

50376  
1986  
37

50376  
1986  
37

N° d'ordre : 1315

# MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE**

EN BIOCHIMIE

par

Pascal CARDON

**CONTRIBUTION A L'ETUDE STRUCTURALE D'UN  
EXOPOLYSACCHARIDE PRODUIT PAR UNE NOUVELLE  
SOUCHE DE BACTERIE DU SOL**



Soutenu le 23 Janvier 1986 devant la Commission d'Examen

Président : J. MONTREUIL  
Rapporteurs : A. HEYRAUD  
B. FOURNET  
Examineur : J. GUILLAUME

Ce travail a été réalisé sous la Direction de Monsieur le Professeur Bernard FOURNET dans le Laboratoire de Chimie Biologique (Directeur : Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure-fonction des constituants membranaires). Il a bénéficié d'une aide du Ministère de la Recherche et de la Technologie :

- Allocation de Recherche n° 469
- Contrat dans le cadre du pôle mobilisateur "Essor des Biotechnologies" n° 83.V.0401

*A mes Parents*

*A mes Amis(es)*

*en témoignage de mon affection*

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

Vous m'avez permis de réaliser ce travail au sein de votre Laboratoire.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

---

A Monsieur le Professeur B. FOURNET,

Vous m'avez accueilli avec gentillesse et bienveillance dans votre groupe et guidé tout au long de ce travail. Votre enthousiasme et votre compétence scientifique ont été pour moi un exemple. Les discussions franches que nous avons eues, tant dans le domaine scientifique que sur le plan humain, m'ont permis de bénéficier d'un climat de confiance totale.

Je profite de l'occasion qui m'est donnée pour vous exprimer ma profonde gratitude et ma sincère amitié.

---

A Monsieur A. HEYRAUD, Chargé de Recherche au C.N.R.S.,

Sachant l'intérêt que vous portez à ce sujet, je suis très honoré de votre présence parmi les Membres de mon Jury en tant que rapporteur et je vous en remercie vivement.

---

A Monsieur le Professeur J. GUILLAUME,

Je suis honoré de votre présence dans ce Jury et je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour l'intérêt que vous voulez bien porter à ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à

Messieurs G. BARBRY  
J. PAZ PARENTE  
G. RICART  
J-M. WIERUSZESKI

pour leur collaboration à l'ensemble de ce travail.  
Qu'ils acceptent ici mes sincères remerciements ;

Monsieur Y. LEROY pour sa constante disponibilité et pour ses conseils toujours très précieux. Qu'il soit ici assuré de mon amitié ;

Madame J. GUILMAIN qui a participé à la réalisation de ce travail en effectuant avec compétence la frappe et la mise en page de ce mémoire ainsi que Mesdames J. CELEN et B. LAYOUS pour leur précieuse collaboration et pour leur gentillesse toujours égale.  
Je tiens, par ces lignes, à leur exprimer mes remerciements et ma très sincère amitié.

## ABREVIATIONS

- EPS : exopolysaccharide
- LPS : lipopolysaccharide
- Glc : D-glucose
- Gal : D-galactose
- Man : D-mannose
- Fuc : L-fucose
- Glc UA (Glc A) : acide D-glucuronique
- Gal UA (Gal A) : acide D-galacturonique
- Man UA (Man A) : acide D-mannuronique
- Gul UA (Gul A) : acide L-guluronique
- mg : milligramme
- $\mu$ g : microgramme
- ml : millilitre
- $\mu$ l : microlitre
- DMSO : diméthyl-sulfoxyde
- SDS : dodécyl sulfate de sodium (sodium dodécyl sulfate)
- CPG (GLC) : chromatographie en phase gazeuse (*gas liquid chromatography*)
- CLHP (HPLC) : chromatographie en phase liquide à haute performance  
(*high performance liquid chromatography*)
- SM (MS) : spectrométrie de masse (*mass spectrometry*)
- RMN (NMR) : résonance magnétique nucléaire (*nuclear magnetic resonance*)
- IR : infra-rouge
- p p m : parties par million
- $\eta$  rel : viscosité relative
- $\eta$  réd : viscosité réduite
- [  $\eta$  ] : viscosité intrinsèque
- nm : nanomètre

TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

1

## GENERALITES

I - <u>DEFINITION ET CLASSIFICATION DES POLYSACCHARIDES</u>	2
A - <u>LES POLYSACCHARIDES ET LES AUTRES POLYMERES CONSTITUES DE MONOSACCHARIDES</u>	2
B - <u>HOMOPOLYSACCHARIDES ET HETEROPOLYSACCHARIDES</u>	2
C - <u>POLYSACCHARIDES BACTERIENS</u>	8
II - <u>METHODES CHIMIQUES DE DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES POLYSACCHARIDES</u>	14
A - <u>ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE</u>	14
1) <u>Composition en oses</u>	14
2) <u>Analyse des substituants</u>	15
B - <u>ANALYSE STRUCTURALE</u>	17
1) <u>Méthylation</u>	17
a) <u>Principes et procédés</u>	17
b) <u>Caractérisation et analyse des oses partiellement méthylés après hydrolyse totale</u>	18
c) <u>Caractérisation et analyse des oligosaccharides obtenus après hydrolyse partielle</u>	19
2) <u>Dégradation sélective</u>	20
a) <u>La dégradation wronique (<math>\beta</math> - élimination)</u>	20
b) <u>Oxydation périodique - Dégradation de Smith</u>	21
3) <u>Hydrolyse chimique partielle</u>	21
a) <u>Hydrolyse acide en milieu aqueux</u>	24
b) <u>Hydrolyse acide en milieu non aqueux - Acétyluse</u>	24



	PAGES
4) <u>Oxydation chromique</u>	25
5) <u>Hydrolyse enzymatique</u>	25
6) <u>Localisation des substituants</u>	29
a) <u>Groupements O-sulfates</u>	29
b) <u>Groupements O-acyles (O-acétyles, etc...)</u>	30
c) <u>Localisation des résidus d'acide pyruvique</u>	30
 C - <u>CONCLUSION</u>	 30
 III - <u>METHODES SPECTROSCOPIQUES</u>	 32
A - <u>RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN ou NMR)</u>	32
1) <u>RMN - <sup>1</sup>H</u>	33
2) <u>RMN - <sup>13</sup>C</u>	38
a) <u>Découplage total (complete proton decoupling ou proton noise decoupling)</u>	38
b) <u>Technique antiqate</u>	40
c) <u>Découplage partiel (off resonance)</u>	41
d) <u>Irradiation sélective (hétéronucléaire ou double)</u>	41
3) <u>RMN d'autres noyaux</u>	41
4) <u>Apports de la RMN - <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C dans l'étude structurale des polysaccharides</u>	42
5) <u>Conclusion</u>	46
 B - <u>SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE ET RAMAN</u>	 46
1) <u>Principes et procédés</u>	46
2) <u>Applications à la détection de groupements fonctionnels présents dans les polysaccharides</u>	49
3) <u>Conclusion</u>	53
 IV - <u>UTILISATION INDUSTRIELLE DES POLYSACCHARIDES</u>	 54
A - <u>DOMAINES D'APPLICATION</u>	56
1) <u>Alimentation</u>	56
2) <u>Médecine</u>	56
3) <u>Agriculture</u>	56
4) <u>Industries diverses</u>	56

	PAGES
B - <u>APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES EXOPOLYSACCHARIDES MICROBIENS</u>	58
1) <u>Les xanthanes</u>	58
2) <u>Les dextranes</u>	58
3) <u>Le curdlane</u>	59
4) <u>Les alginates bactériens</u>	60
5) <u>Les polysaccharides d'<i>Azotobacter</i></u>	61
6) <u>Les polysaccharides d'<i>Erwinia</i></u>	61
7) <u>Les polysaccharides fongiques</u>	62
a) <u>Les scléroglucanes</u>	62
b) <u>Les pullulanes</u>	62
C - <u>CONCLUSION</u>	63

## R E S U L T A T S

I - <u>CULTURE DES BACTERIES ET ISOLEMENT DU POLYSACCHARIDE</u>	65
A - <u>MATERIELS ET METHODES</u>	65
B - <u>RESULTATS</u>	67
C - <u>CONCLUSION</u>	67
II - <u>COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DU POLYSACCHARIDE</u>	68
A - <u>RECHERCHE DES PROTEINES</u>	68
1) <u>Dosage colorimétrique selon la méthode de LOWRY et al.</u>	68
a) <u>Préparation des solutions</u>	68
b) <u>Dosage</u>	68
c) <u>Résultats</u>	69
2) <u>Recherche des protéines par chromatographie en phase</u>	69
<u>liquide à haute pression (CLHP)</u>	
a) <u>Principe et méthodes</u>	69
b) <u>Résultats</u>	70

	PAGES
B - <u>RECHERCHE DES ACIDES URONIQUES</u>	71
1) <u>Dosage au carbazol-sulfurique de DISCHE (143)</u>	71
a) <u>Matériels et méthodes</u>	71
b) <u>Résultats</u>	72
2) <u>Identification des acides uroniques par CLHP</u>	72
a) <u>Matériels et méthodes</u>	72
b) <u>Résultats</u>	73
3) <u>Analyse du polymère par CPG après réduction des acides uroniques par la méthode de TAYLOR et CONRAD(17)</u>	75
a) <u>Matériels et méthodes</u>	75
b) <u>Résultats</u>	76
C - <u>MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DES MONOSACCHARIDES</u>	76
1) <u>Matériels et méthodes</u>	76
2) <u>Résultats</u>	77
D - <u>IDENTIFICATION DE SUBSTITUANTS DE TYPE PYRUVATE ET SUCCINATE</u>	77
1) <u>Identification chromatographique</u>	77
2) <u>Identification par RMN du proton à 400 MHz</u>	79
a) <u>Protocole expérimental</u>	79
b) <u>Résultats</u>	79
III - <u>ANALYSE STRUCTURALE DU POLYSACCHARIDE</u>	83
A - <u>PERMETHYLATION DU POLYSACCHARIDE NATIF</u>	83
1) <u>Matériels et méthodes</u>	83
a) <u>Préparation de la base de méthylation</u>	83
b) <u>Méthylation</u>	84
c) <u>Hydrolyse du polysaccharide perméthylé, acétylation et analyse des éthers méthylés acétylés par CPG</u>	85
2) <u>Résultats</u>	86

	PAGES
B - <u>PERMETHYLATION DU POLYSACCHARIDE DEPYRUVATE</u>	88
1) <u>Matériels et méthodes</u>	88
2) <u>Résultats</u>	89
C - <u>TENTATIVE DE LOCALISATION DU RESIDU SUCCINYLE</u>	91
1) <u>Matériels et méthodes</u>	91
a) <u>Traitement au méthyl vinyl éther</u>	91
b) <u>Désuccinylation du polysaccharide modifié</u>	92
c) <u>Méthylation, hydrolyse et acétylation du polymère modifié</u>	92
2) <u>Résultats</u>	93
D - <u>UTILISATION DE GLYCOSIDASES</u>	93
1) <u>Extrait bactérien</u>	93
a) <u>Protocole expérimental</u>	94
b) <u>Résultats</u>	94
2) <u>Laminarinases (EC 3.2.1.6.)</u>	95
a) <u>Protocole expérimental</u>	95
b) <u>Résultats</u>	96
3) <u>Conclusion</u>	96
E - <u>OXYDATION PERIODIQUE - DEGRADATION DE SMITH</u>	97
1) <u>Matériels et méthodes</u>	97
a) <u>Oxydation périodique</u>	97
b) <u>Dégradation de Smith</u>	98
c) <u>Séparation par CLHP des oligosaccharides résistants à l'oxydation</u>	98
d) <u>Analyse des oligosaccharides par CPG après méthanolyse et trifluoroacétylation</u>	99
e) <u>Etude de la structure des oligosaccharides par perméthylation</u>	99
2) <u>Résultats</u>	100
a) <u>CLHP</u>	100
b) <u>Analyse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés par CPG</u>	100

	PAGES
c) <u>Analyse structurale des pics A et B par CPG après perméthylation</u>	103
<b>F - <u>ACETOLYSE PARTIELLE</u></b>	103
1) <u>Matériels et méthodes</u>	106
a) <u>Acétolyse</u>	106
b) <u>Séparation des mono- et oligosaccharides alditols</u>	106
c) <u>Analyse des mono- et oligosaccharides alditols purifiés, par CPG après méthanolyse et triméthylsilylation</u>	107
d) <u>Etude structurale des oligosaccharides alditols par CPG après perméthylation, méthanolyse et acétylation</u>	108
2) <u>Résultats</u>	108
a) <u>Séparation des mono- et oligosaccharides alditols par CLHP</u>	108
b) <u>Analyse des mono- et oligosaccharides alditols par CPG après méthanolyse et triméthylsilylation</u>	110
c) <u>Analyse structurale des fractions oligo- et polysaccharidiques obtenues par CLHP de l'acétolysat du polysaccharide</u>	110
<b>IV - <u>PROPRIETES RHEOLOGIQUES-FACTEURS INFLUENCANT LA VISCOSITE DU POLYSACCHARIDE</u></b>	119
A - <u>ETUDE DE LA VISCOSITE RELATIVE DU POLYSACCHARIDE</u>	119
B - <u>INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR LA VISCOSITE</u>	122
C - <u>INFLUENCE DU pH SUR LA VISCOSITE</u>	123
D - <u>STABILITE THERMIQUE DU BIOPOLYMERE</u>	123
E - <u>CONCLUSION DES ETUDES RHEOLOGIQUES</u>	124

PAGES

CONCLUSIONS GENERALES

125

BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

Certaines bactéries, organismes vivants représentés dans un grand nombre de milieux naturels, ont la propriété de synthétiser une capsule de nature polysaccharidique, généralement acide (LUDERITZ (1) ). Ce polysaccharide (souvent nommé polysaccharide capsulaire ou antigène K) est lâchement lié à la surface cellulaire, pouvant même se dissoudre dans le milieu de culture des bactéries, d'où le terme de polysaccharide extracellulaire ou encore exopolysaccharide (E P S).

L'intérêt de ces polymères n'est plus à démontrer. En effet, certains exopolysaccharides présentent des propriétés particulières de viscosité qui en font des substances de choix pour des applications industrielles diverses. De plus ces biopolymères constituent, avec les O-antigènes des lipopolysaccharides (L P S), les principaux immunogènes et antigènes des bactéries du fait de leur localisation externe à la cellule. Dans cette position, ils participent à la plupart des réactions entre la bactérie et les mécanismes immunitaires de l'hôte, provoquant la synthèse d'anticorps dans le sérum sanguin d'animaux : ces molécules portent donc les propriétés sérologiques des bactéries (LUDERITZ (1) ).

Ces propriétés étant directement liées à la structure chimique de ces composés, sa connaissance précise est d'une grande importance.

C'est en cela que nous avons entrepris d'élucider la structure primaire d'un exopolysaccharide isolé d'une nouvelle souche de bactérie du sol. Ce biopolymère s'avère en effet être très intéressant de par ses propriétés de viscosité, ce fait permettant d'envisager une application industrielle future.



GENERALITES

## I - DEFINITION ET CLASSIFICATION DES POLYSACCHARIDES

### A - LES POLYSACCHARIDES ET LES AUTRES POLYMERES CONSTITUES DE MONOSACCHARIDES

Les macromolécules naturelles contenant des unités osidiques sont universellement répandues chez les organismes vivants et incluent :

- 1) les polysaccharides, exclusivement constitués d'oses
- 2) les glycoprotéines et peptidoglycannes
- 3) les glycolipides et lipopolysaccharides (L P S)
- 4) les acides téichoïques
- 5) les acides nucléiques

Nous définirons les polysaccharides comme des polymères contenant périodiquement des unités de répétition oligosaccharidiques liées entre elles par des liaisons de type O-glycosidique.

La présence de ces structures répétitives fournit la base de la classification que nous adoptons ci-dessous.

### B - HOMOPOLYSACCHARIDES ET HETEROPOLYSACCHARIDES

Les tableaux I et II p. 3 à 7 (ASPINALL (2) ) présentent les groupes majeurs de polysaccharides universellement répandus et constitués d'un ou de deux monosaccharides.

