par extraction d'algues rouges, soit par désulfatation chimique du κ -carraghénane.

5) Matériel et Méthodes

5-1) Cultures bactériennes

La production de l'extrait bactérien contenant l'activité sulfatase est réalisée à partir de la bactérie marine *Pseudoalteromonas Atlantica* (souche ATCC T6c / BAA-1087) cultivée dans du milieu Zobell. Celui-ci est préparé à partir de Bacto peptone (*Amresco*) 5g/l, d'extraits de levure (BD, *Extract of Autolized Yeast cells*) 1g/l, de 800ml d'eau de mer filtrée, complété à 1 litre par de l'eau déminéralisée. Afin d'induire potentiellement une activité sulfatase active sur le iota carraghénane, les cultures ont été réalisées en présence de iota-carraghénane (H030058-534 - 2/3 *Eucheuma spinosum* - 1/3 *Eucheuma denticulatum*) à 1g/l.

La première préculture consiste à ensemencer 10 ml de milieu Zobell à partir d'un glycérol de *P. atlantica* conservé à -80°C . L'incubation est réalisée dans un agitateur de type New Brunswick pendant 36h à 18°C et 180 rpm. Pour la deuxième préculture, on ensemence 50 ml de milieu Zobell avec environ 1ml de la première préculture, de manière à avoir une absorbance de 0,1 à 660 nm. Cette deuxième préculture est incubée à 18°C jusqu'à ce que la densité optique atteigne une valeur de 1 à 1,2 à 660 nm, soit environ 8h. Pour la culture finale, 950 ml de milieu Zobell contenant du iota-carraghénane, est ensemencé avec les 50 ml de la deuxième préculture, et incubé à 18°C pendant 36h.

Afin de séparer le culot bactérien du surnageant de culture, les cultures bactériennes sont centrifugées à 6200 g pendant 20 minutes à 4°C .

5-2) Préparation de l'extrait bactérien

Le culot bactérien, contenant notre activité sulfatase, est resuspendu dans du tampon Tris (Sigma) HCl 50mM à pH 7,0. Les cellules sont ensuite lysées à la presse de French, et le lysat obtenu est ultra-centrifugé à 27 200 g pendant 2h45. On ajoute au surnageant obtenu un demi-comprimé d'anti-protéase (Complete, EDTA-free, Roche).

L'extrait, est ensuite dialysé (Spectra/Por, MWCO 6-8000Da) contre du tampon Tris-HCl 50mM à pH 7,0 pendant une nuit, sous agitation à 4°C .

5-3) Purification de la kappa-carraghénane-sulfatase

Les étapes de purification sont réalisées à l'aide d'un système Akta Purifier.

Le lysat bactérien dialysé (environ 35 ml filtré à $0,45\ \mu\text{m}$) est chargé à l'aide d'une superloop à un débit de 2 ml/min, sur une colonne d'affinité Héparine Fast Flow (HiPrep 20 ml, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,0. La résine est ensuite lavée avec ce même tampon jusqu'à obtenir une absorbance négligeable à 280 nm. L'élution des protéines est réalisée à un débit de 2,5 ml/min par un gradient croissant en NaCl de 0 à 1M en 20 volumes de colonne. Les fractions collectées sont de 3 ml et testées pour leur capacité à désulfater le κ -/ μ -

carraghénane. La majorité de la 4S-kappa-sulfatase est éluée entre 1h et 1h30 d'élution soit entre 400 et 600 mM NaCl.

Un pool de fractions contenant un maximum d'activité sulfatase pour un minimum d'absorbance est filtré (Cellule Amicon Bioséparations, *Millipore*) sur une membrane de 100 kDa puis concentré sur une autre de 30 kDa. Cet extrait, redilué dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5, est alors déposé à l'aide d'une superloop sur une colonne échangeuse d'anions forte Q Fast Flow (Hitrap 5 ml, *GE Healthcare*) préalablement équilibrée dans le même tampon. Après lavage de la résine, les protéines sont éluées avec un gradient croissant en NaCl de 0 à 1M en 20 volumes de colonne à un débit de 2 ml/min. Les fractions collectées, de 2,5 ml, sont incubées en présence de κ/μ -carraghénane pour mesurer l'activité sulfatase. Celle-ci est éluée dès les premières minutes d'élution entre 4 et 20 min, équivalent de 160 à 380 mM NaCl. Les fractions d'intérêt sont analysées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE.

5-4) Production de κ -carragénane sulfatase recombinante active

5-4a) Clonage du gène

La séquence du gène *Patl_0891* a été optimisée pour l'expression dans *E. coli* et synthétisée par GeneArt (Allemagne). Ce gène a ensuite été amplifié par PCR, *via* la synthèse d'oligonucléotides spécifiques (*Eurogentec*, Belgique). Les fragments PCR ont été purifiés à l'aide d'un kit « minielute RR » (*Qiagen*), puis digérés par les enzymes de restriction EcoRI et BamHI. Les produits de digestion ont alors été purifiés et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gènes amplifiés sont ligués dans le plasmide Pfo4. La transformation d'*E. coli* a ensuite été réalisée par choc thermique. Après la mise en culture des colonies, une PCR a été effectuée pour vérifier le succès des étapes de clonage et de transformation. Les plasmides recombinants Pfo4 ont ensuite été insérés dans la souche de surexpression BL21 (DE3) (*Novagen*, USA) d'*E. coli*.

5-4b) Conditions d'expression de la sulfatase dans *E. coli*

Les cultures ont été réalisées puis optimisées pour des volumes de 200 ml avant d'être effectuées à plus grande échelle. La première pré-culture consiste àensemencer 10 ml de milieu LB (10 g Tryptone (*Amresco*), 5g Yeast Extract (*Extract of Autolized Yeast cells*, *BD*) et 10 g NaCl (*Sigma*) dissous dans 1 litre d'eau osmosée) à partir d'un glycérol d'*E. coli* contenant la sulfatase. A cette pré-culture est ajouté de l'ampicilline 10% (1 μ l/ml) afin de maintenir le plasmide. L'incubation est réalisée dans un agitateur de type New Brunswick pendant une nuit à 37°C et 180 rpm. La culture est ensuite effectuée en inoculant 100 ml de milieu LB + ampicilline en Erlen de 1L, par 1 ml de la première pré-culture. La culture est alors incubée à 37°C durant 6h environ à 180 rpm, et la densité optique du milieu est suivie à 600 nm pour vérifier la prolifération de la bactérie. L'induction est ensuite effectuée en ajoutant à la culture 100 ml de milieu LB + ampicilline, et de l'IPTG pour une concentration finale de 2 mM. La culture est remise à incuber durant 19h à 180 rpm à 37°C.

Afin de séparer le culot bactérien du surnageant de culture, les cultures bactériennes sont centrifugées à 6200 g pendant 25 min à 4°C.

5-4c) Préparation de l'extrait bactérien

Le culot bactérien, contenant la sulfatase surexprimée, est resuspendu dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), NaCl 200 mM et ¼ de comprimé d'antiprotéase (*Complete, EDTA-Free, Roche*). Les cellules sont ensuite lysées à la presse de French, et les extraits obtenus ultracentrifugés à 46 500 g pendant 2h environ.

Les extraits de sulfatases surexprimées dans *E. coli* sont fractionnés par filtration sur membrane (Cellule Amicon Bioséparations, *Millipore*) *via* une ultrafiltration sur 100 kDa (dilution 5 avec le tampon de dialyse). Le filtrat récolté est ensuite reconcentré sur une membrane de 30 kDa.

5-4) Caractérisation de l'activité sulfatase

5-4a) Réaction de désulfatation

50 µl de l'extrait bactérien sont mis en présence de 50 µl d'une solution de substrat (oligo-carraghénane ou carraghénane) à 0,5% (p/v) dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5. A ce mélange est ajouté 10 µl de CaCl₂, connu pour favoriser l'activité des sulfatases à formylglycine. Les milieux réactionnels sont alors incubés à 30°C en bain-marie pendant une nuit. Pour chaque échantillon, un blanc est effectué dans des conditions similaires en ayant préalablement inactivé l'extrait enzymatique à 100°C durant une quinzaine de minutes.

5-4b) Dosage du sulfate libéré

Les milieux réactionnels sont dilués par 2 avec de l'eau milliQ (Millipore) puis centrifugés en microcons (Amicon) avec un seuil de coupure à 10kD. Cette centrifugation est réalisée à 3300 g pendant 90min à température ambiante. Le filtrat obtenu est ensuite dosé par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC : *High performance anion exchange chromatography*) sur un système Dionex. 20µl d'échantillon sont injectés grâce à un injecteur automatique (AS3000, Thermo). La séparation des anions présents dans les échantillons est effectuée grâce à une colonne Ion-Pac AS11 (4x200mm, Dionex) munie d'une pré-colonne AG-11 (4x50mm, Dionex). Le système est équilibré en NaOH 12mM. L'élution est réalisée par un gradient isocratique en NaOH à un débit de 1ml/min (pompe GP40, Dionex). La détection des anions se fait par conductimétrie avec un détecteur ED40 (Dionex) muni d'un supprimeur ASRS ultra-II-4mm (Dionex) fonctionnant à un courant de 198mA. Le logiciel utilisé pour l'acquisition et le traitement des données est le logiciel Chroméléon 6.8. Grâce à une courbe étalon, l'aire des pics de sulfate est convertie en parties par million (ppm). La différence entre la valeur de l'échantillon et celle du blanc donne la quantité de sulfate libéré en ppm lors de la réaction enzymatique de désulfatation.

5-4c) Analyse par RMN du proton

La position du groupement sulfate clivé et donc l'identification du produit formé lors de l'hydrolyse enzymatique, est réalisée par RMN. Pour cette analyse, les réactions de désulfatation sont faites en incubant 700µl de substrat (carraghénane ou oligo-carraghénane) à 1% (w/v) en présence de 300µl d'extrait bactérien. Les mélanges réactionnels sont incubés à 30°C en bain-marie durant 72h puis lyophilisés. Les échantillons sont alors échangés deux fois dans du D₂O puis redissous dans 700µl de D₂O à 99,97% pour être à une concentration approximative de 10 mg/ml. Les spectres ¹H-RMN sont enregistrés à 70°C sur un spectrophotomètre BRUKER Avance DRX 500 par le service RMN (Université de Bretagne Occidentale, Brest). Les protons anomériques des carraghénanes présentent des déplacements chimiques (δ) caractéristiques compris entre 5 et 5,6 ppm environ.

Références

- D. Seisum (2011) Overview of the Food Hydrocolloids Market . *Gums and Stabilisers for the Food Industry* 16, 1-8
- Greer C, Yaphe W. (1984a) Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* agardh,j. (rhodophyta, solieriaceae) using carrageenases, infrared and ¹³C-nuclear magnetic-resonance spectroscopy. *Bot Mar* 27: 473-478
- G. Correc, A. Barabanova, R. Tuvikene, K. Truus, I. Yermak and W. Helbert, Comparison of the structures of hybrid κ-/β-carrageenans extracted from *Furcellaria lumbricalis* and *Tichocarpus crinitus*. *Carbohydr. Polym.* (2012) 88, 31-36
- E. Bjerre-Petersen, J. Christensen, P. Hemmingsen (1973) Furcellaran. R.L. Whistler, J.N. BeMiller (Eds.), *Industrial Gum*, Academic Press, New York, pp. 123-136
- W. Zhang, L. Piculell, S. Nilsson and S. Knutsen (1994) Cation specific and cation binding to low sulfated carrageenans. *Carbohydr. Polym.* 23, 105-110.
- A. I. Usov (2011) Polysaccharides of the red algae. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 65, 115-217.