Cette revue n'est pas exhaustive et nous en avons volontairement écarté les polymères plus complexes, composés de plusieurs monosaccharides différents.

TABLEAU I

Homopolysaccharides majeurs (ASPINALL (2) ).

Types de liaison	Répartition	Structure
$\alpha$ -D-Glucanes		
1 $\longrightarrow$ 3	Champignons, <i>Streptococcus mutans</i>	Linéaire
1 $\longrightarrow$ 3 )	Champignons	Linéaire, régulièrement alternée
1 $\longrightarrow$ 4 )		Linéaire, proportions variables
1 $\longrightarrow$ 4	Amylose : composant de l'amidon avec l'amylopectine : plantes supérieures	Linéaire
1 $\longrightarrow$ 4 (majeur) )	Amylopectine : plantes	Branchée
1 $\longrightarrow$ 6 (mineur) )		
	Glycogène : animaux, quelques bactéries, levures et algues	Branchée
1 $\longrightarrow$ 4 )	Levures	Linéaire, régulière
1 $\longrightarrow$ 6 )		
1 $\longrightarrow$ 6 (majeur) )	Dextranes : bactéries	Ossature linéaire, degrés variables de branchement avec généralement de petites chaînes latérales
divers (mineur) )		
$\beta$ -D-Glucanes		
1 $\longrightarrow$ 2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Probablement linéaire
1 $\longrightarrow$ 3	- Commun chez les plantes supérieures - Rare chez les bactéries, champignons et protozoaires - Laminarine : <i>Laminaria</i> et autres algues brunes	Linéaire Linéaire Majoritairement linéaire, degrés variables de branchement



TABLEAU I (suite)

Types de liaison	Répartition	Structure
$1 \rightarrow 3$ ) $1 \rightarrow 4$ )	Lichens, céréales. (avoine, orge), herbes	Linéaire, pas entièrement régulière
$1 \rightarrow 3$ (majeur) ) $1 \rightarrow 6$ (mineur) )	Levures	Branchée, proportions variables
$1 \rightarrow 4$	Cellulose : universelle chez les plantes supérieures ; certaines algues et bactéries	Linéaire
$1 \rightarrow 6$ (principalement)	Levures	Linéaire, possibilité de branchement limité
2-Acétamido 2-déoxy- $\beta$ -D-glucane $1 \rightarrow 4$	Chitine : paroi des cellules de champignons	Linéaire
$\alpha$ -L-Arabinofuranes		
$1 \rightarrow 5$ ) $1 \rightarrow 3$ )	Commun chez les plantes supérieures : homopolysaccharides ou sous-unités covalamment liées sur les rhamnogalacturonanes	Branchée
$\beta$ -D-Fructofuranes		
$2 \rightarrow 1$	Inuline : plantes supérieure, quelques algues vertes	Linéaire
$2 \rightarrow 6$	Herbes et quelques céréales Bactéries	Principalement linéaire Quelques branchements ( $2 \rightarrow 1$ )
$\alpha$ -L-Fucanes (6-déoxy- $\alpha$ -L-galactanes)		
$1 \rightarrow 2$	Beaucoup d'algues brunes	Branchements possibles, sulfatée



TABLEAU I (suite)

Types de liaison	Répartition	Structure
$\beta$ -D-Galactanes		
1 $\longrightarrow$ 3	<i>Rosa glauca</i>	Linéaire
1 $\longrightarrow$ 3 ) 1 $\longrightarrow$ 6 )	Conifères (arabinogalactanes)	Très branchée
1 $\longrightarrow$ 4	Homopolysaccharides ou arabinogalactanes ; ou encore sous-unités covalamment attachées sur les rhamnogalacturonanes	Chaînes linéaires sur les homopolysaccharides
1 $\longrightarrow$ 4 ) 1 $\longrightarrow$ 6 )	Hétéropolysaccharides : peu fréquents dans certains bois	Branchée
$\beta$ -L- $\beta$ -D-Galactanes		
1 $\longrightarrow$ 3 ) 1 $\longrightarrow$ 6 )	<i>Helix pomatia</i>	Branchée
$\alpha, \beta$ -D-Galactanes		
$\alpha$ -D-Galp lié en 4 $\beta$ -D-Gal p lié en 3	Carraghénanes : algues rouges	Linéaire avec unités de répétition fréquemment masquées par des sites et proportions variées d'unités O-sulfatées
$\alpha$ -L- $\beta$ -D-Galactanes		
$\alpha$ -L-Gal p lié en 4 ) $\beta$ -D-Gal p lié en 3 )	Agarose, algues rouges	
$\alpha$ -D-Galacturonanes		
1 $\longrightarrow$ 4	Pectine : plantes supérieures	Linéaire
$\alpha$ -D-Mannanes		
1 $\longrightarrow$ 3	Rare chez les algues (sulfatés et non sulfatés) ; avec d'autres monosaccharides sur des chaînes latérales, rencontrés chez les champignons et levures.	Linéaire



TABLEAU I (suite)

Types de liaison	Répartition	Structure
1 → 6	Composants de la surface cellulaire des levures	Fréquemment branchée
$\beta$ -D-Mannanes		
1 → 3 ) 1 → 4 )	Levures	Linéaire, alternée
1 → 4	Quelques algues rouges Occasionnellement chez les plantes supérieures	Linéaire Linéaire
$\beta$ -D-Xylanes		
1 → 3 ) 1 → 4 )	Algues vertes Algues rouges	Linéaire Linéaire, proportions variables
1 → 4	Plantes supérieures mais plus communément sous forme d'hétéropolysaccharides	Essentiellement linéaire



TABLEAU II

Hétéropolysaccharides majeurs possédant deux monosaccharides différents dans leur chaîne principale (ASPINALL (2) ).

Chaîne principale	Répartition	Distribution des unités
Glucomannanes		
→4)-β-D-Glc p-(1-)	Plantes supérieures (bois de conifères et graines)	Proportions variées, pas de régularité évidente
→4)-β-D-Man p-(1-)		
Glucuronomannanes		
→4)-β-D-Glc p A-(1-)	Trame de polysacchari- des plus complexes : gommés et parois cellu- laires du tabac	Alternée
→2)-α-D-Manp-(1-		
Guluronomannuronanes		
→4)-β-D-Man p A-(1-)	Acide alginique : al- gues brunes et quel- ques bactéries	Variable
→4)-α-L-Gul p A-(1-)		
Rhamnogalacturonanes		
→4)-α-D-Gal p A-(1-)	Pectines, gommés, mu- cilages	Variable : pectines : galacturonanes certaines gommés : régions alternées
→2)-α-L-Rha p-(1-)		



Le cas de polysaccharides bactériens est traité à part du fait de l'intérêt que nous leur porterons par la suite.

### C - POLYSACCHARIDES BACTERIENS

Les bactéries ont été classées en deux groupes majeurs : Gram négatif (Gram -) et Gram positif (Gram +) (STACEY et BARKER (3)) selon que leur paroi cellulaire retenait ou non un colorant. Ces organismes synthétisent des polymères hautement spécifiques qui forment une classe au sein de laquelle les variations structurales sont illimitées :

- les lipopolysaccharides (L P S) sont spécifiques de la paroi des bactéries Gram - tandis que les acides téichoïques le sont de la membrane plasmique et de la paroi des bactéries Gram +

- les peptidoglycannes

- les exopolysaccharides (E P S) ou polysaccharides capsulaires (C P S).

Citons aussi des polysaccharides non spécifiques excrétés par certaines bactéries et utilisés dans certaines industries : les dextrans, certains glucanes, le curdlane, font partie de ces polymères.

Le tableau III p.9-11 (KENNE et LINDBERG (4)) présente la liste non exhaustive des monosaccharides présents dans les groupes majeurs de polysaccharides bactériens spécifiques. Ces macromolécules sont pour la plupart des hétéropolysaccharides constitués d'unités de répétition. La grande diversité de leur composition est encore accentuée par la présence de résidus non glucidiques (tableau IV p.12, KENNE et LINDBERG (4)) qui peuvent se greffer sur ces polymères, leur conférant ainsi des propriétés physico-chimiques particulières.



TABLEAU III

Monosaccharides présents dans les groupes majeurs de polysaccharides bactériens spécifiques (KENNE et LINDBERG (4) ).

Monosaccharides	Répartition <sup>a</sup>
<b>Pentoses</b>	
L-Arabinose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
D-Ribose	Commun
D-Xylose	<i>Neisseria</i> , LPS
L-Xylose	<i>Pseudomonas</i> , LPS
D-Thréo-Pentulose	<i>Pseudomonas</i> , LPS
<b>Hexoses</b>	
D-Glucose	Commun
D-Mannose	Commun
D-Galactose	Commun
D-Allose	<i>Pseudomonas</i> , EPS
D-Fructose	Levanes, <i>Vibrio</i> , LPS
4-Déoxy-D-arabino-hexose	<i>Citrobacter</i> , LPS
6-Déoxy-D-mannose, D-rhamnose	<i>Pseudomonas</i> , LPS
6-Déoxy-L-mannose, L-rhamnose	Commun
6-Déoxy-L-galactose, L-fucose	Commun
6-Déoxy-D-talose	Gram négatif non identifié, LPS
6-Déoxy-L-talose	<i>Escherichia coli</i> , LPS
6-Déoxy-L-altrose	<i>Yersinia</i> , LPS
3,6-Didéoxy-D-arabino-hexose, tyvélose	Enterobacteriaceae, LPS
3,6-Didéoxy-L-arabino-hexose, ascarylose	<i>Yersinia</i> , LPS
3,6-Didéoxy-D-ribo-hexose, paratose	Enterobacteriaceae, LPS
3,6-Didéoxy-D-xylo-hexose, abéquose	Enterobacteriaceae, LPS
3,6-Didéoxy-L-xylo-hexose, colitose	Enterobacteriaceae, LPS
<b>Heptoses</b>	
L-Glycéro -D-manno - heptose	Commun, LPS
D-Glycéro -D-manno - heptose	<i>Yersinia</i> , LPS
6-Déoxy-D-manno-heptose	<i>Yersinia</i> , LPS
<b>Monosaccharides aminés</b>	
4-Amino-4-déoxy-L-arabinose	Commun, LPS
2-Amino-2-déoxy-D-glucose, D-glucosamine	Commun
2-Amino-2-déoxy-D-mannose, D-mannosamine	<i>Streptococcus</i> , EPS
2-Amino-2-déoxy-D-galactose, D-galactosamine	Commun



TABLEAU III (suite)

Monosaccharides	Répartition <sup>a</sup>
2-Amino-2,6-didéoxy-D-glucose, D-quinovosamine	<i>Vibrio</i>
2-Amino-2,6-didéoxy-L-mannose, L-rhamnosamine	<i>E. coli</i> , LPS
2-Amino-2,6-didéoxy-D-galactose, D-fucosamine	<i>Pseudomonas</i> , LPS
2-Amino-2,6-didéoxy-L-galactose, L-fucosamine	<i>Streptococcus</i> , EPS
2-Amino-2,6-didéoxy-L-talose, pneumosamine	<i>Streptococcus</i> , EPS
3-Amino-3,6-didéoxy-D-glucose	Enterobacteriaceae, LPS
3-Amino-3,6-didéoxy-L-glucose	<i>Aeromonas</i> , LPS
3-Amino-3,6-didéoxy-D-galactose	Enterobacteriaceae, LPS
4-Amino-4,6-didéoxy-D-glucose, viosamine	<i>E. coli</i> , LPS
4-Amino-4,6-didéoxy-D-galactose, thomosamine	<i>E. coli</i> LPS
4-Amino-4,6-didéoxy-D-mannose-pérosamine	<i>Vibrio</i> , LPS
2,3-Diamino-2,3-didéoxy-D-glucose	<i>Rhodospseudomonas</i> , LPS
2,4-Diamino-2,4,6-tridéoxy-D-glucose, bacillosamine	<i>Pseudomonas</i> , LPS
2,4-Diamino-2,4,6-tridéoxy-D-galactose	<i>Streptococcus</i> , EPS
2-Amino-2-déoxyheptose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
<b>Acides uroniques</b>	
Acide D-riburonique	<i>Rhizobium</i> EPS
Acide D-glucuronique	Commun
Acide D-mannuronique	<i>E. coli</i> EPS
Acide D-galacturonique	Commun
Acide L-guluronique	<i>Azotobacter</i> , EPS
Acide 4-déoxyhex-4-enuronique	<i>Klebsiella</i> , EPS
Acide 2-amino-2-déoxy-glucuronique	<i>Staphylococcus</i> , EPS
Acide 2-amino-2-déoxy-D-mannuronique	<i>Streptococcus</i> , EPS
Acide 2-amino-2-déoxy-D-galacturonique	<i>Citrobacter</i> , EPS
Acide 2-amino-2-déoxy-L-galacturonique	<i>Pseudomonas</i> LPS
Acide 2-amino-2-déoxy-L-altruronique	<i>Shigella</i> , LPS
Acide 2-amino-2-déoxyguluronique	<i>Vibrio</i> , EPS
Acide 2,3-diamino-2,3-didéoxy-D-glucuronique	<i>Pseudomonas</i> , LPS
Acide 2,3-diamino-2,3-didéoxy-D-mannuronique	<i>Pseudomonas</i> , LPS
Acide 2,3-diamino-2,3-didéoxy-L-guluronique	<i>Pseudomonas</i> , LPS
<b>Autres monosaccharides acides</b>	
Acide 3-déoxy-L-glycero-pentulosonique	<i>Klebsiella</i> , EPS
Acide 3-déoxy-thréo-hexulosonique	<i>Azotobacter</i> , EPS
Acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique	Commun, LPS
Acide 5-amino-3,5-didéoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonique, acide neuraminique	<i>E. coli</i> , EPS
4-O-(R)-1-Carboxyéthyl-D-glucose	<i>Shigella</i> , LPS
4-O-(S)-1-Carboxyéthyl-D-glucose	<i>Aerococcus</i> , EPS
3-O-(R)-1-Carboxyéthyl-L-rhamnose	<i>Shigella</i> , LPS
2-Amino-2-déoxy-3-O-(R)-1-carboxyéthyl-D-glucose, acide muramique	Commun, peptidoglycane
2-Amino-2-déoxy-3-O-(R)-1-carboxyéthyl-D-mannose	Peptidoglycane
Acide 4-O-(S)-1-carboxyéthyl-D-glucuronique	<i>Klebsiella</i> , EPS

TABLEAU III (suite)



Monosaccharides	Répartition <sup>a</sup>
<b>Monosaccharides méthylés</b>	
2,3,4-Tri- O -méthylarabinose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3- O -Méthyl-D-ribose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
2- O -Méthylxylose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3- O -Méthyl-D-xylose	<i>Myxococcus</i> , LPS
3- O -Méthyl-L-xylose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
4- O -Méthyl-D-xylose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3- O -Méthyl-D-glucose	<i>Rhizobium</i> , EPS
4- O -Méthyl-D-glucose	<i>Rhizobium</i> , EPS
2- O -Méthylmannose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3- O -Méthyl-D-mannose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
4- O -Méthyl-D-mannose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
6- O -Méthyl-D-mannose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
2- O -Méthyl-D-galactose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
4- O -Méthyl-D-galactose	<i>Rhizobium</i> , LPS
6- O -Méthyl-D-galactose	<i>Rhizobium</i> , LPS
2,3-Di- O -méthyl-D-galactose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
2- O -Méthyl-D-rhamnose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
2- O -Méthyl-L-rhamnose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3- O -Méthyl-L-rhamnose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
2- O -Méthyl-L-fucose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3- O -Méthyl-L-fucose	<i>Rhizobium</i> EPS
2,3-Di- O -méthylfucose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3- O -Méthyl-6-déoxy-D-talose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
2-Amino-2-déoxy-6- O -méthyl-D-glucose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3- O -Méthylheptose	<i>Rhizobium</i> , LPS
6- O -Méthylheptose	Procaryotes photosynthétiques, LPS
3,6-Di- O -méthylheptose	<i>Rhizobium</i> , LPS
Acide 4- O -méthyl-D-glucuronique	<i>Rhizobium</i> , EPS

a : abréviations : EPS, polysaccharides extracellulaires ;  
LPS, lipopolysaccharides.

TABLEAU IV

Résidus non glucidiques présents sur certains polysaccharides bactériens spécifiques <sup>a</sup>(KENNE et LINDBERG (4) ).