- McLean MW, Williamson FB. 1979. Glycosulfatase from *Pseudomonas carrageenovora* - purification and some properties. *Eur J Biochem* 101: 497- 505.
- Weigl J, Yaphe W. 1966. Glycosulfatase of *Pseudomonas carrageenovora*: desulfation of disaccharide from κ -carrageenan. *Can J Microbiol* 12: 874-876.
- A. Préchoux, S. Genicot-Joncour, W. Helbert. Procédé de transformation du iota-carraghénane en alpha-carraghénane à l'aide d'une nouvelle classe de 4S-iota-carraghénane sulfatase. *Dépôt 15 octobre 2010, FR 10/58420. Extension internationale le 17 octobre 2011, PCT/FR2011/052421*
- S. Genicot-Joncour and W. Helbert. 4S-iota-carraghénane sulfatase et son utilisation pour l'obtention de l'alpha-carraghénane. *Dépôt 22 Avril 2009, FR 09/52642. Extension internationale le 22 avril 2010, PCT/EP2010/055395*
- Groisillier A, Hervé C, Jeudy A, Rebuffet E, Pluchon PF, Chevolot Y, Flament D, Geslin C, Morgado IM, Power D, Branno M, Moreau H, Michel G, Boyen C, Czjzek M. 2010. MARINE-EXPRESS: taking advantage of high throughput cloning and expression strategies for the post-genomic analysis of marine organisms. *Microbial Cell Factories* 9: 45-56.

Controlling Carrageenan Structure Using a Novel Formylglycine-Dependent Sulfatase, an Endo-4S-iota-Carrageenan Sulfatase

Aurélie Préchoux · Sabine Genicot · Hélène Rogniaux · William Helbert

Received: 24 March 2012 / Accepted: 3 August 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract Carrageenans are sulfated polysaccharides that are found in the cell walls of red algae. These polysaccharides have gelling and texturizing properties that are widely appreciated in industrial applications. However, these functional properties depend strongly on the sulfation of the moieties of the carrabiose repetition unit. Here we aimed to monitor the sulfate composition of gelling carrageenan. To do so, we screened and purified from *Pseudoalteromonas atlantica* a 4S-iota carrageenan sulfatase that converts ι -carrabiose into α -carrabiose units. The sequence of this protein matched the annotated Q15XH3 (Uniprot databank) formylglycine-dependent sulfatase found in the *P. atlantica* genome. With pure enzyme, ι -carrageenan could be transformed into a hybrid ι -/ α -carrageenan or pure α -carrageenan. Analysis of the distribution of the carrabiose moieties in hybrid carrageenan chain

using enzymatic degradation with *Alteromonas fortis* ι -carrageenase, coupled with chromatography and NMR spectroscopy experiments, showed that the sulfatase has an endo mode of action. The endo-character and the specificity of the sulfatase made it possible to prepare hybrid κ -/ ι -/ α -carrageenan and κ -/ α -carrageenan starting from κ -/ ι -carrageenan.

Keywords Carrageenan · Sulfatase · Biotransformation · Endo mode of action

Introduction

Carrageenans refer to a class of sulfated galactans found in the cell wall of numerous red algae (Rhodophyta) (Craigie 1990; Usov 2011). These polysaccharides have a linear backbone of D-galactose alternately linked by α (1,3) and β (1,4) glycosidic linkages; the disaccharide repetition moieties—called carrabiose moieties—are classified according to substitutions that occur on the free hydroxyl groups (Rees 1969; Usov 1998; Knutsen et al. 1994). These substitutions are generally an ester sulfate (S) or a 3,6-anhydro-ring (DA) on the 4-linked residue (Fig. 1). Other substitutions, such as methyl (M) or pyruvate (P) groups, have also been observed, thereby increasing the number of possible carrabiose structures. The diversity of carrageenans is explained in part by the diversity of possible carrabiose structures but mainly by the co-occurrence of various carrabiose units in a given polysaccharide giving rise to hybrid—or copolymer—structures.

The diversity of carrageenan structures, which depends on the algal source, growth conditions, and the extraction procedure, offers a wide range of functional properties that have numerous applications in the food industry (Therkelsen 1993; Bixler and Porse 2011). For example, κ -carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* makes strong gels in the presence of

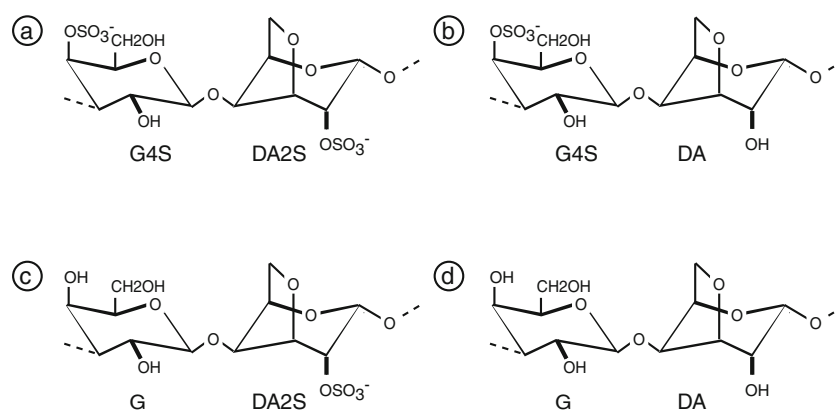
A. Préchoux · S. Genicot · W. Helbert (✉)
Centre National de la Recherche Scientifique,
Université Pierre et Marie Curie-Paris 6,
Unité Mixte de Recherche 7139 “Marine Plants
and Biomolecules”, Station Biologique,
29682 Roscoff Cedex, France
e-mail: william.helbert@cermav.cnrs.fr

H. Rogniaux
Plate-forme Biopolymères Biologie Structurale,
UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages,
Institut National de la Recherche Agronomique,
Rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes, France

Present Address:

W. Helbert
Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales
(CERMAV, UPR-CNRS 5301), Université Joseph Fourier (UJF),
Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble
(ICMG, FR-CNRS 2607),
BP53, 38041 Grenoble Cedex 9, France

Fig. 1 Structure of the repetition unit of **a** ι -(iota)-carrageenan (DA2S–G4S), **b** κ -(kappa)-carrageenan (DA–G4S), **c** α -(alpha)-carrageenan (DA2S–G), and **d** β -(beta)-carrageenan (DA–G)



potassium, while ι -carrageenan from *Eucheuma denticulatum* is used to form elastic gels in the presence of calcium. Between these two extreme carrageenan structures, there is a gradient of carrabiose composition in hybrid κ -/ ι -carrageenans, ranging from κ -carrabiose- to ι -carrabiose-rich polysaccharides (see Stancioff diagram in Bixler et al. (2001)). Recent studies of carrageenan hybridity have been facilitated by the use of carrageenan-degrading enzymes (i.e., carrageenases) because the resulting degradation products reflect the structure of carrageenan (Guibet et al. 2008; Jouanneau et al. 2010a, 2011). These investigations highlight that not only carrabiose composition but also their distribution along the polysaccharide chain can explain the differences in carrageenan functional properties. In this context, routine methods are being developed to better characterize carrageenan structures, with the goal of predicting the functional properties of a given carrageenan.

In practical terms, carrageenan sources are selected according to their abundance and their functional properties; however, another approach involves controlling carrageenan synthesis to ensure that the required physico-chemical properties are obtained. The molecular mass, the occurrence of anhydrogalactose, and sulfate decoration of the galactan chain are the main structural parameters affecting the physico-chemical properties of carrageenans. During biosynthesis, the addition of sulfate and the formation of anhydrogalactose are catalyzed in algae by sulfotransferases and galactose-6-sulfurylases, respectively (Craigie 1990). Galactose-6-sulfurylases catalyze the formation of the anhydro-ring specifically in μ - and ν -carrabiose to form κ - and ι -carrabiose, respectively (Wong and Craigie 1978; Zinoun et al. 1997; Genicot-Joncour et al. 2009). Similar to the alkaline conversion used in industry, these enzymes improve the gelling properties of carrageenan. The biodegradation of carrageenan involves carrageenases which cleave the glycosidic bond and sulfatases which catalyze the removal of sulfate (Michel et al. 2006). Weigl and Yaphe (1966) and then McLean and Williamson (1979, 1981) demonstrated the occurrence of enzymes capable of desulfating neo- κ -carratetraose and neo-

κ -carrabiose, the main end-products of κ -carrageenase. Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis of these end-products showed that the sulfatases were exo-enzymes acting at the non-reducing end of the oligosaccharides, releasing a neutral disaccharide which was further degraded by a specific glycoside hydrolase (McLean and Williamson 1979, 1981). These observations suggest that carrageenan is degraded sequentially and sulfatases act on the resulting low molecular weight oligo-carrageenans. From a biotechnological point of view, the desulfation of oligo-carrageenans is of little interest because carrageenan loses its gelling properties with the decrease of molecular weight. However, sulfatases may be useful for carrying out an analysis of fine-scale oligo-carrageenan structure. In this context, we re-investigated the desulfation of carrageenan in its polymeric form and discovered an endo-acting sulfatase.

Experimental

Screening and Purification of the 4S-Carrageenan Sulfatase from *P. atlantica*

Pseudomonas atlantica T6c (strain ATCC T6c / BAA-1087) was grown in 1 L ZoBell medium (ZoBell 1941) containing 0.1 % (w/v) of κ -, ι -, or λ -carrageenan kindly provided by Danisco (Brabrand, Denmark). The cultures were kept at 20 °C for 48 h under agitation of 180 rpm (New Brunswick incubator). The cultures were centrifuged at 6,200 $\times g$ for 20 min at 4 °C. For screening experiments, both the pellet and the supernatant were reserved for further analysis.

Culture supernatants were concentrated by precipitation with 90 % ammonium sulfate saturation. Precipitates were recovered by centrifugation (12,000 $\times g$, 35 min, 4 °C) and were re-solubilized in 10 mL buffer A (50 mM Tris–HCl buffer, pH 8.3) containing one half of an antiprotease tablet (Complete, EDTA-free). The supernatants were dialyzed overnight (Spectra/Por MWCO 3,500 Da) against buffer A at 4 °C to remove small molecules, particularly any sulfate-

free ions. The bacterial pellets were resuspended in 10 mL of buffer A (50 mM Tris–HCl buffer pH 8.3) containing one half of an antiprotease tablet (Complete, EDTA-free). Cells were lysed in a French press and ultracentrifuged at $27,200\times g$ for about 2.5 h. The supernatants were then dialyzed against buffer A as for the concentrated culture supernatant.

4S-iota-Carrageenan sulfatase was purified from bacterial pellets obtained after centrifugation of *P. atlantica* grown in the presence of ι -carrageenan. The protein extracts were prepared as described earlier for the screening using buffer B instead (50 mM Tris HCl, pH 7.5). The dialyzed sample (about 30 mL) was filtered through a 0.45- μm membrane and loaded onto 40 mL DEAE Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare) equilibrated with buffer B. Elution was conducted at 20 °C at a flow rate of 2 mLmin⁻¹ with 1-M NaCl step gradient (0–200 min: 0–0.5 M NaCl; 200–240 min: 0.5–1 M NaCl). The fractions eluting between 50 to 110 min elution time (150–250 mM NaCl) contained the maximum carrageenan sulfatase activity and were collected. After dialysis (3,500 Da, Spectra/Por membrane) for 24 h against buffer B, the sample was loaded on 5 mL Q Fast Flow (GE Healthcare) equilibrated with buffer B. Elution was performed at a flow rate of 1 mLmin⁻¹ with 1-M NaCl step gradient (0–75 min: 0–0.5 M NaCl; 75–100 min: 0.5–1 M NaCl). Sulfatase activity was observed between 4 and 12.5 min of elution time. The purity of the fractions was visualized by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) stained with colloidal Coomassie Blue. The pure protein was obtained for an elution corresponding to 90 mM NaCl.

Peptide Sequencing

The protein band was excised from the colloidal Coomassie Blue-stained SDS-PAGE and was subjected to in-gel tryptic digestion as described in Larre et al. (2010). Briefly, the gel slice was washed with 100 μL of NH_4HCO_3 (25 mM), followed by dehydration with 50 % (v/v) acetonitrile (100 μL) in NH_4HCO_3 (25 mM). Proteins were reduced and alkylated by incubation for 1 h at 57 °C in the presence of 10 mM DTT followed by 45 min of incubation at room temperature with iodoacetamide (55 mM). The gel slice was further washed with NH_4HCO_3 and dehydrated as described previously. Then, the band was incubated with 10 μL of trypsin (sequencing grade, Promega) solubilized at 12.5 ng μL^{-1} in NH_4HCO_3 (25 mM). The reaction was conducted overnight at 37 °C. The supernatant was collected and the tryptic fragments were analyzed by nanoscale capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS).