Composé	Mode de liaison	Répartition <sup>b</sup>
Acide acétique	O - Acyl, N - Acyl	Commun
Acide succinique	O - Acyl	<i>Alcaligenes</i> , EPS
Acide glycolique	N - Acyl	Peptidoglycane
Acide (S) -2,4- dihydroxy- butanoïque	N - Acyl	<i>Vibrio</i> , LPS
Glycine	Inconnu	<i>Shigella</i> , LPS
D-Alanine	O - Acyl	Acides téichoïques
L-Alanine	N - Acyl	<i>Pseudomonas</i> , LPS
L-Alanine	Amide	<i>Haemophilus</i> , EPS
L-Sérine	Amide	<i>Haemophilus</i> , EPS
L-Thréonine	Amide	<i>Haemophilus</i> , EPS
L-Lysine	2-N - Amide	<i>Proteus</i> , LPS
Taurine	Amide	<i>Streptococcus</i> , EPS
Formaldéhyde	Acétal	Enterobacteriaceae, EPS
Acétaldehyde	Acétal	Enterobacteriaceae, EPS
Acide pyruvique	Acétal	Commun
Acide phosphorique	Ester, diester	Commun
Acide pyrophosphorique	Ester, diester	Commun, LPS
Acide triphosphorique	Ester	<i>Pseudomonas</i> , LPS
Glycérol	Ester phosphorique	Acides téichoïques
Ribitol	Ester phosphorique	Acides téichoïques
D-Arabinitol	Ester phosphorique	<i>Streptococcus</i> , EPS
Glucitol	-	<i>Streptococcus</i> , PS
Mannitol	Ester phosphorique	<i>Bacterium</i> , acides téichoïques
Ethanolamine	Ester phosphorique	Commun, LPS
Choline	Ester phosphorique	<i>Streptococcus</i> , EPS
2-Aminopropane-1,3-diol	Amide	<i>Shigella</i> , LPS

BU  
LILLE

a : les acides gras et les acides gras hydroxylés des LPS ainsi que les acides aminés des peptidoglycannes ne sont pas présentés.

b : abréviations : EPS, polysaccharides extracellulaires ;  
LPS, lipopolysaccharides.

Notre but n'était pas de faire une revue générale de tous les polysaccharides définis comme tel, mais simplement de proposer, dans un souci de simplification, une classification basée sur la composition et la structure répétitive de ces polymères.

L'établissement des corrélations entre la structure d'un polysaccharide et ses propriétés demande dans un premier temps la connaissance de sa structure primaire. Les moyens pour atteindre ce but sont multiples : certains sont examinés dans les chapitres suivants.

## II - METHODES CHIMIQUES DE DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES

### POLYSACCHARIDES.

La détermination de la structure primaire demande dans un premier temps une analyse globale qualitative et quantitative puis dans un deuxième temps une analyse plus fine permettant de déterminer la nature des liaisons entre les oses et la séquence de leur enchaînement.

Lors de notre exposé, il sera admis que les préparations de polymères sont exemptes de contaminants et présentent une bonne homogénéité physico-chimique.

#### A - ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

##### 1) Composition en oses

L'analyse globale du polysaccharide met en jeu des méthodes d'hydrolyse totale. Cette hydrolyse peut être réalisée à l'aide de différents acides minéraux ou organiques ; acide sulfurique (SEAMAN et al. (5), BLAKE et RICHARDS (6) ), chlorhydrique (DE BRUYNE et WOUNTERS (7) ), trifluoroacétique (ALBERSHEIM et al.(8), NEVINS et al.(9) ), formique (ROY et al.(10) ) ou par méthanolyse (LEVY et al.(11), HOUGH et al.(12) ). Les avantages et inconvénients de ces diverses méthodes ont fait l'objet de plusieurs articles de revues (BLAKE et RICHARDS (6), DUTTON (13) ).

Ces techniques, suivies de chromatographie sur papier et de chromatographie en phase gazeuse (C P G ou G L C) après transformation des sucres en dérivés volatils (sous forme d'éthers triméthylsilylés ou d'esters trifluoroacétylés), permettent de déterminer la nature et la quantité de chaque ose neutre constitutif de l'unité répétitive.

De plus, des colonnes de chromatographie liquide haute performance (C L H P ou H P L C) ont été récemment développées pour la séparation et l'analyse quantitative des oses (PECINA et al. (14) ).

Les oses acides se retrouvent, après hydrolyse, le plus souvent sous forme d'un oligosaccharide, acide uronique - ose neutre, appelé acide aldobionurique, où l'acide occupe la position terminale non réductrice. Cet oligosaccharide est particulièrement résistant aux méthodes classiques d'hydrolyse (HAMILTON et al. (15), ROUDIER et EBERHARD (16) ). Toutefois, par réduction de l'acide uronique sous forme de son ose neutre correspondant, on peut ensuite hydrolyser le disaccharide neutre obtenu et identifier ses constituants comme précédemment. Cette réduction peut être effectuée sur le polysaccharide natif qui devient composé uniquement d'oses neutres (TAYLOR et CONRAD (17) ) : le mécanisme réactionnel est présenté sur la figure 1 p. 16 .

## 2) Analyse des substituants

De nombreux résidus non glucidiques peuvent se greffer sur les polysaccharides (cf. tableau IV p.12 ). L'identification et l'analyse chimique de ces substituants sont dépendantes de leur libération totale.

Ainsi l'acide pyruvique est facilement libéré par hydrolyse acide et peut être spécifiquement identifié par l'utilisation de la pyruvate-lactate déshydrogénase (DUCKWORTH et YAPHE (18) ). Les groupements O-acyles (généralement O-acétyles) sont labiles en milieu basique, le résidu acide libéré étant dosé par titrimétrie ou C P G. Les groupements O-sulfates et O-phosphates sont aussi analysés après libération par hydrolyse acide (KENNEDY (19), KENNEDY et WESTMAN (20) ).

Beaucoup de ces composés ainsi libérés sont maintenant identifiés et dosés par C L H P sur colonne de polystyrène échangeuse de cations (PECINA et al. (14) ).

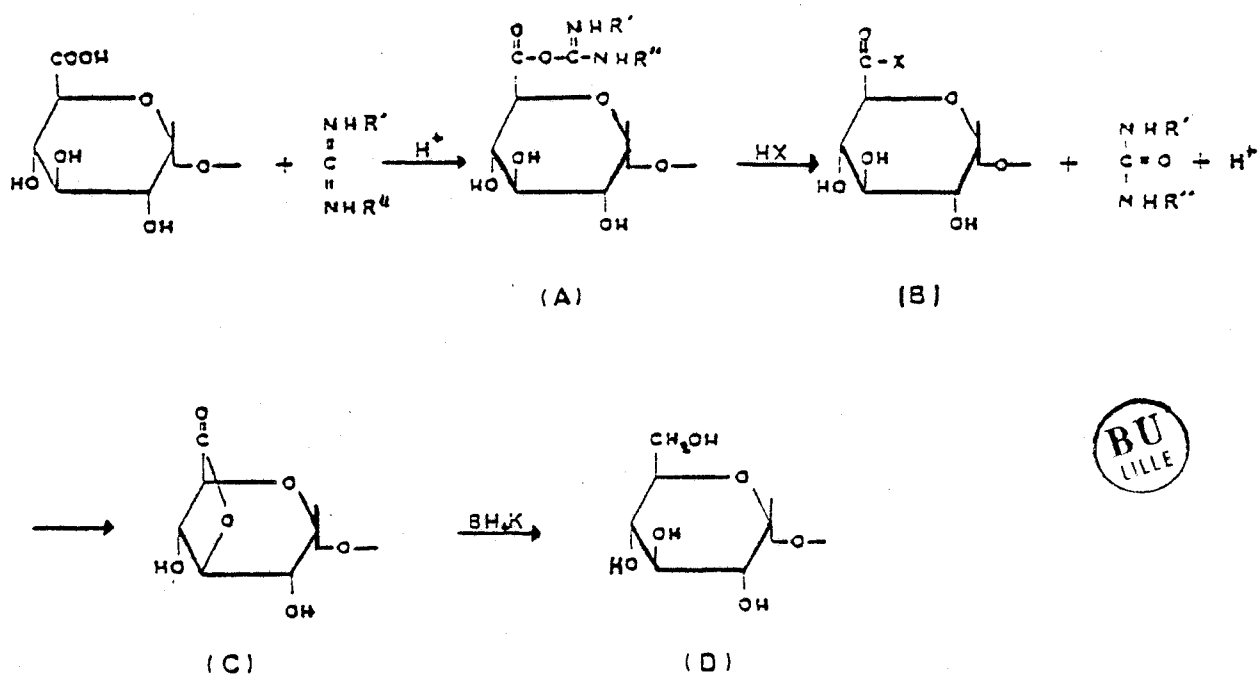


FIGURE 1

Mécanisme de la réduction au carbodiimide selon TAYLOR et CONRAD (17).



Citons enfin les méthodes spectroscopiques (résonance magnétique nucléaire (R M N ou N M R), infra-rouge (I R) ) qui sont couramment employées, permettant d'identifier et de doser ces substituants sur le polysaccharide natif (cf. chapitre III p.32 ).

## B - ANALYSE STRUCTURALE

### 1) Méthylation

#### a) Principes et procédés

La composition définie, il faut ensuite déterminer la nature des liaisons entre les monosaccharides. Ceci peut être fait grâce à la méthylation. C'est une étherification complète des hydroxyles libres du polysaccharide, obtenue par l'action d'un agent alkylant en milieu basique.

Cette réaction est fonction du réactif conduisant à la formation d'alcoolate et de la solubilité du polysaccharide dans un solvant polaire.

Diverses conditions réactionnelles sont possibles.

- Soude et diméthyl-sulfate pour la méthode d'HAWORTH (21) ;
- iodure de méthyle et oxyde d'argent selon PURDIE et IRVINE (22) ;
- diméthyl-formamide (D M F) et diméthyl - sulfoxyde (D M S O), oxyde d'argent et iodure de méthyle pour KUHN et al. (23,25), WALLENFELS et al. (24) ;
- sodium méthyl sulfinyl carbanion et iodure de méthyle pour HAKOMORI (26), méthode appliquée par LINDBERG (27).

Plus récemment, le potassium méthyl sulfinyl carbanion a été utilisé pour sa plus grande efficacité (DARVILL et al. (28), PHILLIPS et FRASER (29), FINNE et al. (30) ) et dernièrement le lithium méthyl sulfinyl carbanion et iodure de méthyle par PAZ PARENTE et al. (31).

Le procédé d'HAKOMORI et ceux au méthyl sulfinyl carbanion sont les plus utilisés pour les polysaccharides car ils fournissent, en un seul cycle de réaction, une alkylation quantitative du polymère.

Ces méthodes conduisent toutefois à l'estérification des acides uroniques présents dans certains polysaccharides : ces esters étant très sensibles à des réactions de  $\beta$ - élimination, il est important d'achever l'alkylation en une seule étape si l'on veut éviter la dégradation des acides uroniques en milieu basique.

Il est à noter que les substituants O-acyles sont libérés durant la méthylation alors que les liaisons acétaliques des résidus pyruvyles restent stables.

b) Caractérisation et analyse des oses partiellement méthylés après hydrolyse totale

L'hydrolyse totale du polysaccharide perméthylé libère les monomères dont seules les positions qui étaient impliquées dans les liaisons glycosidiques ne sont pas éthérifiées. Les oses partiellement méthylés peuvent être analysés par couplage C P G - spectrométrie de masse ( C P G - S M ou G L C - M S ) sous forme acétate d'alditol. En effet, ces dérivés donnent une fragmentation claire des molécules permettant un positionnement aisé des groupements méthyles et acétyles (LONNGREN et SVENSSON (32) , BJORN DAL et al.(33) ).

Dans certains cas, la fragmentation du composé étudié peut ne pas être caractéristique : une réduction de l'ose par du borodutérure de sodium permet de lever l'ambiguïté (BJORNDAL et al. (33)). De plus, l'utilisation d'iodure de méthyle deutérié permettra de mettre en relief le carbone 6 d'un acide uronique par reméthylation après réduction des esters carboxyliques du polysaccharide perméthylé.

c) Caractérisation et analyse des oligosaccharides méthylés obtenus après hydrolyse partielle.

Il est possible d'analyser des oligosaccharides méthylés par couplage C P G - S M ou plus récemment par couplage C L H P - S M, l'obstacle majeur étant la purification de ces oligosaccharides qui sont en mélange.

Une application de ces méthodes analytiques a été proposée par VALENT et al. (34) : elle consiste en un fractionnement de produits d'hydrolyse partielle de polysaccharides permettant ainsi d'effectuer des études de séquence sur les oligosaccharides purifiés ainsi obtenus.

Le protocole expérimental est le suivant :

- hydrolyse partielle du polysaccharide méthylé
- réduction au borohydrure de sodium
- éthylation
- fractionnement par C L H P
- analyse des oligosaccharides purifiés par couplage C P G - S M après hydrolyse, réduction et acétylation des produits.

2) Dégradation sélective

Connaissant l'identité de chaque monomère et la position des liaisons qui les relient, il reste à déterminer la séquence de l'unité répétitive. Pour ce faire, diverses techniques sont utilisables. Elles tirent parti de la présence de fonctions chimiques particulières sur le polysaccharide. Les résidus portant ces fonctions sont susceptibles de modifications par des réactions chimiques appropriées ce qui a pour effet de fragiliser la chaîne oligosaccharidique à ce niveau.

Les deux méthodes principalement utilisées sont :

a) La dégradation uronique (β - élimination)

Cette réaction met en jeu les esters carboxyliques des acides uroniques de la chaîne, les autres hydroxyles étant protégés (KISS (35) ). La réaction se fait en milieu basique selon le schéma présenté sur la figure 2.

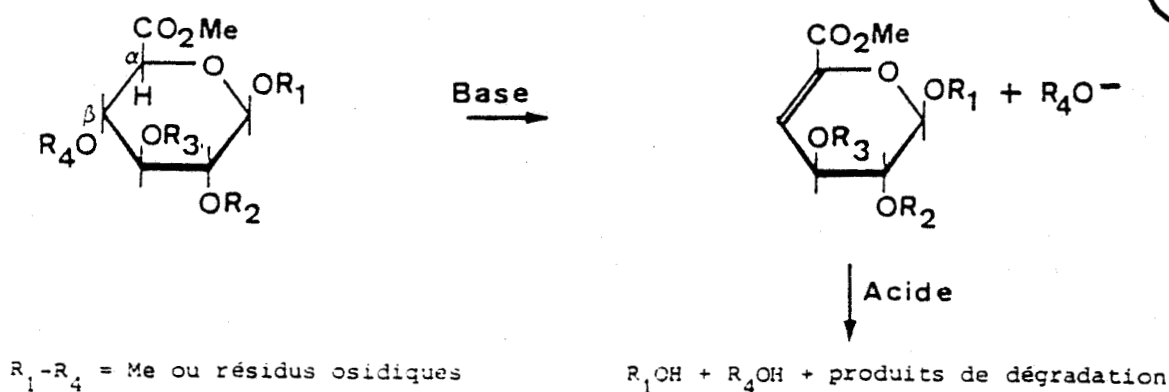


FIGURE 2

Mécanisme de la β - élimination d'après CURVALL et al. (36).

L'effet attracteur du carboxyle rend l'hydrogène en  $\alpha$  labile. Il peut être facilement éliminé sous l'action d'une base forte, provoquant ainsi le départ du substituant en  $\beta$ . Le dérivé  $\alpha\beta$  insaturé ainsi formé présente un groupement énol-acétate labile en milieu acide. Ainsi, par hydrolyse ménagée, seul ce dérivé est clivé alors que les autres liaisons inter-glycosidiques sont préservées. Une application de cette technique à la rupture sélective d'une chaîne oligosaccharidique de *Klebsiella* sérotype K 41 est décrite sur la figure 3 p.22 (LAPEYRE (37)).

### b) Oxydation périodique - Dégradation de SMITH

Cette réaction consiste en une oxydation par le périodate des  $\alpha$  glycols des unités osidiques suivie, après réduction, d'une hydrolyse douce ne clivant que les liaisons acétaliques acycliques formées après oxydation, ce qui permet l'isolement de fractions oligosaccharidiques entières constituées de monosaccharides non susceptibles à l'action du périodate (MALAPRADE (38), BOBBITT (39), GOLDSTEIN et al.(40) ). Cette réaction donne une indication générale sur la nature des liaisons entre les monosaccharides. Nous avons résumé dans la figure 4 p. 23 les résultats de l'oxydation périodique de l'unité de répétition du polysaccharide de *Klebsiella* sérotype K 19 (BEURRET (41) ).

### 3) Hydrolyse chimique partielle

La mise en oeuvre des techniques précédentes ne permet pas toujours d'élucider la structure du polysaccharide : c'est le cas, par exemple, de polymères qui ne possèdent pas d'acide uronique ce qui empêche l'utilisation de la  $\beta$  - élimination.

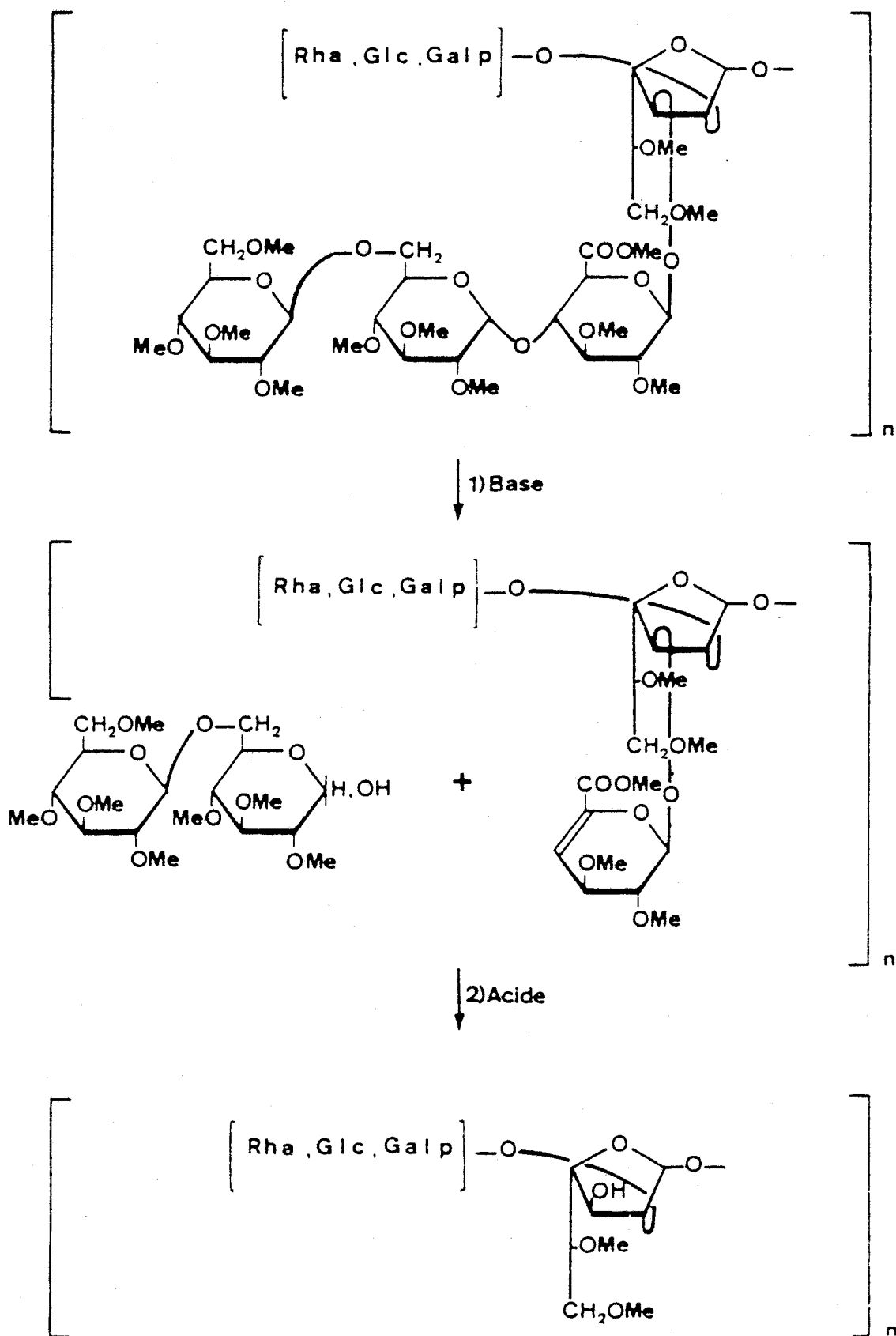
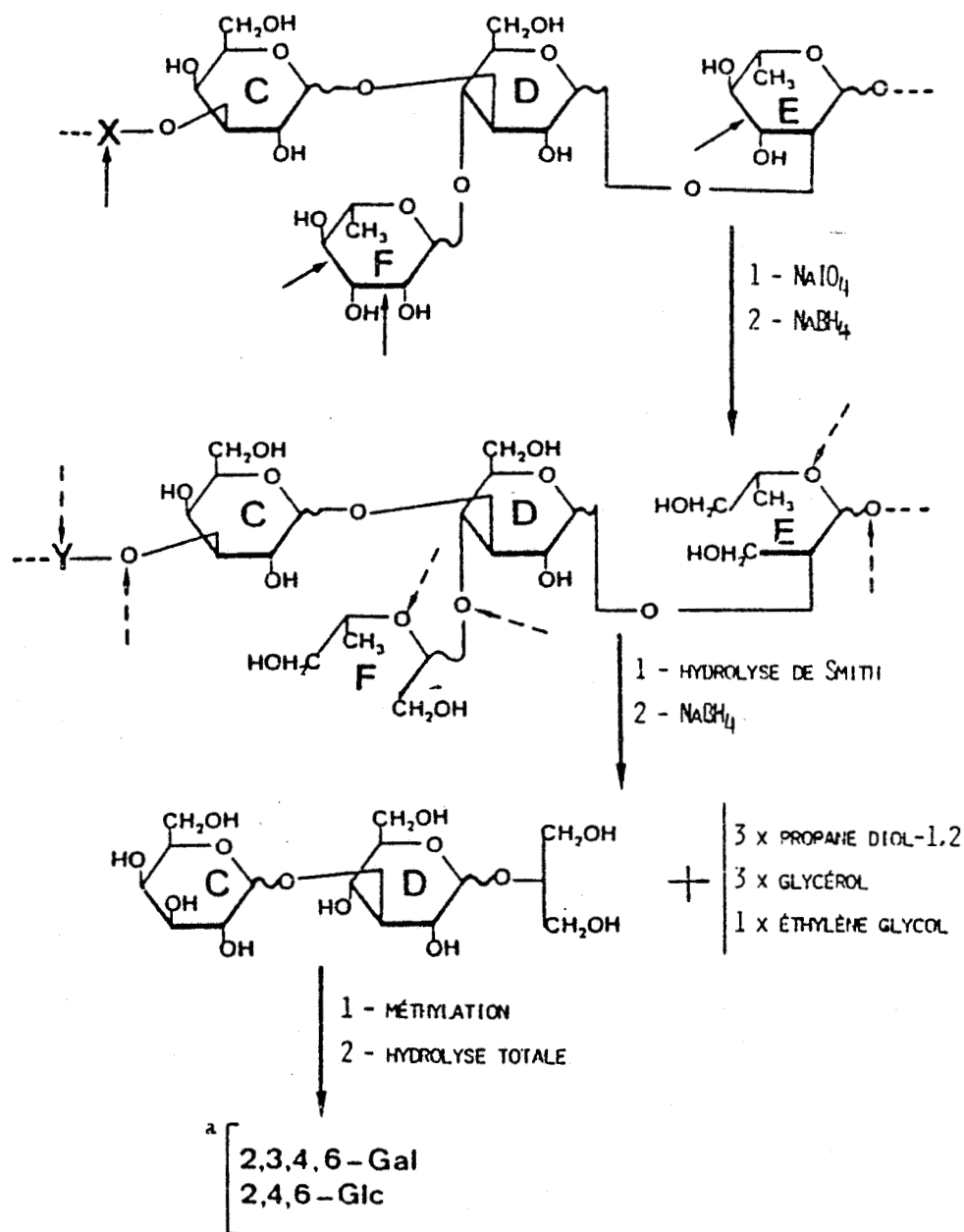


FIGURE 3

Modalités de la  $\beta$  - élimination sur K 41 perméthylé (LAPEYRE (37) ).

### K19-RC / NaIO<sub>4</sub>



BU  
LILLE

FIGURE 4

Oxydation au periodate et dégradation de SMITH de K 19 (BEURRET (41) ).

- > : site clivé par le periodate
- > : site clivé par l'hydrolyse
- X : résidu sujet à l'oxydation
- Y : résidu oxydé
- a : après réduction et acétylation

Lorsqu'une telle situation favorable n'existe pas ou lorsque les résultats obtenus sont insuffisants pour déterminer totalement la séquence de l'unité répétitive, on peut avoir recours à d'autres méthodes connues qui fournissent des oligosaccharides. Ces oligomères sont séparés et purifiés par chromatographie et étudiés séparément. Par recouvrement, on arrive à reconstituer l'ordre d'enchaînement des monosaccharides.

a) Hydrolyse acide en milieu aqueux

Les liaisons  $\alpha$  -D- glycopyranosidiques sont généralement plus facilement hydrolysées que les  $\beta$ . De plus, les liaisons (1  $\rightarrow$  6) sont généralement plus résistantes que les autres. Enfin, les oses de configuration fūranique sont clivés de dix à cent fois plus rapidement que les monosaccharides pyraniques. Ces constatations permettent donc, par utilisation de conditions hydrolytiques appropriées, d'isoler des oligosaccharides sélectionnés, plus faciles à étudier: C'est ainsi que, utilisant la grande stabilité des liaisons uronosidyles aux agents d'hydrolyse, il est aisé d'obtenir par hydrolyse ménagée à l'acide sulfurique (SEAMAN et al. (5) ) un disaccharide appelé acide aldobiouronique (acide uronique - ose neutre) sur lequel il est aisé d'identifier la nature du monosaccharide conjugué par l'acide uronique.

b) Hydrolyse acide en milieu non aqueux - Acétolyse

L'acétolyse partielle consiste en un traitement du polysaccharide par un mélange d'anhydride acétique - acide acétique - acide sulfurique. Les oligosaccharides résultant sont alors désacétylés par du méthoxyde de sodium ou de baryum pour être ensuite chromatographiés et analysés séparément.



Contrairement à l'hydrolyse acide partielle en milieu aqueux, l'acétolyse coupe préférentiellement les liaisons (1 → 6). Ce procédé permet donc d'obtenir des informations précises sur certains types de liaisons présents dans l'unité de répétition.

Cette technique est particulièrement intéressante pour l'étude de polysaccharides branchés dont la chaîne latérale est conjuguée sur le squelette de base par des liaisons (1 → 6) : c'est le cas, par exemple, de certains polysaccharides exocellulaires de *Rhizobium*.

#### 4) Oxydation chromique

Le trioxyde de chrome en présence d'acide acétique clive, avec une grande stéréosélectivité, les glycopyranosides acétylés orientés de façon équatoriale ( $\beta$ ) alors que les glycosides acétylés orientés axialement ( $\alpha$ ) ne réagissent pas. Cette réaction est donc utilisée pour la détermination des anoméries de liaison (HOFFMAN et al.(42)). Une application de ce procédé à un polysaccharide de *Klebsiella* sérotype K2 est présenté sur la figure 5 p. 26 (BRUVIER (43) ).

#### 5) Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique, complément de l'hydrolyse chimique, est surtout utile dans le cas de polysaccharides dont la structure est en partie établie. Le nombre de plus en plus important d'osidases purifiées et très spécifiques permet d'obtenir des oligomères variés dont la structure et la composition apportent des informations que l'on ne peut parfois pas obtenir par voie chimique.

Certains polysaccharides sont, en outre, des substrats pour des bactériophages dont les endo-enzymes très spécifiques (NIEMANN et al.(44) ),

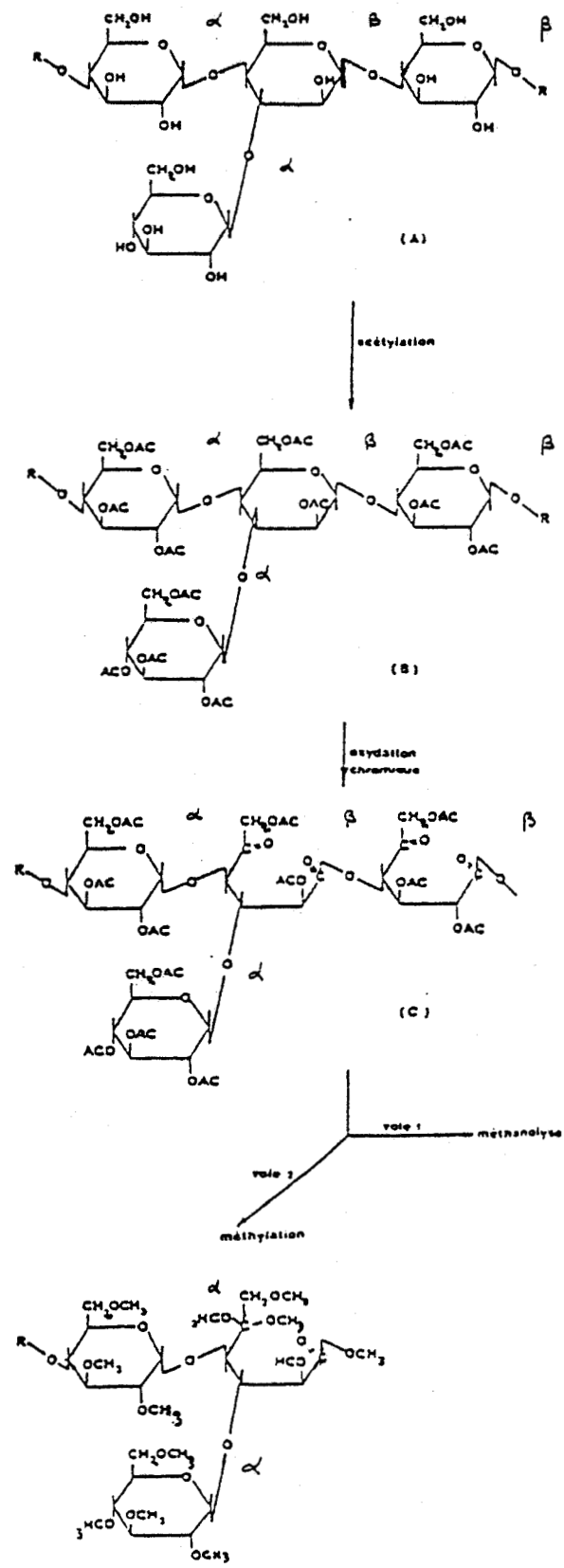


FIGURE 5

Mécanisme de l'oxydation chromique sur K2 (BRUVIER (43) ).

existant sous forme soluble ou liée aux phages, clivent des liaisons osidiques particulières déterminées de façon précise par la nature des oses engagés, la position et l'anométrie de la liaison (SUTHERLAND et WILKINSON (45) ). Les produits de dégradation représentent souvent l'unité de répétition du polysaccharide (DUTTON et al. (46), DUTTON et al. (47) ). La figure 6 p. 28 illustre l'action du phage 19 ( $\Phi$  19) sur la structure répétitive du polysaccharide capsulaire de *Klebsiella pneumoniae* sérotype K 19 (EURRET (41) ).

Des oligomères peuvent être également obtenus par hydrolyse chimique (cf. 3)) mais dans tous les cas, les substituants (pyruvyles, succinyles, acétyles, etc..) présents sur la chaîne oligosaccharidique sont clivés. Or, le positionnement de ces résidus est fondamental. En effet, les propriétés, en particulier rhéologiques et immunologiques, de ces polymères sont déterminées en partie par le nombre et l'emplacement de ces substituants. C'est ainsi que l'utilisation du phage correspondant au polysaccharide capsulaire de *Klebsiella* sérotype K 54 a permis de confirmer la présence de groupements acétyles sur les oligosaccharides isolés (SUTHERLAND (48) ) et de mesurer chez K 21 la proportion exacte de résidus pyruvyles (DUTTON (46) ).