LC–MS/MS analysis was performed using a nanoflow HPLC system (Switchos-Ultimate II, Dionex) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight

mass spectrometer (Q-TOF Global, Waters). Chromatographic separations were conducted on a reverse-phase capillary column (75 μm i.d., Pepmap C18, Dionex) at a flow rate of 200 nLmin⁻¹ using a gradient ranging from 2 to 50 % of 0.08 % (w/v) formic acid in acetonitrile. Mass data were recorded in the “data-dependent” mode: one MS spectrum was recorded on the mass-to-charge ratio range 400 to 1,500 within 1 s, after which the three most intense ions were selected and fragmented in the collision cell. Raw data obtained by MALDI-TOF or LC–MS/MS were processed using the Protein Lynx Global Server v. 2.1 software (Waters) and further searched against databanks using MASCOT Server 2.2 (Matrix Science). Protein identification was achieved by confronting mass data (MS and MS/MS spectra) with the UniProt databank (release 2010_04, March 2010). Fixed modification of cysteine residues by iodoacetamide was considered, as well as oxidized methionine as a dynamic modification. Databank searches included one missed trypsin cleavage and a mass tolerance for parent ion masses of 0.015 % (0.3 Da for fragment ions). Peptide hits to protein sequences were considered valid when their individual MASCOT scores were greater than 51 (this threshold corresponded to $p < 0.05$ in the MASCOT software).

Cloning and Heterologous Expression of the Carrageenan Sulfatase

The gene designated as Patl_0889 (GenBank accession number ABG39415), which corresponds to protein Q15XH3 (UniProt database), was optimized and synthesized by Geneart (Regensburg, Germany). The gene was amplified using a forward primer (5'-CCGGGGATCCGATGCAGGTCAGAGCAAA-3', *Bam*HI restriction site underlined) and a reverse primer (5'-GGCCGAATTCTTAATGGCCTTTTTTGCTATT-3', *Eco*RI restriction site italicized). The gene was cloned into a pFO4 expression vector and included an N-terminal fused to a six-histidine tag (Groisillier et al. 2010). The transformed *Escherichia coli* strain BL21(DE3) was grown in Luria–Bertani broth and protein expression was induced for 18 h at 20 °C with lactose (0.6 %) and isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (1 mM).

Enzymology

Temperature optimum was determined using four volumes of 1 % (w/v) ι -carrageenan in 50 mM Tris–HCl, pH 7.5, with 1 volume of purified native sulfatase. The pH optimum was determined for pH values ranging from 5.5 to 9.5 using MES buffer (pH 5.5 at 6.5), Tris–HCl buffer (pH 7 to 9), and bis-Tris propane buffer (pH 6.5 to 9.5) at 34 °C for 8 h. The effect of NaCl was tested by adding an increasing amount

of NaCl in the incubation medium. Attempts to estimate Michaelis parameters (K_m and V_m) desulfation kinetics were undertaken with the following concentrations of ι -carrageenan: 0.0008, 0.0024, 0.008, 0.08, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 % w/v. Calculations were done using concentrations of ι -carrabiose units instead of the carrageenan concentration (1 % w/v ι -carrageenan corresponds to 22 mM ι -carrabiose moieties). Incubations were conducted in the presence of purified native sulfatase at 34 °C, and initial velocity was measured on the linear section of the kinetics plot.

The concentration of free sulfate occurring in the incubation medium was measured by HPAEC according to Genicot-Joncour et al. (2009). The anions were separated on an AS11 anion-exchange column (4×200 mm; Dionex) and an AG11 guard column (4×50 mm; Dionex) mounted in series. Elution was performed with NaOH (12 mM) using an isocratic flow rate of 1 mL min⁻¹ (GP40 gradient pump, Dionex). The released sulfate groups were detected with the ED40 electrochemical detector (Dionex) in conductivity mode. The peak of sulfate eluted separately from other ions at about 3 min and the sulfate concentration was deduced using the standard curve for sulfate.

Preparation and Purification of Hybrid oligo- ι -/ α -Carrageenans

Hybrid ι -/ α -carrageenan (0.5 % w/v in 0.15 M Tris-HCl, pH 8.0) was incubated with an aliquot of recombinant with *Alteromonas fortis* ι -carrageenase according to Jouanneau et al. (2010b). These incubation conditions led to the complete degradation of the hybrid carrageenan which was characterized by no modification of the size-exclusion chromatogram and the absence of measurable reducing ends after a second addition of fresh enzyme.

The fractionation of hybrid oligo- ι -/ α -carrageenans was performed by size-exclusion chromatography according to Guibet et al. (2008). Briefly, 5 mL of oligosaccharide mixtures (5 % w/v) were filtered (0.22 μ m, Millipore) and were injected on three Pharmacia Superdex 30 prep-grade columns (600×26 mm i.d.) mounted in series. The elution was conducted at a flow rate of 1 mL min⁻¹ (P-500 pump, Amersham Biosciences) at 20 °C using 100 mM (NH₄)₂CO₃ as the eluent. Oligosaccharides were detected by differential refractometry (Spectra System RI-50, Thermo Separation products). Standard DP4 and DP6 oligo- ι -carrageenan were detected at 665 and 585 min, respectively; the other signals were attributed to hybrid oligo- ι -/ α -carrageenans. The purified oligosaccharides were freeze-dried and stored at 4 °C.

¹H NMR

The carrageenans incubated with purified sulfatase or bacterial extracts were freeze-dried, exchanged twice with

99.97 at.% 2H₂O and then dissolved in D₂O at 10 mg mL⁻¹. The product was then transferred into a 5-mm NMR tube and ¹H NMR spectra were recorded at 70 °C using a BRUKER Advance DRX 500 spectrometer equipped with an indirect 5-mm gradient probehead TXI ¹H/¹³C/³¹P. Chemical shifts are expressed in ppm in reference to trimethylsilylpropionic acid which was used as an external standard. No suppression of the HOD signal was performed.

Results

Purification of ι -Carrageenan Sulfatase from *P. atlantica*

P. atlantica was grown in the presence of different carrageenans because we assumed that this would help them induce enzymes involved in carrageenan biodegradation. Culture supernatant and bacterial pellet were assayed on κ -, ι -, and λ -carrageenans to screen for sulfatase activity (Table 1). When κ - and λ -carrageenans were present in the culture medium, a low amount of sulfate was detected against ι -carrageenan in the bacterial pellet (46.8 and 37.8 μ M under induction with κ - and λ -carrageenan, respectively) and no activity was detected in the supernatant. In contrast, when ι -carrageenan was used as the inducer in the culture medium, high ι -carrageenan sulfatase activity was measured in the supernatant (409.3 μ M) and in bacterial pellets (840.5 μ M).

Purification of ι -carrageenan sulfatase was conducted on the bacterial pellet instead of the supernatant because pellets displayed a higher level of activity and no additional concentration of the protein extracts was necessary. The sulfatase was purified by two anion chromatography separations, starting with DEAE sepharose column followed by a Q-sepharose column. Ultimately, the most active fractions obtained were loaded onto a SDS-PAGE and the pure protein migrated as a single band (Fig. 2). The band was excised and hydrolyzed with trypsin, and the released

Table 1 Amount of sulfate released during the incubation of various carrageenans with *P. atlantica* extracts. The bacterial strain was grown in the presence of ι -, κ -, or λ -carrageenan. Sulfate concentrations are expressed in μ M

| | Induction | Substrates | | |
|-------------|-----------|------------|-------|--------|
| | | Kappa | Iota | Lambda |
| Supernatant | Kappa | 2.3 | 0 | 0.42 |
| | Iota | 14.1 | 409.3 | 13.1 |
| | Lambda | 2.70 | 33.7 | 7.7 |
| Pellet | Kappa | 0.4 | 35.4 | 0.83 |
| | Iota | 46.8 | 840.5 | 37.8 |
| | Lambda | 3.7 | 134.2 | 0.42 |

1 ppm = 10.4 μ M

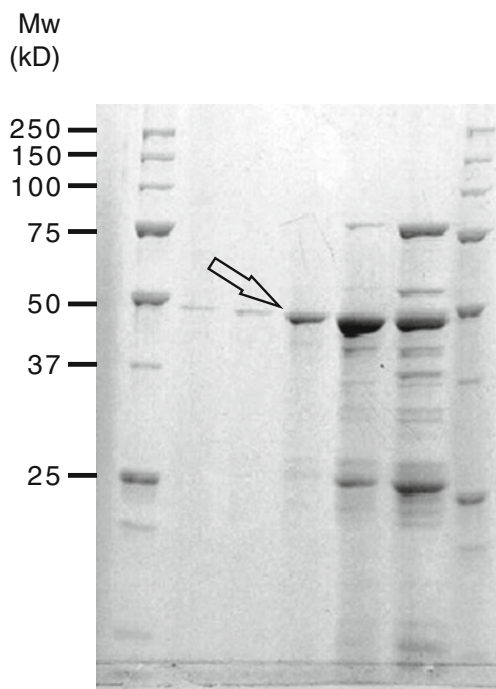


Fig. 2 SDS-PAGE of a series of fractions collected after anion exchange chromatography containing the carrageenan sulfatase activity. The arrow indicates the band corresponding to the carrageenan sulfatase

peptides underwent mass spectrometry measurements. Three peptides (FDQTFQVGDNTR, ETEYITDGLSR, and NGQFDNTVIVFTSDNNGGK) exactly matched the sequence referenced as protein Q15XH3 in the UniProt databank, annotated as sulfatase from the genome of a T6c strain of *P. atlantica*. This sulfatase belongs to the class of formylglycine-dependent sulfatases, characterized by a cysteine included in a sequence signature of 12 amino acids C-X-P-X-R-X-X-X-L/X-T/X-G/X-R/X mandatory for the post-translational modification of cysteine. A second consensus sequence (G-Y/V-X-S/T-X-X-X-G-K-X-X-H) found in this class of sulfatases and attributed to the binding of metal ions important for catalysis was also present (Dierks et al. 1997; Hanson et al. 2004). The gene Patl_0889 (corresponding to protein Q15XH3) was cloned and successfully overexpressed in *E. coli* BL21(DE3). The protein was soluble and significantly active toward ι -carrageenan, thereby validating the function of the Patl_0889 gene. However, despite the large amount of soluble protein, the carrageenan sulfatase activity was low compared to that of the *P. atlantica*-purified protein, suggesting that only a small fraction of the cysteine or only a low fraction of the overexpressed protein had been matured in the overexpressed protein. Various conditions of culture and induction were tested, but the recombinant ι -carrageenan sulfatase activity was always weaker than that of the native protein.

Enzymology of the 4S-Carrageenan Sulfatase

Characterization of the 4S-carrageenan sulfatase was conducted using the purified enzyme from *P. atlantica* T6c. Kinetics of desulfation were monitored by HPAEC as illustrated in Fig. 3. The peak corresponding to sulfate release during incubation was detected at about 3.85 min of elution time. When no desulfation occurs, the peak was absent; otherwise, the peak increased with increasing amounts of desulfation. Using standard curves, the signal intensity was converted into moles of released sulfate and is plotted in Fig. 3b. The rate of desulfation was linear for the first few hours, which made it possible to calculate initial velocity. The pH and temperature optima were determined to be pH 7.5 and 34 °C, respectively. The Michaelis parameters were also estimated ($K_m=3.02 \mu\text{M}$, $V_m=1.95 \mu\text{M s}^{-1}$); however, these data have to be taken with caution because we assumed that all cysteines of the purified sulfatase had been matured into formylglycine by *P. atlantica* and also because the physico-chemical properties of the polymeric substrate was modified during the desulfation process.