De la même façon, il a été possible d'identifier et de localiser des résidus formyles (esters) chez K 54 (SUTHERLAND (49) ), K2 (SUTHERLAND (50) ) et K 63 (DUTTON et MERRIFIELD (51) ), (résultats non confirmés par DELL et al. (52) ) et dernièrement des groupements acétyles chez K 44 (DUTTON et KARUNARATN (53) ).

La plupart des phages des différents sérotypes de *Klebsiella* ont été isolés : ils sont en général spécifiques d'un seul substrat, plus rarement de deux, voire trois (RIEGER - HUG et STIRM (54) ).

Ces techniques enzymatiques sont très précieuses : en effet, elles libèrent, avec une grande spécificité, des oligomères beaucoup plus faciles à étudier par des méthodes chimiques (technique au méthyl vinyl éther de DE BELDER et NORRMAN (55) ) et spectroscopiques (résonance magnétique nucléaire, infra-rouge). En effet, les polysaccharides natifs présentent très souvent une très haute viscosité qui limite les possibilités d'étude :

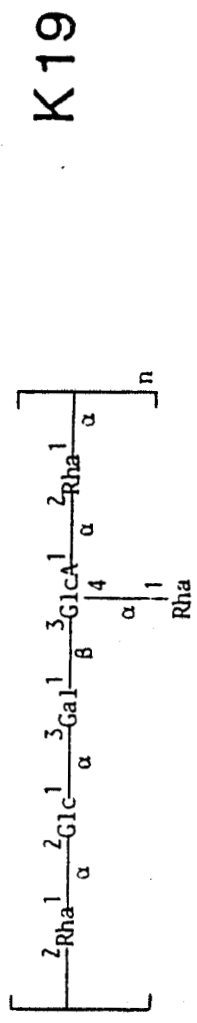
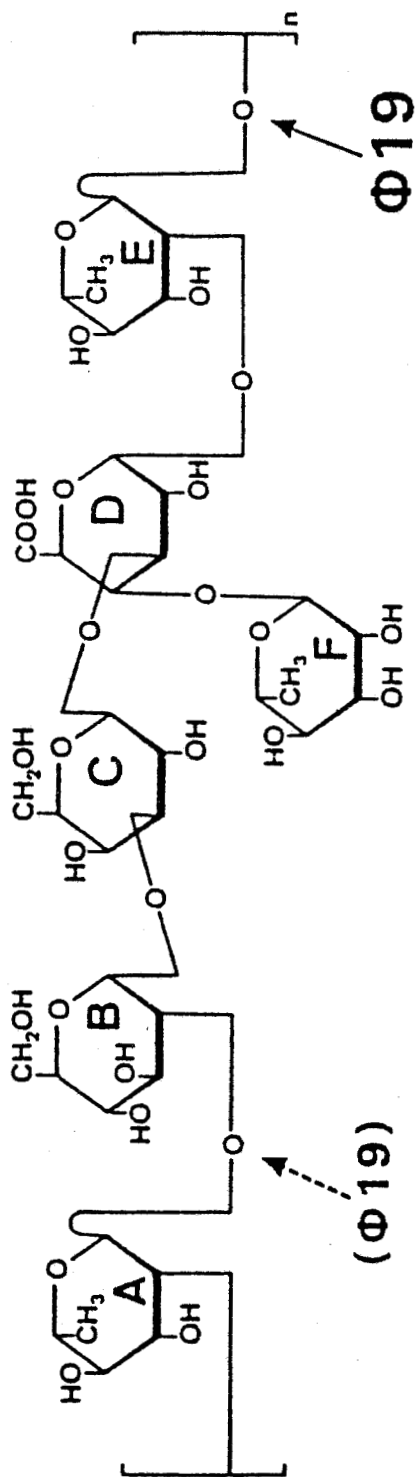


FIGURE 6

Site d'action du phage 19 (  $\Phi 19$  ) sur K 19 (BEURRET (41) ).

→ : site principal du clivage  
 - - - - -> : site secondaire



difficulté d'accessibilité des réactifs sur le polysaccharide, spectres mal définis obtenus à partir d'une solution de viscosité élevée.

Toutefois, encore peu de bactériophages sont disponibles ou même identifiés. C'est dans cette direction que s'orientent actuellement les recherches sur les polysaccharides.

#### 6) Localisation des substituants

Nous avons vu que certains polysaccharides possèdent naturellement des substituants de nature ester (sulfate, phosphate, acétate, etc...) et de nature acétalique (pyruvate).

La difficulté de donner la localisation exacte de ces résidus réside dans le fait que ces groupements sont très labiles soit en milieu acide (pyruvate, sulfate) soit en milieu basique (acétate). Ces propriétés sont toutefois mises à profit pour la localisation de ces substituants.

##### a) Groupements O - sulfates

Ces substituants sont stables en milieu basique mais libérés en milieu acide. Par méthylation du polysaccharide original et du polymère désulfaté, suivie d'une hydrolyse, on peut obtenir l'information concernant la localisation de ce composé.

La désulfatation des polysaccharides peut être réalisée par traitement au méthanol chlorhydrique quelques heures à température ambiante (PERCIVAL (56)) et ce sans dégradation du polymère, sauf si celui-ci contient des résidus très sensibles à l'action des acides : 3,6 - anhydro par exemple.

b) Substituants O - acyles (O - acétyles, etc...)

La méthode la plus satisfaisante est celle développée par DE BELDER et NORRMAN (55). Elle met en jeu la substitution des hydroxyles libres du polymère par la réaction au méthyl vinyl éther, suivie d'une O - désacétylation et d'une méthylation. L'hydrolyse du polysaccharide ainsi modifié fournit des monosaccharides méthylés sur les sites qui portaient à l'origine des groupements O - acétyles.

c) Localisation des résidus d'acide pyruvique

L'hydrolyse selon LEW et HEIDELBERGER (57) à l'acide sulfurique dilué libère quantitativement ces résidus pyruvyles qui sont toutefois stables en milieu alcalin. Par comparaison des résultats de méthylation avant et après dépyruvatisation du polysaccharide, il est possible de localiser ce constituant.

C - CONCLUSION

Pour conclure ce chapitre, il est clair qu'aucune des méthodes décrites ci-dessus n'est en soi suffisante mais toutes sont complémentaires pour déterminer la structure d'un polysaccharide. Ces polymères étant très souvent composés d'unités de répétition, l'obtention de ces motifs par des enzymes phagiques conduira plus facilement à la détermination de la séquence primaire. Dans tous les autres cas, des méthodes de rupture chimique permettront d'isoler des fragments oligosaccharidiques qui pourront être analysés par couplage CLHP - SM (AMAN et al. (58) ).

Une autre méthode est très prometteuse : la spectrométrie de masse FAB - MS (*fast atom bombardment - mass spectrometry*). Elle consiste à ioniser une molécule native ou substituée, dissoute dans une matrice de glycérol ou de thioglycérol, par des atomes lourds de type Xénon ou Argon. Cette technique douce d'ionisation permet d'obtenir l'ion moléculaire. L'utilisation de ce mode de spectrométrie de masse a permis à DELL *et al.* (59) de déterminer les masses moléculaires de plusieurs oligosaccharides réduits et peracétylés isolés du lait humain ainsi que les masses moléculaires d'oligosaccharides et glycosphingolipides natifs (pour lesquels ils obtiennent l'ion pseudomoléculaire  $M + Na^+$ ), perméthylés, peracétylés. De la même façon, DELL et BALLOU (60) ont analysé par FAB un lipopolysaccharide et un polysaccharide mycobactérien ainsi que ses dérivés acétylés : de l'analyse du pic moléculaire obtenu pour le polysaccharide, ces auteurs ont confirmé le degré de polymérisation et ils ont révélé l'hétérogénéité dans le degré de méthylation du polymère.

L'application des techniques modernes de couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse avec sélection d'ions (GLC-MS MSIM : *gas liquid chromatography - mass spectrometry multiple selected ion monitorings*) permet d'obtenir des informations précieuses sur la séquence d'oligosaccharides et de polysaccharides par perméthylation suivie de l'analyse des éthers méthyliques. C'est ainsi que WAEGHE *et al.* (61) ont déterminé la nature des liaisons glycosidiques à partir de 1  $\mu$ g de disaccharide et de 5  $\mu$ g d'un polysaccharide acide secrété par la souche 127 de *Rhizobium phaseoli* K36 . De même, PAZ PARENTE *et al.* (31), à l'aide de la même méthodologie, mais utilisant une base de méthylation plus propre (lithium méthyl sulfinyl carbanion), réalisent l'analyse d'éthers méthyliques sur 10  $\mu$ g de glycanes isolés d'ovomucoïde du blanc d'oeuf de poule.

Enfin, depuis ces dix dernières années, des méthodes spectroscopiques non destructives (résonance magnétique nucléaire, infra-rouge, Raman) se sont développées sur la base des séquences primaires de polysaccharides pré-établies à l'aide des procédés décrits ci-dessus.

### III - METHODES SPECTROSCOPIQUES

#### A - RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE ( RMN OU NMR)

Cette technique étudie l'absorption moléculaire, dans le domaine des fréquences radio, de l'ordre du mégahertz (MHz), c'est à dire à des longueurs d'onde d'une dizaine de mètres. Le type d'énergie qui est utilisé concerne les noyaux en présence d'un champ magnétique extérieur.

La RMN est maintenant couramment employée dans l'étude structurale des polysaccharides de par les avantages qu'elle présente.

En effet, la RMN n'est pas destructive : elle permet d'étudier un polymère sans le modifier ni le dégrader.

Jusqu'à très récemment, son utilisation était limitée aux solutions, excluant les polysaccharides de faible solubilité (très visqueux) : le développement de la RMN à haute résolution du carbone  $^{13}\text{C}$  (RMN -  $^{13}\text{C}$ ) pour des composés solides permet à présent de résoudre ce problème en préservant les propriétés physico-chimiques des polymères. De plus, l'emploi de la RMN à transformée de Fourier (FT) pulsée, en augmentant le rapport signal/bruit (S/N), permet d'utiliser des concentrations beaucoup plus faibles de produit, ce facteur étant très important dans le cas de la RMN -  $^{13}\text{C}$  (ALLERHAND (62) ).

Ces méthodes très sensibles sont d'un grand apport car elles permettent de préciser l'anométrie des liaisons glycosidiques grâce aux déplacements chimiques  $\delta$  et aux constantes de couplage J qui sont sensibles à la configuration des groupements concernés (HALL (63), KOTOWYCZ et LEMIEUX (64), PERLIN (65)). D'autre part, les spectres obtenus donnent des informations claires sur le nombre de résidus osidiques présents dans l'unité de répétition des polysaccharides.



Les deux techniques les plus couramment employées sont la RMN du proton (RMN -  $^1\text{H}$ ) et la RMN du carbone 13 (RMN -  $^{13}\text{C}$ ).

1) RMN -  $^1\text{H}$

Cette méthode nécessite peu de produit purifié mais elle offre une résolution moyenne lorsque l'échantillon est un polymère du fait du nombre très important de signaux recueillis. Néanmoins, un spectre est enregistré assez rapidement et surtout, les couplages indiquent nettement les anoméries.

Pour simplifier les analyses, les hydroxyles sont transformés en deutéroxyles par échange dans l'eau lourde. Ainsi, seuls les signaux des protons apparaissent, les noyaux deutérium résonnant dans une autre gamme de fréquence. On ne voit également que les couplages  $^3\text{J}_{\text{H,H}}$  entre les protons portés par des carbones voisins, les couplages  $^3\text{J}_{\text{H,D}}$  étant trop faibles pour être visualisés. Malgré cela, un pic correspondant au signal de l'eau résiduelle (HOD) est souvent observé ; il interfère avec les signaux des protons anomériques des résidus  $\beta$ - glucopyranosyles. Ce problème peut être évité en déplaçant le signal de l'eau par augmentation de la température, pratique qui de surcroît améliore la qualité des spectres, les signaux s'accroissant nettement.

L'information spectrale recueillie, son traitement par transformée de Fourier permet non seulement d'éliminer les signaux parasites en améliorant le rapport signal/bruit mais aussi de diminuer l'interférence due au signal de l'eau (SYKES et PATT (66), MARSHALL et al. (67)).

Le tableau V p.34 présente les caractéristiques d'un spectre de RMN -  $^1\text{H}$ . Les protons anomériques (H1) se détachent assez bien des autres pics : leurs déplacements chimiques ( $\delta$ ) indiquent l'anomérie  $\alpha$  ou  $\beta$ . Les constantes de couplage  $^3\text{J}_{\text{H,H}}$  entre les protons anomérique et du carbone 2 sont également caractéristiques des anoméries avec des valeurs plus faibles

TABLEAU V

Déplacements chimiques  $\delta$  et constantes de couplage  ${}^3J_{H,H}$  entre les protons anomérique et du carbone 2 de quelques fonctions chimiques. RMN -  ${}^1H$ .

Fonctions	(ppm)	${}^3J_{H,H}$ (Hz)
H6 des 6 - déoxy-hexoses ( $CH_3C$ )	1,2 - 1,3	6
Pyruvyle ( $CH_3C$ )	1,5 - 1,6	
Acétamido ( $CH_3CON$ )	1,8 - 2,1	
Acétyle ( $CH_3CO_2$ )	2,0 - 2,2	
H2 à H6	3,5 - 4,5	
H5	4,5 - 4,6	
H2 et H3 des formes furaniques )	4,2 - 4,5	10
H5 des acides uroniques )		
H1 axial ( $\beta$ )	4,5 - 4,8	7 (Rhamnose : ) ( ${}^3J_{H,H} = 1$ )
H1 équatorial ( $\alpha$ )	5,3 - 5,8	4 (Rhamnose : ) ( ${}^3J_{H,H} = 1,8$ )
Hydroxyle (OH)	5,0 - 5,4	
HCO <sub>2</sub>	5,9	



pour les liaisons  $\alpha$  que pour les liaisons  $\beta$ . Ces différences s'expliquent par les relations d'orientations axiales et équatoriales qui existent entre les protons considérés. KARPLUS (68) a montré que la constante de couplage dépend de l'angle dièdre  $\Phi$  formé par les liaisons transmettant ce couplage. Au grand angle ( $180^\circ$ ) correspond un grand couplage, celui-ci diminuant lorsque l'angle diminue ; il est nul pour un angle de  $90^\circ$  et réaugmente ensuite si l'angle continue de diminuer, pour atteindre un second maximum plus faible lorsque l'angle est nul. Bien qu'avec des réserves car d'autres facteurs interviennent, cette règle générale est applicable aux hydrates de carbone. Ainsi dans la série du D-glucopyranose, et pour les oses présentant la même configuration sur le carbone 2, dans la configuration  $\beta$ , ces deux protons occupent des positions relatives axiale-axiale, l'angle formé est maximum ( $\Phi = 180^\circ$ ), le couplage est donc maximum (voir figure 7 ci-dessous).

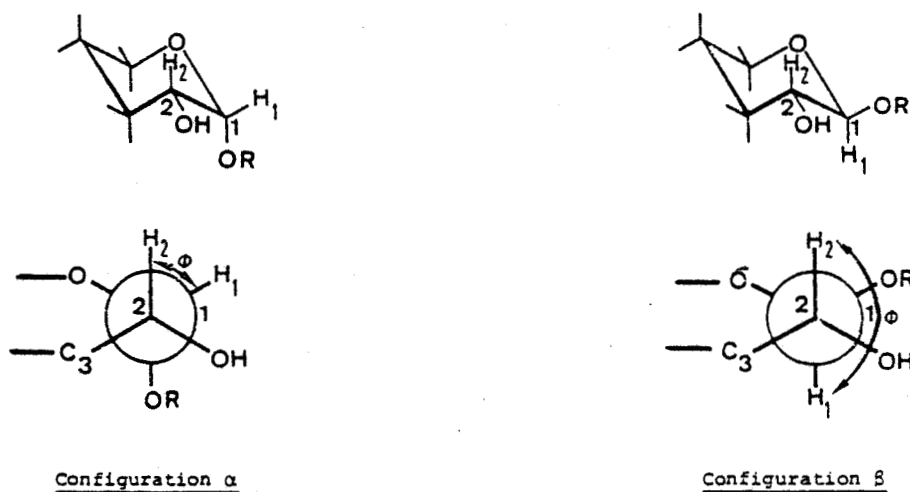


FIGURE 7

Variation de l'angle dièdre  $\Phi$  en fonction de la configuration du carbone anomère dans la série du D-glucopyranose (conformation  ${}^4C_1$ ).