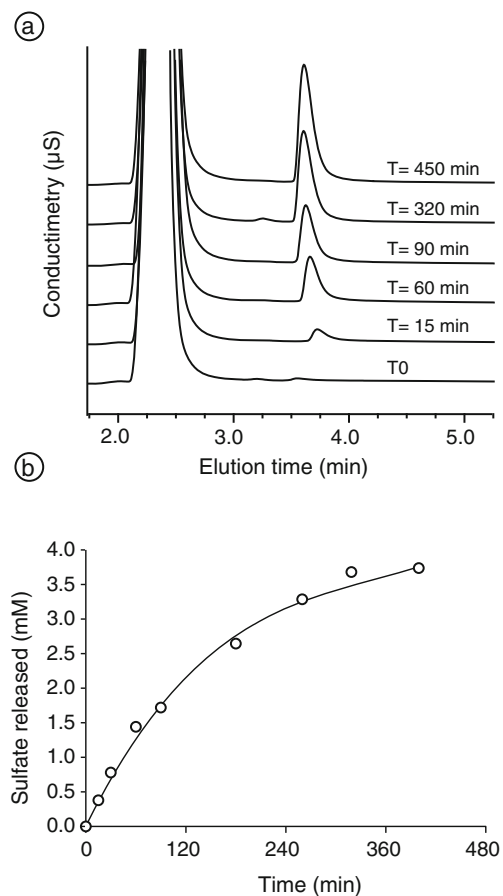


Fig. 3 Desulfation kinetics. **a** Anion exchange chromatogram of sulfate released in the medium during incubation of ι -carrageenan with the purified ι -carrageenan sulfatase. **b** The intensity of the peaks was converted to molar concentrations and plotted with respect to time

Fig. 4 ^1H NMR of ι -carrageenan (*top*) incubated with ι -carrageenan sulfatase leads to the production of pure α -carrageenan (*bottom*). The intermediate structures (*middle*) are hybrid ι/α -carrageenans whose composition was deduced by integrating the α -anomeric signal of DA2S-H1 (ι) or (α) as indicated on the spectra

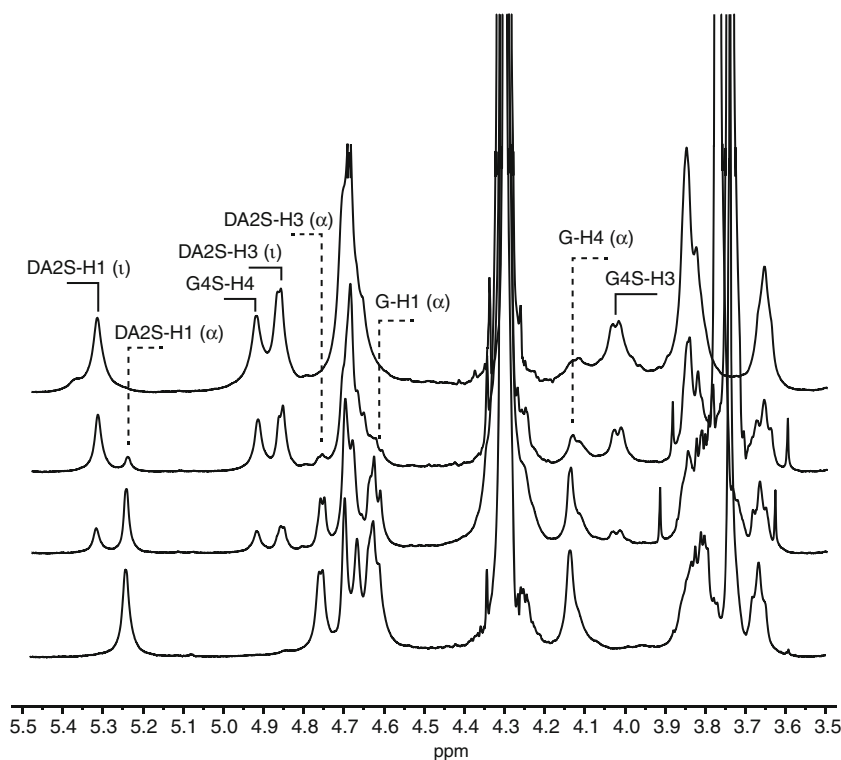


Figure 4 shows the kinetics of ι -carrageenan desulfation with the purified sulfatase as monitored by ^1H NMR. The attribution of the ^1H NMR spectrum of ι -carrageenan (Fig. 4) was based on previous analyses (van de Velde et al. 2002) and showed characteristic signals, such as the α -anomeric proton of the sulfated anhydrogalactose (D2S-H1) at 5.31 ppm. The G4S-H4 and DA2S-H3 protons resonating at 4.91 and 4.85 ppm, respectively, are also indicated on the spectrum. During incubation, the signal attributed to ι -carrageenan decreased and, in particular, new signals at 5.23 and 4.75 ppm appeared. After prolonged incubation, the initial ι -carrageenan spectrum was replaced by a completely different ^1H NMR spectrum.

Enzymatic depolymerization of ι -carrageenan cannot explain this NMR spectrum because new signals corresponding to reducing and non-reducing ends were not observed. For example, the α -anomeric proton located at the reducing end of oligo- ι -carrageenan (G4S α -H1) has been reported to show a signal at 5.32 ppm, but this was absent on our spectra. The loss of one sulfate group per ι -carrabiose unit results in the formation of either κ - or α -carrabiose moieties (Fig. 1). The loss of two sulfate groups per repetition unit must lead to a neutral β -carrageenan. The ^1H NMR behaviors of κ - and β -carrageenans are well documented (van de Velde et al. 2002; Correc et al. 2012) and the characteristic ^1H NMR signals corresponding to the neutral anhydrogalactose were not observed in the present case (DA-H1: 5.1 ppm in κ -carrageenan and 5.09 ppm in β -carrageenan). The observed ^1H NMR spectrum likely corresponded to that of an α -carrageenan for

which signals could be straightforwardly assigned based on previous work (Falshaw et al. 1996). In particular, the α -anomeric proton DA2S-H1 was easily identified at 5.23 ppm as well as other characteristic protons that are indicated in Fig. 4 (DAS2S-H3, G-H1, G-H4).

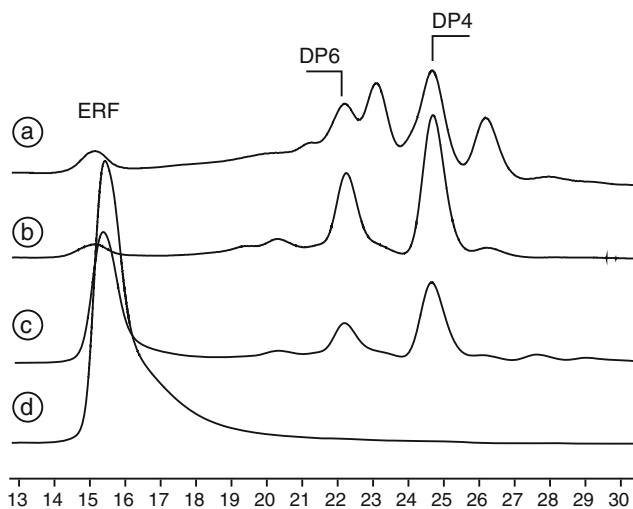


Fig. 5 Size-exclusion chromatography recorded after digestion of the carrageenan by *A. fortis* ι -carrageenase. *A* hybrid ι/α -carrageenan, *B* ι -carrageenan, *C* mixture of standard ι -carrageenan with completely converted α -carrageenan, and *D* α -carrageenan. *DP6* and *DP4* neo- ι -carrhexaose and neo- ι -carrtetraose, respectively. *ERF* enzyme-resistant fraction

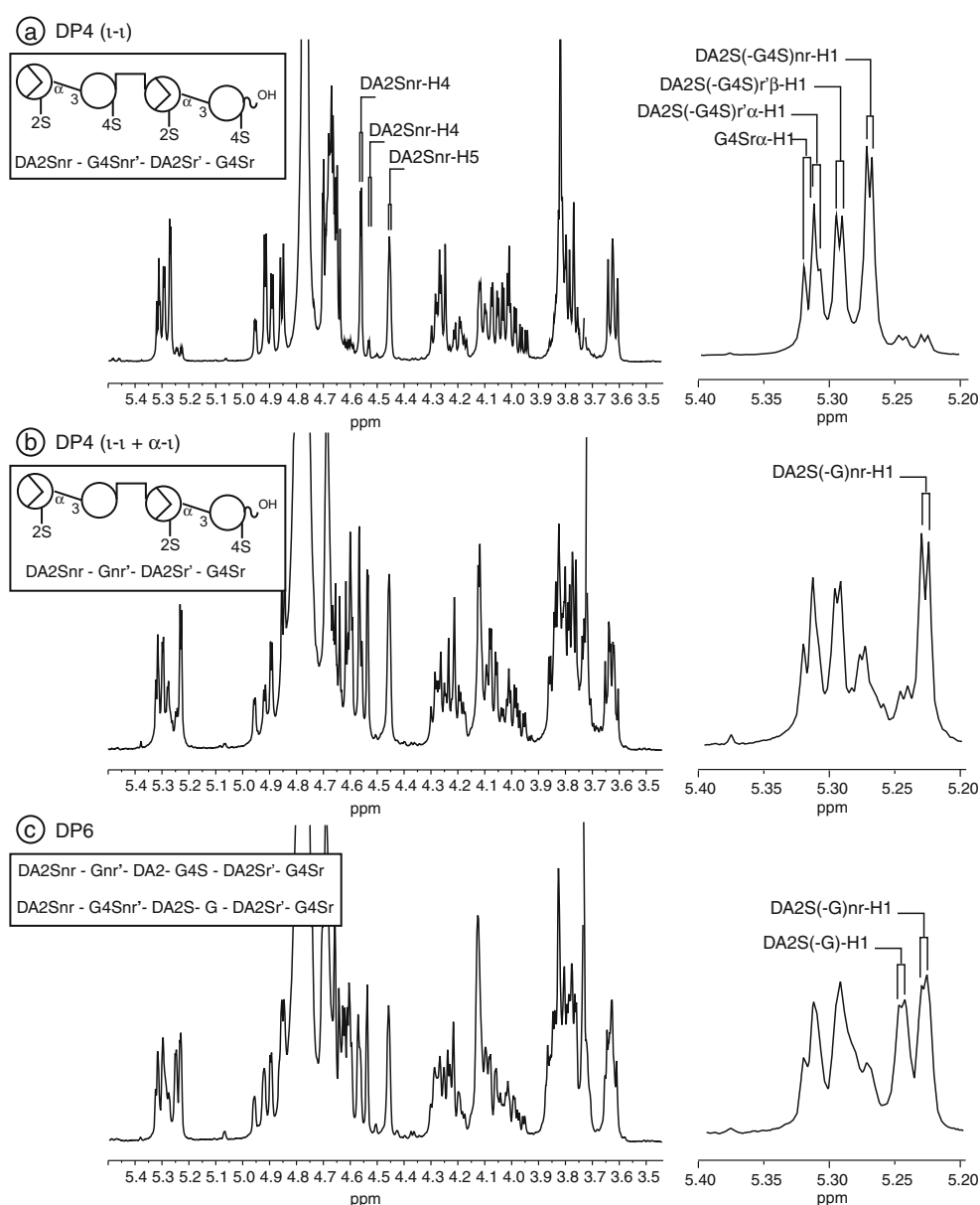
Mode of Action

When ι -carrageenan was incubated with *A. fortis* ι -carrageenase, the degradation products were composed mainly of two oligosaccharides: neo- ι -carratetraose (DP4) and neo- ι -carrahexaose (DP6) (Fig. 5 (B)). The small enzyme-resistant fraction was mainly composed of hybrid κ -/ ι - carrageenan as detailed by Jouanneau et al. (2010b). Pure α -carrageenan was prepared by prolonged enzymatic desulfation of ι -carrageenan and was not degraded by the *A. fortis* ι -carrageenase (Fig. 5 (D)). Therefore, degradation of a mixture of pure ι - and α -carrageenan (50:50) leads to the production of standard oligo- ι -carrageenan and of a resistant fraction corresponding to undigested α -carrageenan (Fig. 5 (C)). Hybrid ι -/ α -carrageenan (60:40 mol/mol) was completely digested by ι -

carrageenase as attested by the low amount of enzyme-resistant fraction (Fig. 5 (A)). Peaks eluting similarly to the standard ι -carrageenan oligosaccharides (DP4, DP6) were observed in the chromatogram. Additionally, two intense peaks, likely corresponding to hybrid ι -/ α -oligo-carrageenans, were purified and characterized by ^1H NMR.

The ^1H NMR spectrum of the smallest oligosaccharides eluting at 27 min is presented in Fig. 6. The integration and the chemical shifts of the signals detected in the region of the anomeric signals (5.1–5.4 ppm) suggest a tetrasaccharide having one ι -carrabiose moiety at the reducing end and one α -carrabiose moiety at the non-reducing end (α - ι : DA2S–G–DA2S–G4S). Three signals had the same chemical shift as that measured for the neo- ι -carratetraose: G4Sr α (5.33 ppm), DA2Sr' α (5.15 ppm), and DA2Sr' β

Fig. 6 ^1H NMR of purified hybrid oligo- α -carrageenans were compared with **a** neo- ι -carratetraose (DP4: ι - ι). **b** Hybrid ι -/ α -tetrasaccharide (α - ι) weakly contaminated by standard oligo- ι -tetrasaccharide. **c** Mixtures of hybrid ι -/ α -hexasaccharides (α - ι - ι and ι - α - ι). On the *right*, enlargement of the spectra corresponding to the α -anomeric protons of carrageenans



(5.29 ppm), giving support to the localization of a ι -carrabiose moiety at the reducing end. However, in contrast with standard oligo- ι -carrageenan, the signal corresponding to the sulfated anhydrogalactose (DA2S-H1, 5.29 ppm) linked to sulfated galactose (G4S) and located at the non-reducing end was very weak. It was replaced by a signal that we ascribed to anhydrogalactose (DA2S-H1, 5.23 ppm) linked to a neutral galactose encountered in the α -carrabiose moiety.

The ^1H NMR spectrum of the second oligo- ι -/ α -carrageenan fraction revealed an additional signal absent in the hybrid tetrasaccharide at 5.25 ppm (Fig. 6). This chemical shift was very close to that of the DA2S-H1 signal of the pure α -carrageenan. Integration of the signal attributed to ι - and α -carrabiose suggested that the fraction was composed of a mixture of two hexasaccharides. These oligosaccharides always had one ι -carrabiose at the reducing end. The occurrence of the DA2S (5.27 ppm) and DA2Snr (5.25 ppm) linked to neutral galactose indicated that the α -carrabiose moiety was either at the non-reducing end (α - ι -: DA2S-G-DA2S-G4S-DA2S-G4S), as in the hybrid tetrasaccharide, or located between two ι -carrabiose moieties (ι - α -: DA2S-G4S-DA2S-G-DA2S-G4S).

Discussion

Screening *P. atlantica* T6c extracts revealed the occurrence of κ - and ι -carrageenan sulfatase activity. ι -Carrageenan sulfatase was the more abundant of the two. It was purified, cloned, and biochemically characterized. Sequence analysis and overexpression assays demonstrated that this sulfatase belongs to the class of formylglycine-dependent sulfatases. This class of sulfatases includes most known sulfatases and, in particular, all carbohydrate sulfatases. No carbohydrate sulfatases have been observed with Fe(II) α -ketoglutarate-dependent oxygenase sulfatase (Müller et al. 2004) nor with Zn $^{2+}$ -dependent alkylsulfatases (β -lactamase-like; Hagelueken et al. 2006). Although the *P. carrageenovora* arylsulfatase (β -lactamase-like sulfatase; Barbeyron et al. 1995) gene was neighboring a κ -carrageenanase gene, suggesting that it might be specific to marine polysaccharides, there is no biochemical evidence to support this hypothesis.

Research on carbohydrate-acting sulfatases has focused mainly on glycosaminoglycans (i.e., heparan, dermatan, chondroitin) and has revealed the high specificity of the desulfation process. For example, *Flavobacterium heparinum* 2S-heparan sulfatase (Raman et al. 2003) is inactive on 6S-heparan sulfates and, reciprocally, *F. heparinum* 6S-heparan sulfatase is inefficient on 2S-heparan sulfate (Myette et al. 2009). In addition, glycosaminoglycan sulfatases can be distinguished by their mode of action, either on

chain ends (exo-sulfatase) or within the polysaccharide chain (endo-sulfatase). Likewise, carrageenan sulfatases seem to follow a similar scheme. We demonstrated that the sulfatase purified here is specific to position 4 of the galactose and inactive on the sulfate at position 2 of the anhydrogalactose of ι -carrageenan, thereby leading to the production of α -carrageenan. κ -Carrageenan, which is also composed of galactose-4-sulfate, was not desulfated by this sulfatase, suggesting that the residue adjacent to galactose-4-sulfate is important for desulfation. Therefore, at least one of the recognition moieties of this ι -carrageenan sulfatase is a disaccharide, i.e., the ι -carrabiose repetition unit.

The composition of the hybrid ι -/ α -carrageenan was deduced by ^1H NMR, but the distribution of the repetition moieties was investigated by analyzing the structure of the degradation products obtained after incubation with *A. fortis* ι -carrageenanase. Interestingly, a 60:40 (mol/mol) hybrid carrageenan was completely degraded in standard ι - and ι -/ α -oligosaccharides, and a very low amount of enzyme-resistant fraction was obtained. The majority of the α -carrabioses encountered in oligosaccharides were positioned adjacent to or in between ι -carrabiose moieties. Therefore, the α -carrabiose moieties are not distributed in blocks but randomly along the hybrid carrageenan chain. This type of distribution suggests an endo-mode of action for this ι -carrageenan sulfatase.

The endo-acting character and the specificity of the ι -carrageenan sulfatase made it possible to prepare a series of ι -/ α -carrageenans with controlled structure. Hybrid ι -/ α -carrageenans have been reported in a few species of red algae (Zablackis and Santos 1986; Chiovitti et

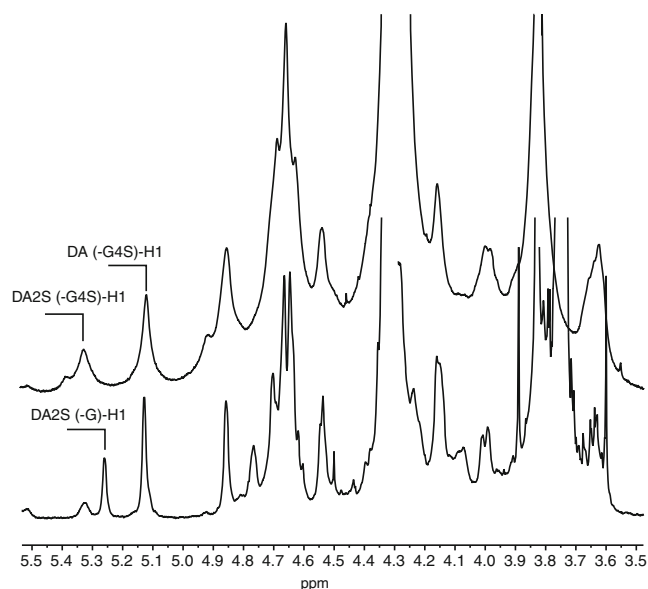


Fig. 7 ^1H NMR of hybrid κ -/ ι -carrageenan (top) incubated with the purified ι -carrageenan sulfatase, leading to the production of hybrid κ -/ ι -/ α -carrageenan

al. 1997, 1998); however, the content of α -carrabiose never exceeds 30–40 % (mol/mol) (Falshaw et al. 1996). Our purified enzyme produced a pure α -carrageenan, which has never been observed in nature. In addition, we observed that the ι -carrabiose moieties could be converted into α -carrageenan when they were localized between two κ -carrabiose moieties (Fig. 7). Due to this interesting property, we were able to make a new series of hybrid κ - ι - α -carrageenans and κ - α -carrageenans, whose structure has never been reported before.

Conclusion

We demonstrated that enzymes can be used to control the structure and therefore the rheological and gelling properties of polysaccharides; similarly, alginate C5-epimerase has been used to control the composition and distribution of mannuronic and guluronic acid along the alginate polysaccharide chain (Ertesvag et al. 2009). Likewise, the gelling properties of pectins can be modified by controlling polysaccharide methylation using methyl-esterases (Buchholt et al. 2004; Jolie et al. 2010). In the case of carrageenan, galactose-6-sulfurylases, which catalyze the formation of anhydrogalactose, have been shown to improve the gelling properties of ι -carrageenan (Genicot-Joncour et al. 2009). In this context, carrageenan sulfatases offer another possible pathway to control and synthesize new carrageenan structures, whose properties have yet to be investigated. Based on the preliminary investigation on algal-extracted ι - α -carrageenan (Bourgoin et al. 2008) that revealed the potential of this hybrid carrageenan (i.e., gel strength, good capacity to suspend cacao particles in milk), new hybrid carrageenans are sure to harbor interesting functional properties.

Acknowledgments The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n°222628.

References

- Barbeyron T, Potin P, Richard C, Collin O, Kloareg B (1995) Arylsulfatase from *Alteromonas carrageenovora*. Microbiology 141:2897–2904
- Bixler HJ, Porse H (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. J Appl Phycol 23:321–335
- Bixler HJ, Johndro K, Falshaw R (2001) Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts. II. Performance in two simulated dairy applications. Food Hydrocolloids 15:619–630
- Bourgoin A, Zabackis E, Poli JB (2008) Characterization of alpha-carrageenan solution behavior by field-flow fractionation and multiangle light scattering. Food Hydrocolloids 22:1607–1611
- Buchholt HC, Christensen TMIE, Fallesen B, Ralet M-C, Thibault J-F (2004) Preparation and properties of enzymatically and chemically modified sugar beet pectins. Carbohydr Polym 58:149–161
- Chiovitti A, Bacic A, Craik DJ, Munro S, Kraft GT, Liao M-L (1997) Carrageenans with complex substitution patterns from red algae of the genus *Erythroclonium*. Carbohydr Res 299:229–243
- Chiovitti A, Bacic A, Craik DJ, Kraft GT, Liao ML, Falshaw R, Furneaux RH (1998) A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red alga *Sarconema filiforme*. Carbohydr Res 310:77–83
- Correc G, Barabanova A, Tuvikene R, Truus K, Yermak I, Helbert W (2012) Comparison of the structures of hybrid κ - β -carrageenans extracted from *Furcellaria lumbicalis* and *Tichocarpus crinitus*. Carbohydr Polym 88:31–36
- Craigie JS (1990) Cell walls. In: Cole KM, Sheath RG (eds) Biology of the red algae. Cambridge University Press, Cambridge, pp 221–257
- Dierks T, Schmidt B, von Figura K (1997) Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci USA 94:11963–11968
- Ertesvag H, Valla S, Skjåk-Bræk G (2009) Enzymatic alginate modification. In: Rehm BHA (ed) Alginates: biology and applications. Microbiology Monographs 13, Springer, Berlin, pp 95–115
- Falshaw R, Furneaux RH, Wong H, Liao M-L, Bacic A, Chandkrachang S (1996) Structural analysis of carrageenan from Burmese and Thai samples of *Catenella nipa* Zanardini. Carbohydr Res 285:81–98
- Genicot-Joncour S, Poinas A, Richard O, Potin P, Rudolph B, Kloareg B, Helbert W (2009) The cyclization of the 3,6-anhydro ring of iota-carrageenan is catalyzed by two D-galactose-2,6-sulfurylases in the red alga *Chondrus crispus*. Plant Physiol 151:1609–1616
- Groisillier A, Hervé C, Jeudy A, Rebuffet E, Pluchon PF, Chevolut Y, Flament D, Geslin C, Morgado IM, Power D, Branno M, Moreau H, Michel G, Boyen C, Czjzek M (2010) MARINE-EXPRESS: taking advantage of high throughput cloning and expression strategies for the post-genomic analysis of marine organisms. Microbial Cell Factories 9:45–56
- Guibet M, Boulenguer P, Mazoyer J, Kervarec N, Antonopoulos A, Lafosse M, Helbert W (2008) Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid κ - ι -carrageenans using carrageenases. Biomacromolecules 9:408–415
- Hagelueken G, Adams TM, Wiehlmann L, Widow U, Kolmar H, Tümmeler B, Heinz DW, Schubert W (2006) The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatase. Proc Natl Acad Sci USA 103:7631–7636
- Hanson SR, Best MD, Wong C-H (2004) Sulfatase: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. Angew Chem 43:5736–5763
- Jolie RP, Duvetter T, Van Loey AM, Hendrickx ME (2010) Pectin methyltransferase and its proteinaceous inhibitor: a review. Carbohydr Res 345:2583–2595
- Jouanneau D, Guibet M, Boulenguer P, Mazoyer J, Smietana M, Helbert W (2010a) New insights into the structure of hybrid κ - μ -carrageenan and its alkaline conversion. Food Hydrocolloids 24:452–461
- Jouanneau D, Boulenguer P, Mazoyer J, Helbert W (2010b) Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of standard neo- ι -carrabiose oligosaccharides. Carbohydr Res 345:547–551
- Jouanneau D, Boulenguer P, Mazoyer J, Helbert W (2011) Hybridity of carrageenans water- and alkali-extracted from *Chondracanthus chamosioi*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata* and *S. radula*. J Appl Phycol 23:105–114
- Knutsen S, Myslabodski D, Larsen B, Usov A (1994) A modified system of nomenclature for red algal galactans. Bot Mar 37:163–169
- Larre C, Penninck S, Bouchet B, Lollier V, Tranquet O, Denery-Papini S, Guillon F, Rogniaux H (2010) *Brachypodium distachyon* grain: identification and subcellular localization of storage proteins. J Exp Bot 61:1771–1783
- McLean MW, Williamson FB (1981) Neocarratetraose 4-O-monosulfate β -hydrolase from *Pseudomonas carrageenovora*. Eur J Biochem 113:447–456