Nous avons rassemblé dans le tableau VI p.36 (PERLIN et CASU (69)) les constantes de couplage des protons de monosaccharides constitutifs de polysaccharides. Nous constatons que les valeurs  ${}^3J_{H,H}$  voisines de 3

TABLEAU VI

Valeurs de constantes de couplage  $^3J_{H,H}$  entre les protons anomérique et du carbone 2 pour quelques monosaccharides (PERLIN et CASU (69)).

Monosaccharides	$^3J_{H_1, H_2}$ (Hz)
<b>Glucopyranose</b>	
Amylose	3
Dextrane	3
Lichenane	7,5
<b>2 - Déoxy - 2 - sulfaminoglucopyranose</b>	
Héparine	3,6
<b>Galactopyranose</b>	
<i>Klebsiella</i>	3
<b>2 - Acétamido - 2 - déoxygalactopyranose</b>	
Chondroïtines	7
<b>Rhamnopyranose</b>	
<i>Klebsiella</i>	1
<b>Acide glucopyranosyluronique</b>	
Chondroïtines	8
<b>Acide idopyranosyluronique</b>	
Héparine	2,6
Dermatane	3



correspondent à des anomères  $\alpha$  alors que les valeurs voisines de 7 correspondent à des anomères  $\beta$ . Toutefois, les monosaccharides de configuration *manno* posent un problème compte tenu de la position équatoriale de leur proton en 2 (cf. figure 8 ci-dessous).

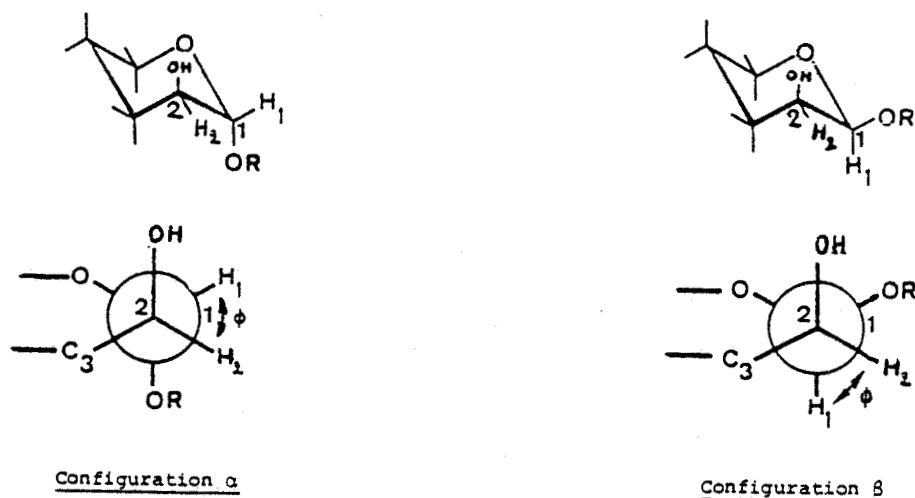


FIGURE 8

Variation de l'angle dièdre  $\phi$  en fonction de la configuration du carbone anomère pour les oses de configuration *manno*.

Cette disposition explique les valeurs de couplage voisines pour les protons anomériques  $\alpha$  et  $\beta$ . Ceci rend difficile l'identification des anoméries pour ces monosaccharides (DE BRUYN et al.(70)).

## 2) RMN - $^{13}\text{C}$

La RMN -  $^{13}\text{C}$  à transformée de Fourier est ici obligatoire du fait de la faible quantité de carbone 13 rencontrée naturellement (1,1 %). Cette technique nécessite donc plus de produit (environ 50 mg) que la RMN -  $^1\text{H}$  pour obtenir un spectre correct.

Les informations fournies (par exemple le nombre de résidus osidiques dans l'unité répétitive) sont néanmoins très claires. Les utilisateurs pallient au manque de quantité d'échantillon par un très grand nombre d'acquisitions. Aux fréquences 15 - 25 MHz, correspondant à 60 - 100 MHz en RMN -  $^1\text{H}$ , on obtient déjà une séparation nette des signaux des différents carbones. La RMN à haut champ est toutefois nécessaire pour analyser des polysaccharides peu solubles ou donnant des solutions très visqueuses.

Les principales données fournies par les déplacements chimiques d'un spectre RMN -  $^{13}\text{C}$  sont présentées dans le tableau VII p. 39. Les carbones anomériques (C1) s'individualisent nettement, leurs déplacements chimiques indiquant s'il s'agit d'une anomérie  $\alpha$  ou  $\beta$  sauf dans le cas du rhamnose (configuration *manno*). Les groupements méthyles apparaissent à haut champ (C6 des 6 - déoxy-hexoses à 16 ppm). Les hexoses  $\beta$  - furaniques présentent des signaux caractéristiques (C2, C3, C4 des formes furaniques entre 83 et 87 ppm).

Quatre procédures sont utilisées en RMN -  $^{13}\text{C}$ .

### a) Découplage total (complete proton decoupling ou proton noise decoupling)

En irradiant aux fréquences de résonance des protons, on supprime totalement les couplages carbone-proton mais pas les couplages carbone-deutérium, qui ne sont d'ailleurs pas visualisés puisqu'on n'enrichit pas l'échantillon en deutérium en RMN -  $^{13}\text{C}$ . Les couplages

TABLEAU VII

Déplacements chimiques  $\delta$  et constantes de couplage  $^1J_{C,H}$ , entre le carbone anomérique (C1) et son proton, pour quelques fonctions chimiques.

Fonctions	(ppm)	$^1J_{C,H}$ (Hz)
C6 des 6 - déoxy - hexoses (CH <sub>3</sub> C)	16 - 18	
Pyruvyle (CH <sub>3</sub> C)	22 - 25	
CH <sub>3</sub> COH } CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> }	20 - 23	
Acétyle	30	
CH <sub>2</sub> C	38	
CH <sub>3</sub> O	55 - 61	
CH (NH)	58 - 61	
C6 libres (CH <sub>2</sub> OH)	60 - 65	
C2 à C5 } C6 liés }	65 - 80	
C2, C3, C4 des formes furaniques	83 - 87	
C1 libre, axial (extrémité réductrice)	90 - 95	
C1 libre, équatorial (extrémité réductrice)	95 - 98	
C1 lié, axial ( $\alpha$ )	98 - 103	170
C1 lié, équatorial ( $\beta$ )	103 - 106	160
C1 lié des hexoses furaniques ( $\beta$ )	106 - 109	172,5
COOH	174 - 175	
C = O	175 - 180	
C6 (COOH des acides uroniques)	186	



homonucléaires carbone-carbone ne peuvent apparaître que si l'échantillon est enrichi en carbone 13.

L'irradiation des protons provoque l'effet Overhauser nucléaire (NOE) qui tend à faire baisser le rapport signal/bruit et à augmenter les signaux des carbones portant un ou plusieurs protons.

Tous les signaux apparaissent sous forme de singulets ; il est donc possible de déduire le nombre de résidus osidiques de l'unité répétitive. Le NOE perturbant l'intensité des pics, il est impossible de savoir si un signal représente un ou plusieurs carbones identiques.

b) Technique antigate

Elle consiste à effectuer un découplage total, comme précédemment, mais sans NOE.

Pour cela, on n'irradie et n'enregistre que pendant une très courte durée et à des intervalles relativement espacés. En effet, pour enregistrer, il faut que les signaux soient totalement relaxés ; or, le NOE est cinq fois plus lent à s'installer que l'effet de relaxation et, d'autre part, le découplage est instantané. Le NOE s'établit donc après l'enregistrement et disparaît entre deux acquisitions. Le rapport signal/bruit augmente et les signaux sont plus faibles que précédemment mais leurs intensités sont comparables car directement proportionnelles au nombre de carbones créant le signal.

Les signaux des carbones quaternaires (ne portant aucun proton), n'étant pas affectés par le NOE, ont la même intensité que précédemment.



c) Découplage partiel (off resonance)

Les couplages  $^1J_{C,H}$  subsistent mais les couplages indirects ( $^2J$ ,  $^3J$ , etc...) sont supprimés par une irradiation monochromatique. Le NOE subsiste en partie. On distingue aisément les différents types de carbones : les carbones quaternaires (apparaissant sous forme de singulets), tertiaires (doublets), secondaires (triplets), primaires (quadruplets). Cette technique permet de mesurer les constantes de couplage  $^1J_{C,H}$  des carbones 1 (C1), qui ont des valeurs caractéristiques de l'anométrie.

d) Irradiation sélective (hétéronucléaire ou double)

C'est aussi un découplage partiel mais on supprime le couplage  $^1J_{C,H}$  d'un carbone particulier en irradiant à la fréquence du proton qu'il porte. Le signal de ce carbone apparaît sous forme de singulet et bénéficie complètement du NOE : son intensité est donc plus forte que celle des autres signaux.

3 - RMN d'autres noyaux

Alors que la RMN -  $^{13}C$  permet aussi d'analyser certains polysaccharides microbiens phosphorylés, les couplages  $^3J_{^{31}P,^{13}C}$  donnant des informations intéressantes sur la conformation (BUNDLE et al.(71)), la RMN -  $^{23}Na$  peut s'avérer très utile dans le cas de sels de sodium de polysaccharides acides (HERWATS et al.(72)). En outre, il est possible d'examiner des polymères enrichis en deutérium (BARNOUD et al. (73), GORIN (74)) tritium,  $^{17}O$ ,  $^{15}N$  et bien sûr  $^{13}C$  (GAGNAIRE et TARAVEL (75), LONDON et al.(76))

4) Apports de la RMN -  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  dans l'étude structurale des polysaccharides

Ces méthodologies permettent donc, par calcul du nombre et de l'intensité des signaux, de déterminer la nature et le rapport des différents constituants d'un polymère : pour ce faire, la RMN -  $^{13}\text{C}$  est plus efficace car elle fournit, après découplage, des spectres sur lesquels les singulets sont bien individualisés.

D'autre part, la détection de certains signaux permet d'identifier des contaminants introduits, par exemple lors d'une étape de purification chromatographique (DIETRICH et al.(77) ).

Les résonances anomériques étant bien séparées des signaux produits par la plupart des autres noyaux, il devient plus aisé de déterminer le nombre et la proportion relative des monosaccharides ainsi que leurs configurations anomériques.

De nombreuses études structurales de polysaccharides font désormais appel à la RMN :

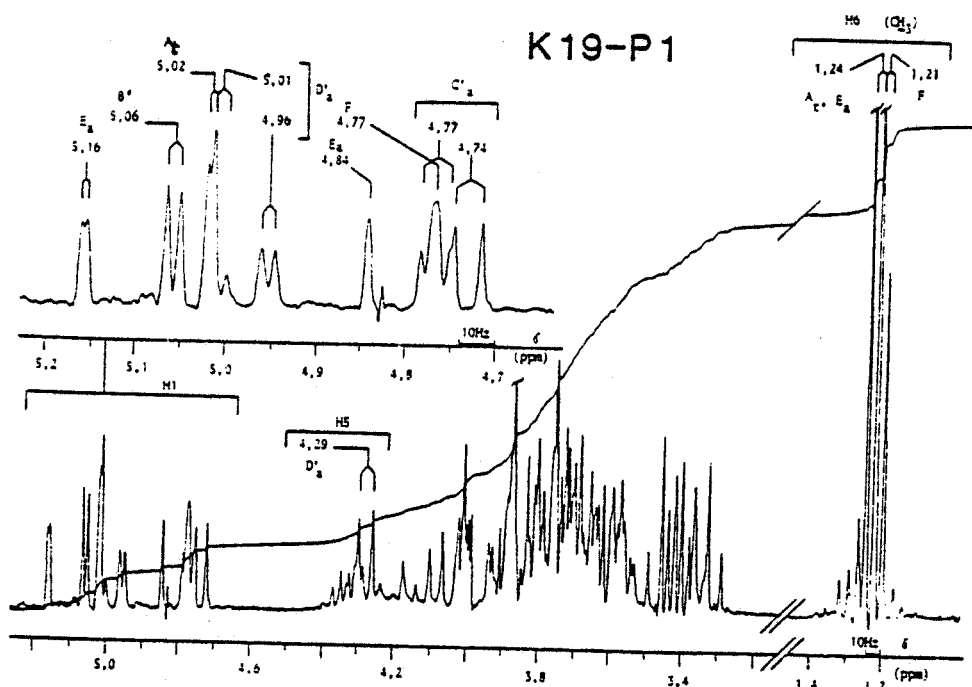
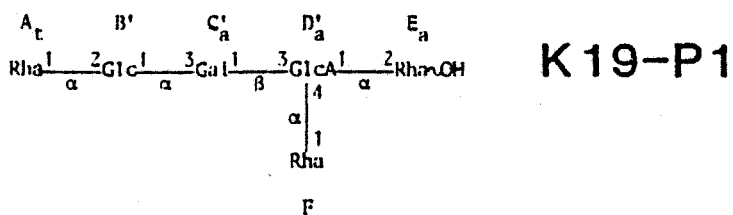
- les dextrans pour lesquels la RMN -  $^1\text{H}$  et surtout la RMN -  $^{13}\text{C}$  ont permis d'apporter des précisions structurales qui ne pouvaient pas être données par des méthodes chimiques (COLSON et al.(78), PASIKA et CRAGG (79), GAGNAIRE et VIGNON (80), SIDEBOTHAM et al.(81), BOURNE et al. (82), USUI et al.(83), SEYMOUR et al.(84), FRIEBOLIN et al.(85), SEYMOUR et al.(86 - 91)). L'analyse du dextrane B - 742 prouva sans ambiguïté la présence d'une faible quantité (9%) de liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) en plus des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (57%) et des liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) (34%). Les études comparées par méthylation et RMN -  $^{13}\text{C}$  sur le degré

de branchement des dextranes prouvèrent l'accord des deux méthodes sur les conclusions (SEYMOUR et al. (88, 89, 91) ).

- Les mannanes des levures ont aussi très souvent fait l'objet d'études spectroscopiques, surtout dans les régions anomériques où la plupart de ces homopolymères donnent des signaux très bien résolus (aussi bien en RMN -  $^1\text{H}$  qu'en RMN -  $^{13}\text{C}$ )(GORIN et al. (92 - 96), MENDONCA-PREVIATO et al.(97), GORIN et al.(98), BARRETO- BERGTER et al.(99) ).

Pour les polysaccharides composés de plusieurs monosaccharides différents, la RMN malgré la complexité des spectres obtenus, est un outil efficace pour l'étude structurale : les investigations de la structure des polysaccharides capsulaires de *Klebsiella* en sont un exemple. Ces polymères, ainsi que les oligosaccharides obtenus par hydrolyse (acide, enzymatique), ont été analysés par RMN -  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et parallèlement par des méthodes chimiques (DUTTON et FOLKMAN (100), JOSELEAU et al. (101), CHOY et DUTTON (102), BERRY et al.(103), DUTTON et SAVAGE (104), CHENG et al. (105), DUTTON et al.(46), OKUTANI et DUTTON (106) ).

Nous avons rassemblé dans les figures 9 et 10 p 44 et 45 (BEURRET (41)). les résultats de l'analyse par RMN -  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de l'oligosaccharide de répétition de *Klebsiella* sérotype K19 obtenu par action du phage  $\phi$  19. En ce qui concerne la RMN -  $^1\text{H}$ , on constate que les deux signaux du rhamnose à 5,16 et 5,02 ppm présentent un couplage caractéristique d'une anomérie  $\alpha$  ( $^3\text{J}_{\text{H,H}} = 1,5 \text{ Hz}$ ). D'autre part, des signaux d'hexoses sont perturbés par la présence de l'extrémité réductrice : les signaux H1 du galactose  $\beta$  et de l'acide glucuronique  $\alpha$  (Glc A) sont dédoublés, correspondant aux deux formes anomériques du rhamnose  $\sim \text{OH}$  (Rha  $\sim \text{OH}$ ).