- McLean MW, Williamson FB (1979) Glycosulfatase from *Pseudomonas carrageenovora*—purification and some properties. Eur J Biochem 101:497–505
- Michel G, Nyvall-Collen P, Barbeyron T, Czjzek M, Helbert W (2006) Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. Appl Microbiol Biotechnol 71:23–33
- Müller I, Kahnert A, Pape T, Sheldrick GM, Meyer-Klaucke W, Dierks T, Kertesz M, Uson I (2004) Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: insight into the catalytic mechanism of the Fe (II) α -keto-dependent dioxygenase superfamily. Biochemistry 43:3075–3088
- Myette JR, Soundararajan V, Shriver Z, Raman R, Sasisekharan R (2009) Heparin/heparan sulfate 6-O-sulfatase from *Flavobacterium heparinum*. Integrated structural and biochemical investigation of enzyme active site and substrate specificity. J Biol Chem 284:35177–35188
- Raman R, Myette JR, Shriver Z, Pojasek K, Venkataraman G, Sasisekharan R (2003) The heparin/heparan sulfate 2-O-sulfatase from *Flavobacterium heparinum*—a structural and biochemical study of the enzyme active site and saccharide substrate specificity. J Biol Chem 278:12167–12174
- Rees DA (1969) Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. Adv Carbohydr Chem Biochem 24:267–332
- Therkelsen GH (1993) Carrageenan. In: Whistler RL, BeMiller JN (eds) Industrial gums: polysaccharides and their derivatives, 3rd edn. Academic, San Diego, pp 145–180
- Usov AI (1998) Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. Food Hydrocolloids 12:301–308
- Usov AI (2011) Polysaccharides of the red algae. Adv Carbohydr Chem Biochem 65:115–217
- van de Velde F, Knutsen SH, Usov AI, Rollema HS, Cerezo AS (2002) ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. Trends Food Sci Technol 13:73–92
- Weigl J, Yaphe W (1966) Glycosulfatase of *Pseudomonas carrageenovora*: desulfation of disaccharide from κ -carrageenan. Can J Microbiol 12:874–876
- Wong KF, Craigie JS (1978) Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). Plant Physiol 61:663–666
- Zablackis E, Santos GA (1986) The carrageenan of *Catenella-nipae* Zanard, a marine red alga. Bot Mar 29:319–322
- Zinoun M, Diouris M, Potin P, Floc'h JY, Deslandes E (1997) Evidence of sulfohydrolase activity in the red alga *Calliblepharis jubata*. Bot Mar 40:49–53
- ZoBell CE (1941) Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. J Mar Res 4:41–75

TABLE DES
ILLUSTRATIONS ET
LISTE DES
TABLEAUX

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Introduction générale

| | |
|--|----|
| <u>Figure IG-1</u> : Position des macro-algues et des plantes supérieures dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes (d'après Baldauf, 2008) | 10 |
| <u>Figure IG-2</u> : Exemples d'espèces d'algues carraghénophytes (Adapté de Therkelsen, 1993) | 12 |
| <u>Figure IG-3</u> : Cycle de reproduction de l'algue rouge <i>Chondrus crispus</i> (Gigartinaceae) et structures des carraghénanes correspondants (Adapté de Chen <i>et al.</i> , 1972) | 14 |
| <u>Figure IG-4</u> : Organisation de la paroi des algues rouges (Reproduit de la Thèse Guibet, 2007) | 18 |
| <u>Figure IG-5</u> : Représentation schématique de la paroi des algues rouges | 22 |
| <u>Figure IG-6</u> : Phénomène d'hormésis | 24 |
| <u>Figure IG-7</u> : Le rôle des bactéries dans le cycle du carbone océanique (Azam & Malfatti, 2007) | 32 |
| <u>Figure IG-8</u> : Structures chimiques des unités disaccharidiques des principaux carraghénanes | 38 |
| <u>Figure IG-9</u> : Exemple d'annotation d'oligo- λ -carraghénanes selon la nomenclature de Knutsen | 46 |
| <u>Figure IG-10</u> : Illustration des 2 séries d'oligosaccharides potentielles chez les carraghénanes | 46 |
| <u>Figure IG-11</u> : Diagramme de Stancioff (Stancioff, 1981) | 50 |
| <u>Figure IG-12</u> : Procédé d'extraction industriel des carraghénanes à partir des algues rouges (d'après la Société Degussa) | 56 |
| <u>Figure IG-13</u> : Quelques définitions de rhéologie | 60 |
| <u>Figure IG-14</u> : Mécanisme de gélification du κ -carraghénane en présence d'ions K^+ | 66 |
| <u>Figure IG-15</u> : Variation de la rotation optique du κ -carraghénane (0,1%) en solution en KCl (0,1M) en fonction de la température, formant une boucle d'hystérésis (Landry, 1987) | 68 |
| <u>Figure IG-16</u> : Gels de furcellaran (Tuvikene <i>et al.</i> , 2010) | 74 |
| <u>Figure IG-17</u> : Effet du prétraitement du pathogène <i>A. operculata</i> par les oligo- λ -carraghénanes sur l'infection du gamétophyte de <i>C. crispus</i> (Bouarab <i>et al.</i> , 1999) | 84 |
| <u>Figure IG-18</u> : Espèces d'algues rouges autorisées à la consommation par les autorités sanitaires françaises : <i>Chondrus crispus</i> (A), <i>Gracilaria verrucosa</i> (B) <i>Palmaria palmata</i> (C), <i>Porphyra sp.</i> (D) et <i>lithothamnium sp.</i> (E) | 90 |
| <u>Figure IG-19</u> : Shampooing douche contenant du carraghénane à la fois pour ses vertus cosmétique et texturante | 92 |

| | |
|--|-----|
| <u>Figure IG-20</u> : Poudres de carraghénanes trouvées dans le commerce, kits et exemples d'applications de la cuisine moléculaire _____ | 94 |
| <u>Figure IG-21</u> : Classification numérique des enzymes avec la nomenclature EC selon l'IUBMB ____ | 100 |
| <u>Figure IG-22</u> : Interface du site web CAZY (http://www.cazy.org) _____ | 100 |
| <u>Figure IG-23</u> : Voie de biosynthèse des carraghénanes (d'après Craigie & Wong, 1978) _____ | 102 |
| <u>Figure IG-24</u> : Transfert d'un groupement sulfate sous l'action d'une sulfotransférase (ST) à partir du donneur PAPS à un accepteur R-XH (d'après Paul et al., 2012) _____ | 104 |
| <u>Figure IG-25</u> : Formation des disaccharides de répétition des κ - et ι -carraghénanes, générés enzymatiquement par leur précurseurs biosynthétiques respectifs, le μ - et le ν -carraghénanes _____ | 106 |
| <u>Figure IG-26</u> : Voie de biodégradation du κ -carraghénane par <i>P. carrageenovora</i> (d'après McLean & Williamson, 1981) _____ | 110 |
| <u>Figure IG-27</u> : Mécanismes d'hydrolyse des liaisons glycosidiques par les glycosides-hydrolases (Henrissat & Davies, 1995) _____ | 112 |
| <u>Figure IG-28</u> : Mécanisme d'hydrolyse de la κ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i> , de type SN1 avec rétention de la configuration anomérique (McCarter & Withers, 1994) _____ | 116 |
| <u>Figure IG-29</u> : Modes d'action de la κ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i> (Lemoine et al., 2009) ____ | 118 |
| <u>Figure IG-30</u> : Structure secondaire de la κ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i> (PDB : 1DYP) (Michel et al., 2001) _____ | 118 |
| <u>Figure IG-31</u> : Structure du site actif de la κ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i> (Michel et al., 2001b) _____ | 120 |
| <u>Figure IG-32</u> : Spécificité du site actif de la κ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i> (d'après la Thèse Jouanneau, 2010) _____ | 120 |
| <u>Figure IG-33</u> : Mécanisme d'hydrolyse de la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> , de type SN2 avec inversion de la configuration anomérique (McCarter & Withers, 1994) _____ | 122 |
| <u>Figure IG-34</u> : Structure secondaire de la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> (Michel et al., 2003) _____ | 124 |
| <u>Figure IG-35</u> : Structure du site actif de la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> (Michel et al., 2003) _____ | 124 |
| <u>Figure IG-36</u> : Modalités de reconnaissance de la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> (d'après la Thèse Jouanneau, 2010) _____ | 126 |
| <u>Figure IG-37</u> : Spécificité du site actif de la λ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i> (d'après Guibet, 2007) _____ | 128 |
| <u>Figure IG-38</u> : Réactions catalysées par les sulfatases _____ | 134 |
| <u>Figure IG-39</u> : Mécanismes catalytiques des sulfatases (Gadler & Fabert, 2006) _____ | 136 |

| | |
|---|-----|
| <u>Figure IG-40</u> : Séquence consensus considérée comme la signature des sulfatases (Hanson <i>et al.</i> , 2004) | 138 |
| <u>Figure IG-41</u> : Structure cristalline de l'arylsulfatase A humaine (ARSA) (Buono & Cosma, 2010) | 140 |
| <u>Figure IG-42</u> : Systèmes de maturation des sulfatases (chez les procaryotes) (Benjdia <i>et al.</i> , 2007) | 142 |
| <u>Figure IG-43</u> : Formation de la C α -Formylglycine (A) et rôle dans le mécanisme des sulfatases de la famille I (B) (Maire, 2003) | 142 |
| <u>Figure IG-44</u> : Superposition de la structure de la FGE de <i>S. coelicolor</i> (en vert) avec celle de la FGE humaine (en gris) (Carlson <i>et al.</i> , 2008) | 144 |
| <u>Figure IG-45</u> : Mécanisme proposé pour la réaction de maturation catalysée par les AnSME (Benjdia <i>et al.</i> , 2008) | 144 |
| <u>Figure IG-46</u> : Structure cristalline de l'alkylsulfatase AtsK de <i>P. putida</i> S-313 (PDB : 10IH) (Müller <i>et al.</i> , 2004) | 148 |
| <u>Figure IG-47</u> : Structure cristalline de l'alkylsulfatase SdsA1 de <i>P. aeruginosa</i> (PDB : 2CG3) | 150 |
| <u>Figure IG-48</u> : Structure cristalline de la protéine homologue à ElaC issue de <i>Bacillus anthracis</i> (PDB : 1ZKP) | 150 |
| <u>Figure IG-49</u> : Désulfatation des oligo- κ -carraghénanes par la glycosulfatase de <i>P. carrageenovora</i> décrite par McLean & Williamson (1979) | 154 |
| <u>Figure IG-50</u> : Désulfatation du polymère de ι -carraghénane par la 4S-iota-carraghénane-sulfatase de <i>P. carrageenovora</i> décrite par Genicot-Joncour & Helbert (2009) | 154 |
| <u>Chapitre I</u> | |
| <u>Figure 1-1</u> : Stratégie du dosage d'activités carraghénane-sulfatases | 174 |
| <u>Figure 1-2</u> : Spectres ^1H -RMN du ι -carraghénane (A) incubé avec le surnageant de culture de <i>P. atlantica</i> induit au ι -carraghénane (B) et avec le lysat de <i>P. atlantica</i> induit au ι -carraghénane (C) dans les conditions du crible | 180 |
| <u>Figure 1-3</u> : Cinétiques de désulfatation du ι -carraghénane par le lysat de <i>P. atlantica</i> induit au ι -carraghénane, en fonction de la concentration de substrat (A) et du rapport enzyme / substrat (B) | 182 |
| <u>Figure 1-4</u> : Cinétiques de désulfatation du ι -carraghénane par le lysat de <i>P. atlantica</i> induit au ι -carraghénane, en fonction de la température d'incubation (A) et analyse RMN ^1H du point de cinétique à 72h (B) | 184 |
| <u>Figure 1-5</u> : Cinétiques de désulfatation du ι -carraghénane par le lysat de <i>P. atlantica</i> induit au ι -carraghénane, en fonction du pH d'incubation (A) et analyses ^1H -RMN des points de cinétique à 72h (B) | 186 |
| <u>Figure 1-6</u> : Cinétiques de désulfatation du ι -carraghénane par le lysat de <i>P. atlantica</i> induit au ι -carraghénane, en fonction de la nature du tampon | 187 |

| | |
|--|-----|
| <u>Figure 1-7</u> : Désulfatation du κ - ou κ -/ μ -carraghénane par les extraits de <i>P. atlantica</i> induits au ι -carraghénane, en fonction de la température d'incubation (A) et du pH (B) | 188 |
| <u>Figure 1-8</u> : Désulfatation du ι -carraghénane (A) et du κ -carraghénane (B) par le lysat bactérien de <i>P. atlantica</i> induits au ι -carraghénane | 190 |
| <u>Figure 1-9</u> : Possibilités de désulfatation du ι -carraghénane | 196 |
| <u>Figure 1-10</u> : Effet de la κ -carraghénase sur le ι -carraghénane modifié par le lysat de <i>P. atlantica</i> induit au ι -carraghénane | 196 |
| <u>Figure 1-11</u> : Morphologie de la bactérie marine <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> | 198 |

Chapitre II

| | |
|--|-----|
| <u>Figure 2-1</u> : Scénarios de dégradation du ι -carraghénane par le lysat de <i>P. atlantica</i> | 204 |
| <u>Figure 2-2</u> : Profil d'élution des protéines du lysat de <i>P. atlantica</i> sur une DEAE-Sépharose | 206 |
| <u>Figure 2-3</u> : Profil d'élution des protéines du pool issu de la DEAE-Sépharose purifié sur une Q FF Sépharose | 206 |
| <u>Figure 2-4</u> : Gel d'électrophorèse SDS de fractions collectées après la Q FF | 207 |
| <u>Figure 2-5</u> : Séquence en acides aminés de la protéine Q15XH3 de <i>P. atlantica</i> T6c | 208 |
| <u>Figure 2-6</u> : Spectres ^1H -RMN du ι -carraghénane (B) incubé avec la protéine Q15XH3 purifiée (A) | 208 |
| <u>Figure 2-7</u> : Cinétique de désulfatation du ι -carraghénane (1%) par la 4S- ι -carraghénane-sulfatase purifiée | 210 |
| <u>Figure 2-8</u> : Test de l'activité 4S- ι -carraghénane-sulfatase en fonction de la température d'incubation (A), du tampon et du pH (B) et de la concentration en NaCl (C) | 210 |
| <u>Figure 2-9</u> : Cinétiques de désulfatation | 212 |
| <u>Figure 2-10</u> : Cinétique de Michaelis (A) et diagramme de Lineweaver et Burk (B) pour la détermination des paramètres K_m et V_m | 212 |
| <u>Figure 2-11</u> : Gel d'électrophorèse de la purification de la sulfatase Q15XH3 (A) et test d'activité sulfatase à la MUF-S sur les fractions correspondantes (B) | 214 |
| <u>Figure 2-12</u> : Gels SDS de la sulfatase Q15XH3 après purification sur une colonne de nickel HisPrep FF 16/10 | 216 |
| <u>Figure 2-13</u> : Gel SDS-PAGE des fractions solubles (S) et insolubles (C) des sulfatases Q15XH3 et Q15XH4 co-exprimées avec les enzymes de maturation FGE et AnSME | 218 |
| <u>Figure 2-14</u> : Optimisation de l'activité de la sulfatase Q15XH3 en fonction de l'enzyme de maturation et de la concentration en IPTG (A), en fonction du temps d'induction (B), et en fonction du substrat et de la température d'induction (C) | 218 |

| | |
|--|-----|
| <u>Figure 2-15</u> : Principe de détermination du mode d'action de la 4S- ι -carraghénane-sulfatase | 220 |
| <u>Figure 2-16</u> : Spectres ^1H -RMN des hybrides ι/α -carraghénane produits par la 4S- ι -carraghénane-sulfatase | 220 |
| <u>Figure 2-17</u> : Profils HPSEC des produits de dégradation des hybrides A, B et C et de l'hybride synthétique par la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> | 222 |
| <u>Figure 2-18</u> : Purification sur chromatographie d'exclusion de taille des oligosaccharides issus de la dégradation des hybrides ι/α -carraghénane avec <i>A. fortis</i> | 224 |
| <u>Figure 2-19</u> : Chromatogramme HPAEC des oligosaccharides produits à partir de l'hybrides ι/α -carraghénane dégradé par la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> | 224 |
| <u>Figure 2-20</u> : Spectres ^1H -RMN des oligosaccharides hybrides DP4 et DP6 en comparaison avec le néo- ι -carratétraose (DP4) | 226 |
| <u>Figure 2-21</u> : Spectre RMN ^1H d' α -carraghénane pur produit grâce à la sulfatase native Q15XH3 | 228 |
| <u>Figure 2-22</u> : Modes d'action des sulfatases | 230 |
| <u>Figure 2-23</u> : Comparaison des profils de dégradation par la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> de ι -carraghénane (A), d'un mélange de ι - et α -carraghénane (50/50) (B) et d'un hybride ι/α -carraghénane produit par la sulfatase (C) | 232 |
| <u>Figure 2-24</u> : Oligosaccharides obtenus après action de la sulfatase Q15XH3 de <i>P. atlantica</i> puis de la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> sur un polymère de ι -carraghénane | 232 |
| <u>Figure 2-25</u> : Spectres RMN ^1H montrant la conversion du ι -carraghénane en α -carraghénane | 234 |
| <u>Figure 2-26</u> : Spectres RMN ^1H montrant la conversion du κ/ι - en $\kappa/\iota/\alpha$ -carraghénane | 226 |
| <u>Figure 2-27</u> : Conversion du ι -carrabiose en α -carrabiose par la sulfatase Q15XH3 native | 240 |
| <u>Figure 2-28</u> : Conversion des néo- ι -carratétraose et -hexaose en néo- α -carratétraose et -hexaose respectivement, par la sulfatase Q15XH3 native | 240 |
| <u>Figure 2-29</u> : Structure chimique du néo- α -carrabiose | 242 |
| <u>Figure 2-30</u> : Spectres RMN ^1H à 25°C du néo- α -carrabiose (DP2) (A) et néo- ι -carrabiose (DP2) (B) sous leurs formes anomériques α et β | 242 |
| <u>Figure 2-31</u> : Spectre RMN ^1H du néo- α -carratétraose DP4 (A), du néo- α -carrahexaose DP6 (B) et du polymère d' α -carraghénane (C) | 243 |
| <u>Figure 2-32</u> : Spectres hétéronucléaires $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC et HMBC à 25°C du néo- α -carrabiose | 244 |
| <u>Figure 2-33</u> : Spectres hétéronucléaires $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC (A) et HMBC (B) à 25°C du néo- α -carratétraose | 246 |
| <u>Figure 2-34</u> : Spectres ^1H COSY à 25°C du néo- α -carratétraose (A) et du néo- α -carrahexaose (B) | 247 |

Figure 2-35 : Spectres hétéronucléaires $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC (A) et HMBC (B) à 25°C du néo- α -carrhexaose _____ 248

Chapitre III

Figure 3-1 : Scénarios de dégradation du κ -carraghénane par le lysat de *P. atlantica* _____ 250

Figure 3-2 : Profil d'élution des protéines du lysat de *P. atlantica* sur colonne d'héparine _____ 254

Figure 3-3 : Profil d'élution des protéines du pool issu de la colonne d'héparine sur une Q FF Sépharose _____ 254

Figure 3-4 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de fractions collectées après la purification sur colonne Q FF _____ 256

Figure 3-5 : Séquence d'acides aminés de la protéine Q15XH1 (Uniprot) de *P. atlantica* T6c _____ 256

Figure 3-6 : Spectres ^1H -RMN du κ -/ μ -carraghénane incubé avec la protéine Q15XH1 purifiée _____ 258

Figure 3-7 : Cinétique de désulfatation du κ -/ μ -carraghénane (1%) par la 4S- κ -carraghénane-sulfatase purifiée (A). Test de l'activité 4S- κ -carraghénane-sulfatase en fonction de la température d'incubation (B), du tampon et du pH (C) et de la concentration en NaCl (D) _____ 258

Figure 3-8 : Gel d'électrophorèse de la purification de la sulfatase Q15XH1 (A) et test d'activité sulfatase à la MUF-S sur les fractions correspondantes (B) _____ 260

Figure 3-9 : Optimisation de l'activité de la sulfatase Q15XH1 en fonction du substrat et de la température d'induction _____ 262

Figure 3-10 : Gel SDS de la purification de la sulfatase Q15XH1 surexprimée _____ 262

Figure 3-11 : Spectres ^1H -RMN du κ -/ μ -carraghénane (A) incubé avec la protéine Q15XH1 surexprimée (B) _____ 264

Figure 3-12 : Activité de la sulfatase Q15XH1 surexprimée en fonction de la température d'incubation (A), du tampon et du pH (B) et de la concentration en NaCl (C) _____ 264

Figure 3-13 : Oligosaccharides produits par la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* à partir de l'hybride κ -/ β -carraghénane obtenu par la sulfatase Q15XH1, et des hybrides κ -/ β -carraghénane naturels issu des algues *F. lumbricalis* et *T. crinitus* _____ 266

Chapitre IV

Figure 4-1 : Cluster de gènes de *P. atlantica* hypothétiquement impliqué dans la dégradation des carraghénanes _____ 282

Figure 4-2 : Séquence en acides aminés des protéines Q15XH4 et Q15XG7 (Uniprot) de *P. atlantica* T6c _____ 284

- Figure 4-3 : Gel d'électrophorèse de la purification de la sulfatase Q15XH4 (A) et test d'activité sulfatase à la MUF-S sur les fractions correspondantes (B) _____ 286
- Figure 4-4 : Gel d'électrophorèse de la purification de la sulfatase Q15XG7 (A) et test d'activité sulfatase à la MUF-S sur les fractions correspondantes (B) _____ 286
- Figure 4-5 : Test d'activité de la sulfatase Q15XH4 sur le κ -, le ι - et 2 lots d'oligos ι -carraghénane en fonction de différentes conditions d'expression en milieu LB _____ 288
- Figure 4-6 : Test d'activité de la sulfatase Q15XH4 sur différents ι -carraghénanes commerciaux et deux lots différents d'oligos ι -carraghénane, en fonction de la température d'induction _____ 288
- Figure 4-7 : Gels SDS de la sulfatase Q15XH4 après purification sur une colonne de nickel HisPrep FF 16/10 _____ 290
- Figure 4-8 : Activité de la sulfatase Q15XG7 sur différents carraghénanes en fonction de la température d'induction (A) et sur différents substrats composés d'unités κ -carrabioses : κ -carraghénane, hybride κ - μ -carraghénane et oligo- κ -carraghénanes (B) _____ 292
- Figure 4-9 : Profil d'élution (A) et gel d'electrophotèse (B) de la purification sur colonne d'exclusion de taille de l'extrait d'*E. coli* contenant de la sulfatase Q15XG7 surexprimée, après une 1^{ère} étape sur colonne de nickel _____ 292
- Figure 4-10 : Spectres RMN ¹H du κ - μ -carraghénane (A) incubé avec la sulfatase Q15XG7 (B) et des oligo- κ -carraghénanes (C) incubés avec la sulfatase Q15XG7 _____ 294
- Figure 4-11 : Cinétique de désulfatation des oligo- κ -carraghénanes par la sulfatase surexprimée Q15XG7 (A). Activité de la sulfatase Q15XG7 surexprimée en fonction de la température d'incubation (B), du tampon et du pH (C) et de la concentration en NaCl (D) _____ 296
- Figure 4-12 : Oligosaccharides produits par la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* à partir de l'hybride κ - β -carraghénane obtenu par la sulfatase Q15XH1, et des hybrides κ - β -carraghénane naturels issu des algues *F. lumbricalis* et *T. crinitus* _____ 296