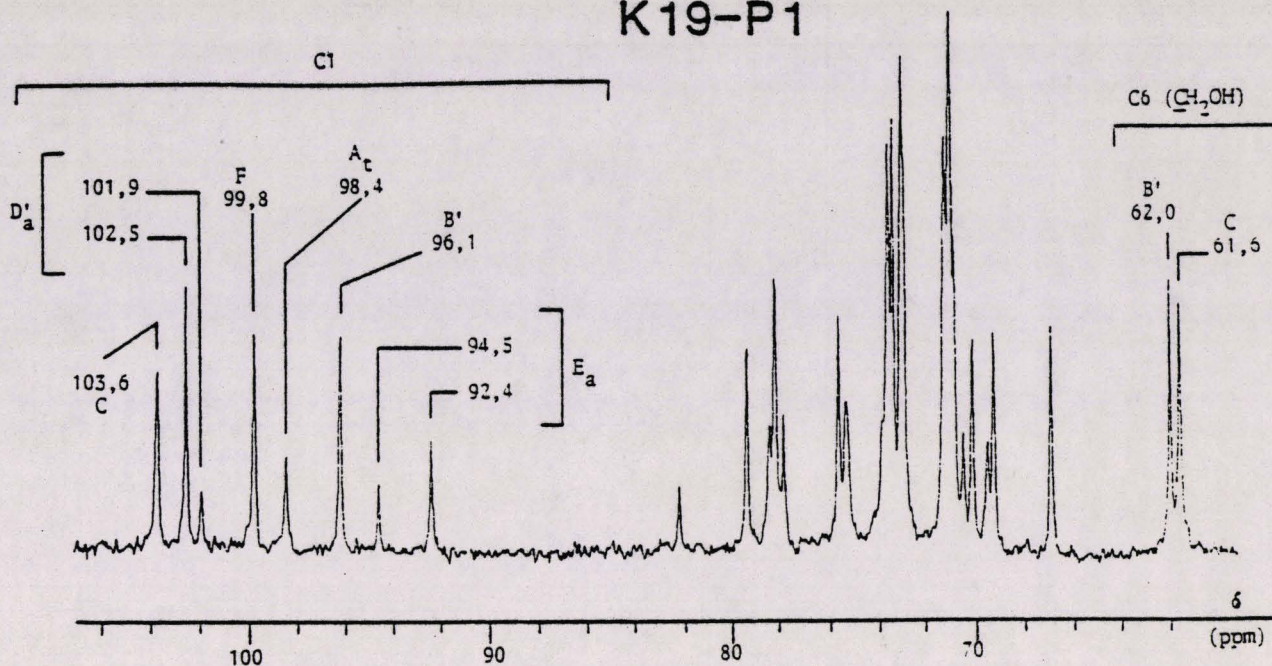
signaux	δ (ppm)	$^3J_{\text{H,H}}$ (Hz)	intégration (proton)	attribution
E <sub>a</sub>	5,16	d 1,5	0,8	Rha <sub>5</sub> OH hexose c Rha <sub>α</sub> hexose α "β" hexose α "α" Rha <sub>β</sub> OH Rha <sub>α</sub> Gal <sub>β</sub> "β" Gal <sub>α</sub> "α" H1
B'	5,06	d 4,0	1,1	
A <sub>c</sub>	5,02	d 1,5	1,5	
D' <sub>a</sub>	5,01	d ~3,5	0,7	
	4,96	d 3,5	0,7	
E <sub>a</sub>	4,84	s -	0,5	
F	4,77	s -	1,3	
C' <sub>a</sub>	4,77	d 7,5	0,9	
	4,74	d 7,5	0,9	
D' <sub>a</sub>	4,29	d 10,0	1,3	
A <sub>c</sub> , E <sub>a</sub>	1,24	d 6,0	9,0 6,0 d	Rha <sub>α</sub> , Rha-OH H6 (CH <sub>3</sub> )
F	1,21	d 6,0	9,0 5,0 d	



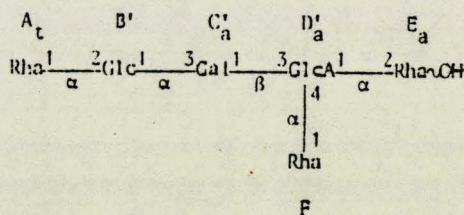
FIGURE 9

RMN - <sup>1</sup>H de K19 - P1 à 250 MHz et 85°C. Référence : acétone (δ = 2,17ppm par rapport au TMS) (BEURRET (41)).

# K19-P1



K19-P1		
signaux	$\delta$ (ppm)	attribution
C	103,6	Gal <sub>3</sub>
D' <sub>a</sub>	102,5	GlcA <sub>α</sub> "α"
	101,9	GlcA <sub>α</sub> "g"
F	99,8	Rha <sub>τα</sub>
A <sub>t</sub>	98,4	Rha <sub>α'</sub>
B'	96,1	Glc <sub>α</sub>
E <sub>a</sub>	94,5	Rha <sub>γ</sub> OH
	92,4	Rha <sub>γ</sub> OH
		] C1
B'	62,0	Glc <sub>α'</sub>
C	61,6	Gal <sub>3</sub>
		] C6 (CH <sub>2</sub> OH)
A <sub>t</sub> , E <sub>a</sub> , F	17,5	Rha <sub>α</sub> , Rha <sub>τα</sub> , Rha <sub>γ</sub> OH
		] C6 (CH <sub>2</sub> OH)



K19-P1

FIGURE 10

RMN - <sup>13</sup>C de K19 - P1. Découplage total ; 25,2 MHz ; 80°C. Référence : acétone ( $\delta = 31,07$  ppm par rapport au TMS)(BEURRET (41) ).

En ce qui concerne la RMN -<sup>13</sup>C, on constate que chaque carbone anomérique C1 donne un signal, celui du rhamnose donnant deux déplacements à 92,4 ppm et 94,5 ppm qui correspondent aux anoméries  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement. Cette perturbation engendre sur le C1 du monosaccharide suivant (Glc A) un double signal à 102,5 ppm et 101,9 ppm.

### 5) Conclusion

La résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 constitue à ce jour une méthodologie indispensable à l'étude de la séquence primaire des oligo - et polysaccharides. Cette technique, complémentaire des méthodes chimiques courantes, permet en outre d'étudier la conformation de ces polymères. La connaissance des structures primaires et de la conformation de ces biopolymères permet de comprendre leurs propriétés : ceci explique l'utilisation croissante de ces méthodologies.

## B- SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE ET RAMAN

### 1) Principes et procédés

La matière peut émettre ou absorber de la lumière, la longueur d'onde émise par la molécule étant identique à celle absorbée. L'émission de lumière implique que la molécule subisse un apport d'énergie, généralement fournie sous forme de chaleur. Comme les molécules organiques sont sensibles à la chaleur, il est impossible d'étudier leurs spectres d'émission : la spectroscopie envisagée est donc généralement une spectroscopie d'absorption.

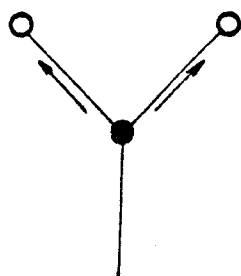
Les spectroscopies Infra-Rouge et Raman sont deux formes de spectroscopie vibrationnelle. En effet, une molécule peut absorber de l'énergie électromagnétique sans changer l'état énergétique de ses électrons. Elle peut transformer cette énergie en énergie de vibration intéressant les atomes et les liaisons chimiques qu'elle renferme. Les spectres de vibration peuvent être examinés soit au moyen du rayonnement Infra-Rouge proche et moyen, soit avec l'effet Raman. Les mesures en Infra-Rouge s'effectuent à peu près comme en spectroscopie ultra-violette, seuls différant les détecteurs et les sources. Pour les mesures en Raman, on met à profit le fait que lorsqu'un faisceau de lumière intense traverse un milieu transparent, une petite fraction de la lumière est diffractée par les molécules et ce avec des longueurs d'onde différentes de celle de la lumière incidente. Pour obtenir un spectre Raman, on envoie, à travers une cellule contenant l'échantillon à étudier, une radiation monochromatique et on recueille la lumière diffractée. Toutefois la spectroscopie Raman n'a pas encore pris l'importance de la spectroscopie Infra-Rouge du fait du temps assez long nécessaire à l'obtention d'un spectre exploitable. En outre, l'apparition d'appareils à transformée de Fourier permet à la spectroscopie Infra-Rouge de fournir des résultats encore affinés.

A chaque type de liaison inter-atomique (simple ou multiple) correspondent deux types de vibrations fondamentales :

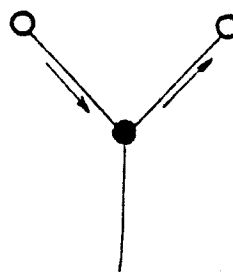
- les vibrations dites de valence ou d'élongation (*stretching*), entre deux atomes considérés, dans lesquelles la distance entre les deux croît et décroît, ceux-ci restant dans l'axe de la liaison.
- les vibrations de déformation angulaire (*bending*) dans lesquelles la position des atomes change par rapport à l'axe de la liaison originale.

Ces deux types de vibrations sont représentés sur la figure

Vibrations de valence ou d'élongation

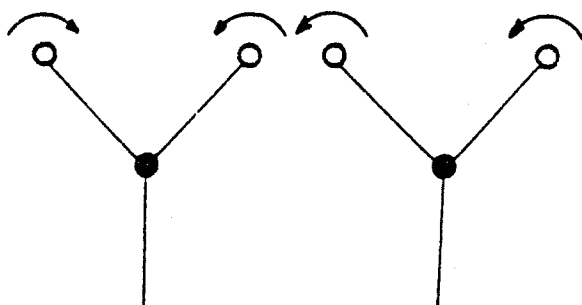


symétrique



asymétrique

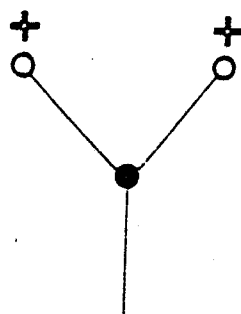
Vibrations de déformation angulaire



cisaillement

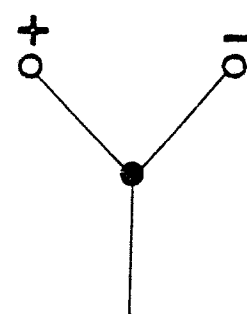
dans le plan

rotation plane



balancement

hors du plan



torsion



(les signes + et - symbolisent des vibrations perpendiculaires au plan du papier).

FIGURE 11

Types de vibrations fondamentales dans les molécules sous l'effet d'une radiation infra-rouge.



Nous avons résumé dans le tableau VIII p. 50 les fréquences d'absorption caractéristiques de quelques groupes fonctionnels classiquement rencontrés dans les polysaccharides (PERLIN et CASU (69) ).

2) Applications à la détection de groupements fonctionnels présents dans les polysaccharides

Les fréquences de vibrations des liaisons sont fonction de la constante de force de la liaison et de la masse des atomes : les double-liaisons absorbent (ou émettent) donc à des fréquences plus hautes que les simple-liaisons constituées des mêmes atomes.

De plus, pour des liaisons ayant les mêmes constantes de force, la fréquence de vibration décroît quand augmentent les masses des atomes (COLTHUP et al.(107), JONES et SANDORFY (108)).

Il est donc important de savoir que les vibrations, dans un système moléculaire, ne sont pas isolées les unes des autres. Ceci est évident pour des molécules aussi complexes que les polysaccharides, constitués de nombreuses liaisons carbone-carbone ou carbone-oxygène, atomes possédant les mêmes masses et constantes de force : l'analyse coordonnée de glucose et glucanes a confirmé ce fait (VASKO et al.(109) ).

En dépit de ces limitations, des groupes de fréquences peuvent être associés à la présence de tel ou tel groupement fonctionnel. Les bandes les plus intéressantes sont celles émanant des vibrations de liaisons multiples (C = O) ou des liaisons simples formées entre deux atomes de masse très différentes (O - H, N - H, C - H). Ces vibrations donnent des bandes caractéristiques en Infra-Rouge.

C'est le cas des groupements carboxyliques dont la raie à  $1710 \text{ cm}^{-1}$  indique sans ambiguïté la présence.

TABLEAU VIII

Fréquences d'absorption Infra-Rouge de quelques groupes fonctionnels  
(PERLIN et CASU (69) ).

Groupe	Forme	Stretching (cm <sup>-1</sup> )	Mode de vibration <sup>a</sup>
O - H	libre	3650 - 3600	s O - H
O - H	lié	3600 - 3200	
		1100 - 1050	b O - H
C - H		2900 - 2800	s C - H
		1470 - 1380	b C - H
COOH	Monomère	1760	s C = O
COOH	Dimère	1710	s C = O
COO <sup>-</sup>		1600 - 1550	s' C = O
		1450 - 1400	s' C = O
CONH		3300 - 3250	s N = H
		3100 - 3070	
		1650	s C = O
		1550	b N - H
COOR		1735	s C = O
		1250	s C - O - C
S = O (Sulfates)		1240	s' S = O
S = O (Sulfonates)		1200 - 1150	s S = O
NO <sub>2</sub> (Nitrates)		1640 - 1620	s' N = O
		1285 - 1270	s N = O

a : s = *stretching* symétrique  
 s' = *stretching* asymétrique  
 b = *bending*



Quelques groupes fonctionnels donnent plus d'une bande : c'est le cas des ions carboxylate et des liaisons amide (cf tableau VIII p. 52) : l'utilisation de l'eau lourde comme solvant est très utile pour l'observation des fonctions carboxylique et acétamido (GOULDEN et SCOTT (110), BOCIEK et WELTI (111), CASU et al. (112)) : les bandes sont en effet beaucoup mieux résolues en solution acide (COOD et ND - CO) qu'en milieu neutre (COO<sup>-</sup> et ND - CO).

Des bandes de faible intensité dans la région 900 - 800 cm<sup>-1</sup>, associées aux vibrations des groupes C - O - S, sont présentes sur les spectres Infra-Rouge des polysaccharides sulfatés (ORR (113), LLOYD et al. (114)). Toutefois, bien que des fréquences à 825 cm<sup>-1</sup> et 855 cm<sup>-1</sup> aient été décrites comme caractéristiques des fonctions sulfate (position équatoriale et axiale) (ORR (113)), ces attributions ne peuvent être généralisées (HARRIS et TURVEY (115)). Ces conclusions valent aussi pour les bandes présentes dans la zone 890 - 800 cm<sup>-1</sup>, caractéristiques des groupes sulfonyloxy (CHALK et al. (116)).

Hormis la possibilité d'examiner la présence de certaines fonctions chimiques au sein d'un polymère, ces méthodes spectroscopiques permettent aussi, dans une certaine mesure, d'analyser la configuration des monosaccharides. En effet des bandes de faible intensité à 891 ± 7 cm<sup>-1</sup> et 844 ± 8 cm<sup>-1</sup> ont été associées aux configurations axiale et équatoriale des liaisons anomériques C - H, présument de l'anomérisation β ou α respectivement (BARKER et al. (117)). Des bandes similaires ont été aussi observées sur les spectres Raman de monosaccharides (SHE et al. (118)), dextranes (CAEL et al. (119)), cellulose (ATALLA et DIMICK (120)) et d'amylose et ses oligomères (CAEL et al. (119), VASKO et al. (121)).