Chapitre V

- Figure 5-1 : Activités de désulfatation et de dépolymérisation mesurées après incubation des différentes fractions issues de la DEAE du surnageant de *P. atlantica*, en présence de ι -carraghénane _____ 308
- Figure 5-2 : Profil d'élution HPSEC du ι -carraghénane (A) incubé avec la fraction 48 issue de la DEAE effectuée sur le surnageant (B) _____ 308
- Figure 5-3 : Profil d'élution du surnageant de *P. atlantica* sur DEAE-Sépharose (A) et activité de dépolymérisation du ι -carraghénane de fractions issues de cette DEAE (B) _____ 310
- Figure 5-4 : Profil d'élution de fractions issues de la DEAE sur gel filtration (A) et activité de dépolymérisation du ι -carraghénane de fractions issues de cette purification (B) _____ 310

| | |
|---|-----|
| <u>Figure 5-5</u> : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de fractions collectées après la colonne de chromatographie d'exclusion de taille | 312 |
| <u>Figure 5-6</u> : Test de l'activité ι -carraghénase en fonction de la température d'incubation (A), et du pH en fonction de la concentration en NaCl (B) | 312 |
| <u>Figure 5-7</u> : Analyses des produits terminaux des ι -carraghénases d' <i>A. fortis</i> et de <i>P. atlantica</i> sur chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC) | 314 |
| <u>Figure 5-8</u> : Analyses des produits terminaux des ι -carraghénases d' <i>A. fortis</i> et de <i>P. atlantica</i> sur chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC) | 314 |
| <u>Figure 5-9</u> : Spectre RMN ^1H du ι -carrabiose (DP2) produit par la ι -carraghénase de <i>P. atlantica</i> | 316 |
| <u>Figure 5-10</u> : Alignement des séquences des ι -carraghénases de <i>P. atlantica</i> , <i>M. thermotolerans</i> , <i>A. fortis</i> , et les ι -carraghénases A1 et A2 de <i>Z. galactanivorans</i> | 318 |
| <u>Figure 5-11</u> : Alignement schématique des séquences de quatre ι -carraghénases caractérisées avec la ι -carraghénase de <i>P. atlantica</i> | 319 |
| <u>Figure 5-12</u> : Cluster de gènes de la ι -carraghénase de <i>P. atlantica</i> | 320 |
| <u>Figure 5-13</u> : Criblages d'activités avec la sulfatase Q15XI1 surexprimée | 322 |

Chapitre VI

| | |
|--|-----|
| <u>Figure 6-1</u> : Spectres RMN ^1H d' α -carraghénane pur (A) incubé avec le lysat bactérien de <i>P. atlantica</i> (B) | 340 |
| <u>Figure 6-2</u> : Conversion des unités α -carrabiose en β -carrabiose sous l'action d'une 2S-carraghénane-sulfatase | 340 |
| <u>Figure 6-3</u> : Profil d'élution du lysat de <i>P. atlantica</i> sur une colonne d'héparine de 1 ml (A) et activités détectées dans les fractions correspondantes contre l' α -carraghénane (B) | 342 |
| <u>Figure 6-4</u> : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de fractions collectées après la colonne d'héparine de 1 ml du lysat de <i>P. atlantica</i> | 342 |
| <u>Figure 6-5</u> : Séquence d'acides aminés de la protéine Q15US6 (Uniprot) de <i>P. atlantica</i> T6c | 342 |
| <u>Figure 6-6</u> : Test de l'activité 2S- α -carraghénane-sulfatase en fonction de la température d'incubation (A), et du pH en fonction de la concentration en NaCl (B) | 344 |
| <u>Figure 6-7</u> : Spectre ^1H -RMN d' α -carraghénane incubé avec la protéine Q15US6 purifiée | 344 |
| <u>Figure 6-8</u> : Profil HPSEC de l' α -carraghénane incubé avec le lysat bactérien de <i>P. atlantica</i> | 346 |
| <u>Figure 6-9</u> : Scénarios de dégradation de l' α -carraghénane par le lysat bactérien de <i>P. atlantica</i> | 346 |
| <u>Figure 6-10</u> : Suivi des activités de désulfatation et de dégradation de l' α -carraghénane après fractionnement du lysat de <i>P. atlantica</i> sur une DEAE-Sépharose | 348 |

| | |
|---|-----|
| <u>Figure 6-11</u> : Spectres ^1H -RMN de β -carraghénane (vert) préparé par voie chimique à partir de κ -carraghénane (noir) | 348 |
|---|-----|

Discussion générale

| | |
|---|-----|
| <u>Figure DG-1</u> : Voies de dégradation des carraghénanes par la bactérie <i>P. atlantica</i> | 364 |
|---|-----|

Conclusions et perspectives

| | |
|---|-----|
| <u>Figure CP-1</u> : Schématisation des deux stratégies utilisées au cours de cette thèse pour associer une activité à son gène | 372 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| <u>Figure CP-2</u> : Possibilité création de nouvelles structures de carraghénanes par la désulfatation des structures λ -carrabiose et θ -carrabiose | 376 |
|--|-----|

Conditions expérimentales

| | |
|--|-----|
| <u>Figure CE-1</u> : Réaction du dosage des extrémités réductrices par le Ferricyanide | 392 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| <u>Figure CE-2</u> : Réaction chimique de la MUF en présence d'une sulfatase | 409 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>Figure CE-3</u> : Proton et carbone anomériques H_1 et C_1 d'une structure de κ -carraghénane | 404 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>Figure CE-4</u> : Spectres ^{13}C -RMN (A) et ^1H -RMN (B) d'un κ - ι -carraghénane | 404 |
|---|-----|

LISTE DES TABLEAUX

Introduction générale

| | |
|---|-----|
| <u>Tableau IG-1</u> : Principaux polysaccharides rencontrés dans la paroi des macro-algues et des plantes supérieures (d'après Popper, 2010) | 20 |
| <u>Tableau IG-2</u> : Unités de répétition des structures chimiques des γ - et β -carraghénane présentées pour illustrer les configurations des unités galactoses des carraghénanes (Knutsen <i>et al.</i> , 1994) | 36 |
| <u>Tableau IG-3</u> : Classification des carraghénanes en famille (d'après Rees, 1969) | 40 |
| <u>Tableau IG-4</u> : Composition en carraghénanes de diverses algues (Adapté de Peirera <i>et al.</i> , 2009) | 54 |
| <u>Tableau IG-5</u> : Propriétés des gels et solutions des 3 principaux carraghénanes (Adapté de la thèse Guibet, 2007) | 70 |
| <u>Tableau IG-6</u> : Utilisation actuelle des κ -, ι - et λ -carraghénanes (Source : CEVA, Pleubian) | 86 |
| <u>Tableau IG-7</u> : Utilisation des carraghénanes dans l'industrie alimentaire (d'après la Thèse Verhaeghe, 2002) | 88 |
| <u>Tableau IG-8</u> : Actions des carraghénanes dans le domaine cosmétique | 94 |
| <u>Tableau IG-9</u> : Carraghénases citées dans le texte à titre d'exemple | 116 |

Chapitre 1

| | |
|--|-----|
| <u>Tableau 1-1</u> : Activités carraghénolytiques et agarolytiques des quatre bactéries criblées | 174 |
| <u>Tableaux 1-2</u> : Criblage d'activités carraghénane-sulfatases | 178 |

Chapitre 2

| | |
|---|-----|
| <u>Tableau 2-1</u> : Mesure du sulfate libéré (en $\mu\text{g/ml}$) par HPAEC après incubation de la sulfatase Q15XH3 surexprimée en présence des différents carraghénanes | 216 |
| <u>Tableau 2-2</u> : Comparaison des deux 4S- ι -carraghénane-sulfatases | 230 |

Chapitre 3

| | |
|---|-----|
| <u>Tableau 3-1</u> : Mesure du sulfate libéré (en $\mu\text{g/ml}$) par HPAEC après incubation de la sulfatase Q15XH1 surexprimée en milieu LB, en présence des différents carraghénanes | 262 |
| <u>Tableau 3-2</u> : Comparaison des deux carraghénane-sulfatases identifiées chez <i>P. atlantica</i> | 270 |

Chapitre 5

Tableau 5-1 : Comparaison des facteurs biochimiques des deux ι -carraghénases homologues issues de *P. atlantica* et *M. thermotolerans* _____ 330

Conditions expérimentales

Tableau CE-1 : Déplacements chimiques des protons des différentes structures de carraghénanes (en ppm) _____ 406

Tableau CE-2 : Déplacements chimiques des carbones (en ppm) des différentes structures de carraghénanes _____ 408

Tableau CE-3 : Constantes de couplage spin-spin des carraghénanes (^1H -RMN) _____ 410

RESUME

Les carraghénanes sont des galactanes sulfatés extraits de la paroi de certaines algues rouges. Ces polysaccharides d'origine marine présentent des propriétés rhéologiques uniques et sont très largement exploités dans l'industrie agro-alimentaire, cosmétique, et pharmaceutique comme agents de texture (gélifiants et épaississants). Ils sont composés d'unités galactoses liées alternativement par des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$, et diffèrent par la présence ou non d'un pont 3,6 anhydro et par leur degré de sulfatation. Cependant, les carraghénanes sont des hétéropolymères et présentent dans la nature des structures hybrides. La grande diversité structurale de ces polysaccharides dont la composition varie en fonction de nombreux facteurs (espèce de l'algue, site et saison de récolte, procédés d'extraction) offre un large panel de propriétés physico-chimiques exploitable dans diverses applications.

Afin de contrôler les propriétés physico-chimiques des carraghénanes, il est donc nécessaire de maîtriser leurs structures chimiques. Dans ce but, la purification d'enzymes de désulfatation - appelées sulfatases - a été entreprise, permettant ainsi de jouer directement sur la gélification des carraghénanes. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des esters sulfatés de nombreux composés biologiques et sont impliquées dans divers processus métaboliques.

Grâce à un criblage, plusieurs carraghénane-sulfatases ont été mises en évidence dans la bactérie marine *P. atlantica*. La purification de deux d'entre elles (Q15XH3, Q15XH1) a montré qu'il s'agissait de sulfatases à formylglycine, et a conduit à l'identification d'un cluster de gènes impliqué dans la biodégradation des carraghénanes. La surexpression d'autres sulfatases menée à partir de ce cluster, a permis de caractériser une nouvelle carraghénane-sulfatase (Q15XG7). Les études conduites sans *a priori* avec la bactérie *P. atlantica* ont également permis de révéler l'existence de deux carraghénases. Les sulfatases caractérisées ont permis de préparer de nouveaux carraghénanes, et notamment de l' α -carraghénane pur. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives d'applications biotechnologiques dans l'industrie des carraghénanes.

Mots-clés : carraghénane – sulfatase – carraghénane-sulfatase – gélification – carraghénase – cluster

ABSTRACT

Carrageenans are sulfated galactans extracted from cell wall of numerous species of red seaweeds. These polysaccharides of marine origin present unique rheological properties, and are widely used as texturing agents in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. They are composed of galactose units linked alternatively by $\alpha(1\rightarrow3)$ and $\beta(1\rightarrow4)$ links, and differ by the occurrence of 3,6-anhydro bridge and their degree of sulfatation. However, carrageenans are heteropolymers and present complex hybrid structures in nature. The variability of carrageenan composition, which depends on algal species, life stage and extraction processes, offers a wide range of physico-chemical properties for various applications.

In order to master the rheological properties of carrageenans, it's necessary to control their chemical structures. To this end, the purification of enzymes of desulfatation -called sulfatases- was undertaken allowing monitoring directly on the gelling properties of these polysaccharides. These enzymes catalyse the hydrolysis of sulfate esters bonds of many biological compounds, and are involved in many metabolic processes.

Through a screening, several carrageenan-sulfatases have been highlighted in the marine bacterium *P. atlantica*. Purification of two of them (Q15XH3, Q15XH1) showed that they were formylglycine-dependent sulfatases, and led to the identification of a cluster of genes involved in the biodegradation of carrageenans. Overexpression of others sulfatases from this cluster has allowed characterizing a new carrageenan-sulfatase (Q15XG7). Studies conducted without *a priori* in the bacterium *P. atlantica* has also revealed the existence of two carrageenases. Sulfatases studied has allowed preparing of new carrageenans, including the production of pure α -carrageenan. These results open new perspectives of biotechnological applications in carrageenan industry.

Key words : carrageenan – sulfatase – carrageenan-sulfatase – gelification – carrageenase – cluster