Pour conclure de chapitre, nous avons rassemblé dans la figure 12 p. 52 les résultats de l'analyse par Infra-Rouge de l'agar isolé de *Gracilaria verrucosa* (CHRISTIAEN (122)). Les pics à 930 cm<sup>-1</sup> et à 1070 cm<sup>-1</sup> correspondent à la vibration du pont 3,6-anhydro galactose. Les bandes à 1180 cm<sup>-1</sup>, 1250 cm<sup>-1</sup>, 1370 cm<sup>-1</sup> représentent les liaisons ester-sulfates tandis que le pic à 1410 cm<sup>-1</sup> caractérise la liaison S=O. Le léger décro-

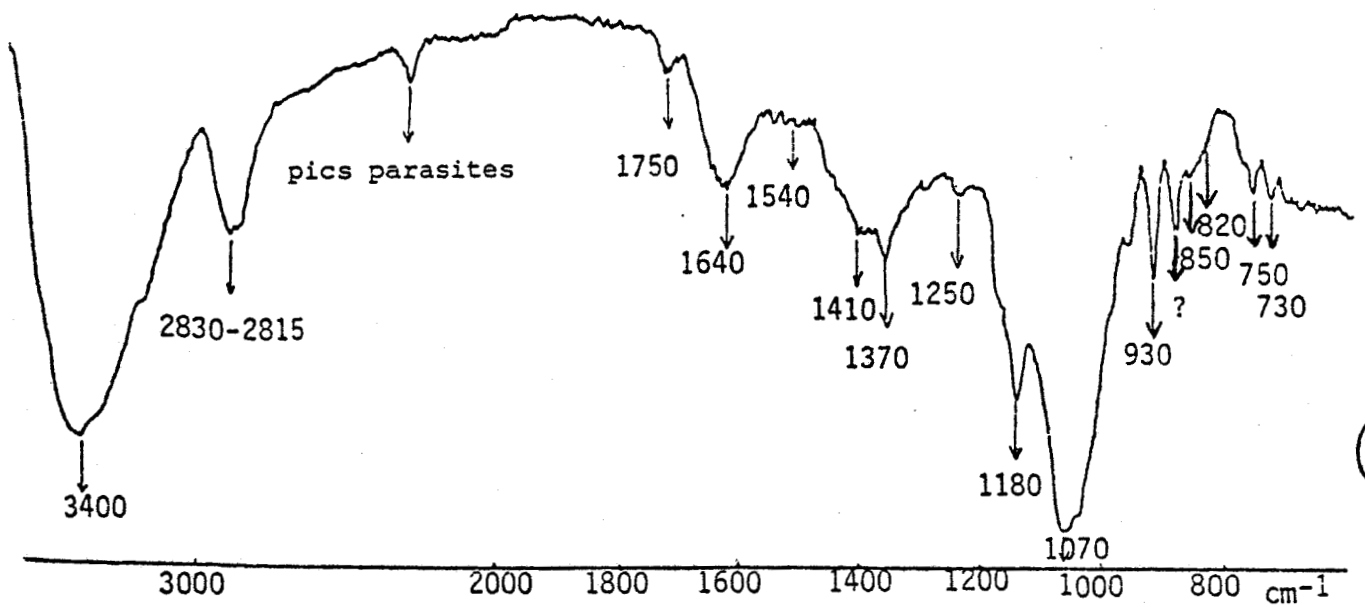


FIGURE 12

Spectre Infra-Rouge d'un film d'agar-agar extrait de *Gracilaria verrucosa* (CHRISTIAEN (122) ).

chement à  $820 - 830 \text{ cm}^{-1}$  correspondrait à un sulfate sur le carbone 6. L'épaule de la courbe à  $850 \text{ cm}^{-1}$  traduirait la présence d'une liaison C - O - S axial sur le carbone 4 du galactose. Le couple de pics à  $1640 \text{ cm}^{-1}$  et  $1540 \text{ cm}^{-1}$  indiquerait la présence d'une liaison CO - NH, alors que ceux à  $2830 \text{ cm}^{-1}$  et  $2815 \text{ cm}^{-1}$  résultent de la liaison O-CH<sub>3</sub>. Enfin, la bande à  $1750 \text{ cm}^{-1}$  prouve la présence d'un groupement carboxylique.

### 3) Conclusion

La détermination de la structure fine des polysaccharides par ces méthodes spectroscopiques sera bientôt plus exploitée, et ce lorsque les analyses complètes de vibrations auront été effectuées. Il est certain qu'à l'heure actuelle, la méthode de choix reste la RMN. Toutefois, par conjugaison de ces différentes techniques spectroscopiques, il sera beaucoup plus aisé d'élucider la séquence primaire de nombreux biopolymères.

#### IV - UTILISATION INDUSTRIELLE DES POLYSACCHARIDES

Depuis très longtemps, les polysaccharides extraits de végétaux supérieurs ou d'algues (cellulose, amidons, gommés, alginates) ont permis de répondre, de par leur abondance et la diversité de leurs propriétés à l'état naturel ou modifié, aux besoins essentiels des industries papetières, textiles, alimentaires et autres.

Ces principaux polymères, ainsi que certains polysaccharides microbiens, sont classés dans le tableau IX p.55 (SANDFORD et BAIRD (123)).

Pour parvenir à une application industrielle, un polymère doit être étudié dans les 3 domaines suivants :

- la composition chimique : tous les résidus doivent être identifiés et dosés afin d'apprécier la pureté des produits préparés
- les caractéristiques biologiques : les biopolymères doivent faire l'objet de recherches sur leur toxicité éventuelle (YIN et al. (124)). Par exemple, dans le cas de polysaccharides bactériens (Gram -), la présence de lipopolysaccharides, souvent toxiques, doit être décelée.
- les propriétés physiques : la valeur industrielle des biopolymères réside dans leur aptitude à modifier les propriétés rhéologiques des solutions aqueuses, soit en formant des gels, soit en modifiant leurs propriétés d'écoulement. Ces polysaccharides doivent être, si possible, relativement insensibles à la présence de différents ions, à différentes températures, à des pH variés. Enfin, les interactions que peuvent avoir ces macromolécules avec d'autres substances sont un élément supplémentaire en vue d'une application potentielle.

TABLEAU IX

Classification des polysaccharides naturels ou semi-synthétiques d'importance industrielle (SANDFORD et BAIRD (123) ).



---

Polysaccharides d'algues	: extraits d'algues rouges	: agar, carraghénanes
	extraits d'algues brunes	: alginates
Polysaccharides de plantes	: exsudats de plantes	: gomme arabique, ghatti, karaya, tragacathe
	: graines	: gommes guar et dérivés, caroube
	: extraits de plantes	: pectine, gomme de mélèze
Dérivés de cellulose	: carboxyméthylcellulose (CMC), hydroxyéthylcellulose (HEC), méthylcellulose, cellulose microcristalline	
Polysaccharides microbiens	: commercialisés	: gomme xanthane, dextrane
	: en développement	: sclérogucane, cur- dlane, pullulane, alginates

---

A - DOMAINES D'APPLICATION

1) Alimentation

C'est l'application principale de la plupart des biopolymères qui sont utilisés comme agents gélifiants, épaississants, stabilisants, émulsifiants, liants et même comme inhibiteurs de cristallisation en assurant une protection contre la formation de cristaux de glace.

2) Médecine

Certaines de ces substances sont employées comme immunostimulants ou conjuguées à des enzymes pour former des glycoprotéines à circulation rapide dans l'organisme.

3) Agriculture

Certains polysaccharides protègent les racines des arbres contre la dessiccation en maintenant une gangue hydrophile. Cette propriété est également utilisée pour favoriser la germination des graines.

Dans l'industrie des herbicides et pesticides, ils jouent un rôle d'agents de suspension.

4) Industries diverses

Les polysaccharides peuvent être utilisés comme :

- absorbants dans les industries de peinture
- apprêts pour modifier les propriétés des habits ou du papier afin de faciliter l'adhérence des colorants ou des encres



- stabilisateurs des peintures à l'eau
- émulsifiants dans l'émail des céramiques
- gélifiants des explosifs, agents de dessiccation de la dynamite
- liants et épaississants des produits cosmétologiques
- agents de "récupération assistée" du pétrole.

Les progrès réalisés dans divers secteurs de la biotechnologie ont ouvert des perspectives nouvelles en ce qui concerne la production de polysaccharides d'origine microbienne (bactéries et champignons). Il est maintenant possible d'obtenir, par fermentation, des biopolymères dont les propriétés, notamment les caractéristiques rhéologiques en solution, sont au moins équivalentes à celles des produits traditionnels. L'exemple des xanthanes et des scléroglycanes, qui ont atteint le stade de la commercialisation, illustre cette possibilité de valorisation de biopolymères originaux. D'autres produits sont actuellement à l'étude ou en cours de développement.

Il est certain que ces produits de fermentation ont encore un coût de fabrication élevé et, de ce fait, ne remplaceront pas totalement les polymères traditionnels.

Cependant, les structures infiniment variées des polysaccharides microbiens leur confèrent des propriétés nouvelles, voire originales.

Leurs principaux débouchés restent les domaines alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, qui offrent les applications à plus grande valeur ajoutée. Il faut également citer le secteur très attractif de la récupération assistée des hydrocarbures pour laquelle la recherche de produits nouveaux et efficaces est particulièrement intense.

## B - APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES EXOPOLYSACCHARIDES MICROBIENS

### 1) Les xanthanes

Produits par *Xanthomonas campestris* en milieu de fermentation purement aérobie, ces polymères sont constitués de mannose, glucose et d'acide glucuronique dans des rapports 2/2/1 (JANSSON et al.(125) ) et organisés en unités répétitives. Certains de ces résidus sont substitués par des groupements pyruvyles et acétyles. Selon les conditions de culture de la souche, les concentrations en pyruvate du polysaccharide sont modifiées, ce qui fournit des biopolymères de propriétés rhéologiques différentes. (CADMUS et al.(126) ). Les solutions aqueuses de xanthane donnent des émulsions stables non affectées par les variations de température, pH ou par des concentrations salines élevées (MORRIS et al. (127) ).

Ces propriétés uniques font que ce polymère est largement utilisé dans les secteurs industriels aussi divers que l'alimentaire, la peinture, les explosifs, les cosmétiques.

### 2) Les dextranes

Ce sont des  $\alpha$  glucanes produits par différents genres de bactéries : *Klebsiella*, *Acetobacter*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*.

Chaque lignée bactérienne synthétise un dextrane unique mais le point commun à toutes ces macromolécules est la prépondérance de liaisons  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  (JEANES et al. (128) ). Quelques-uns sont constitués exclusivement de ce type de liaison alors que d'autres peuvent contenir des liaisons  $\alpha(1 \rightarrow 2)$  ou  $\alpha(1 \rightarrow 3)$  ou encore  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  : les propriétés

rhéologiques et la solubilité seront différentes selon les proportions et types de liaisons présentes et selon leur arrangement au sein de chaque molécule.

La synthèse des dextranes est exocellulaire, le substrat (par exemple le glucose) ne pénétrant pas dans la cellule. La production de dextranes peut se faire sans aération et en présence de dextranes de faible poids moléculaire qui servent d'amorces.

Des dextranases sont utilisées pour obtenir des macromolécules de poids moléculaire souhaité afin d'applications spécifiques (LAWSON et SUTHERLAND (129) ).

Les dextranes peuvent être utilisés comme adsorbants dans les industries chimiques et pharmaceutiques.

D'autre part, en maintenant une surface hydrophile sur les plaies, ils assurent l'absorption des liquides exsudés.

En se conjuguant à des enzymes pour former des glycoprotéines, ils accélèreraient la circulation de certaines enzymes (SHERWOOD et al. (130)).

De nombreuses fractions ont été utilisées pour la préparation de dérivés tels que :

- les dextranes sulfatés possédant des activités anticoagulantes, antiulcérales
- les complexes avec des métaux variés (fer, calcium) pour des utilisations médicales (contre l'anémie, l'hypocalcémie).

### 3) Le curdlane

Etudiant une souche d'*Alcaligenes faecalis*, HARADA (131) trouve un variant spontané qui ne produit plus un succinoglycane caracté-

ristique de la lignée mère mais un exopolysaccharide insoluble exclusivement composé de résidus D-glucose conjugués par liaison  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3), appelé curdlane.

Ce même auteur obtient, par mutation, une souche d'*Alcaligenes faecalis* qui synthétise exclusivement du curdlane.

Ces substances étant spécifiquement colorées par la réaction au bleu d'aniline (NAKANISHI et al. (132)), cette méthode a permis de mettre en évidence plusieurs souches d'*Agrobacterium* productrices d'exopolymères de type curdlane.

Ces polysaccharides forment avec l'eau un gel élastique qui résiste bien à l'élévation de température. Leur emploi se limite pour le moment à l'alimentation comme agent de stabilisation ou de gélification.

#### 4) Les alginates bactériens

Ce sont des copolymères d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique. Ces composés, d'abord mis en évidence chez les algues brunes (HAUG et al. (133)), ont été depuis décrits chez les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (LINKER et JONES (134)) et *Azotobacter vinelandii* (COHEN et JOHNSTONE (135)).

La pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* a fait préférer pour une éventuelle application les alginates produits par *Azotobacter* qui, de plus possèdent des propriétés physiques et une structure chimique similaires aux alginates produits par les algues (PENMAN et SANDERSON (136)).

La force des gels d'alginates en solution aqueuse, renforcée par l'association avec des ions  $Ca^{++}$ , fait qu'ils sont employés dans des industries textiles comme attaches temporaires.

L'incorporation des alginates dans les pansements a pour but de constituer une surface hydrophile absorbant les liquides exsudés par les plaies.

Ces substances assurent une meilleure adhérence des colorants textiles et encres d'imprimerie et constituent une gaine hydrophile autour des racines des jeunes arbres, évitant ainsi une déshydratation.

#### 5) Les polysaccharides d'*Azotobacter*

KANG et Mc NEELY (137) décrivent en 1977 un polysaccharide sécrété par *Azotobacter indicum* constitué de glucose, rhamnose, d'acide L-gulonique et de 8% à 10% de substituants O-acétyles.

Ce polymère donne des solutions extrêmement visqueuses dans l'eau froide et chaude. Les propriétés rhéologiques ne sont pas modifiées par la présence de sels même à forte concentration sauf à pH élevé. D'autre part, la viscosité des solutions de polysaccharide n'est pas affectée par des températures comprises entre 0°C et 90°C et des pH entre 3 et 9.

Ce biopolymère est essentiellement utilisé en industrie pétrolière pour la récupération assistée du pétrole.

#### 6) Les polysaccharides d'*Erwinia*

En présence de lactose ou d'hydrolysats d'amidon, le genre *Erwinia* produit un exopolysaccharide appelé *xnflo* et constitué de glucose, galactose, acide glucuronique et fucose dans les rapports 6/4/3/2 et de groupes O-acétyles (KANG et al. (138) ).

Malgré un pouvoir gélifiant très élevé, les gels obtenus sont très affectés par des variations de température. Néanmoins, sa compatibilité avec les cations et les colorants basiques font utiliser le *xnflo* dans les industries de peinture.

7) Les polysaccharides fongiques

a) Les scléroglucanes

De nombreuses espèces de *Sclerotium* synthétisent des  $\beta$ -glucanes (JOHNSON et al. (139) ), qui forment des gels visqueux à la concentration de 1,5 %.

Ces polymères, appelés *polytran*, sont thermiquement stables et résistent aux concentrations salines élevées.

Les principales utilisations industrielles du *polytran* sont les suivantes : encres d'imprimerie, peintures au latex, enrobage des graines, agents de suspension pour les herbicides et pesticides.

b) Les pullulanes

Le champignon *Aureobasidium pullulan* produit un homopolysaccharide linéaire de type  $\alpha$ -D-glucane composé de maltotrioses liés en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (BENDER et al. (140) ).

Il existe une corrélation entre les poids moléculaires des pullulanes et les conditions de culture du champignon (YUEN (141) ). Ces composés sont préconisés pour l'enrobage des aliments et pour remplacer l'amidon dans la confection d'aliments à basses calories.

C - CONCLUSION

Il est clair que les applications industrielles des molécules ayant un pouvoir gélifiant sont nombreuses et variées. Les polymères extraits de plantes ou d'algues sont connus et utilisés depuis longtemps. Viennent s'y ajouter, depuis peu, les exopolysaccharides produits par les micro-organismes dont le choix, pour la production industrielle, dépendra des propriétés physico-chimiques des macromolécules synthétisées.

Les voies de recherche actuelles s'orientent dans 3 directions :

- amélioration génétique de la souche productrice de polymère
- optimisation des conditions de production en fermenteur
- étude des conditions de récupération des biopolymères dans un souci d'économie d'énergie.

L'intérêt d'exploiter des microorganismes réside donc bien dans cette possibilité de découvrir des biopolymères aux caractéristiques très "pointues" dont peut avoir besoin l'industrie ; en contre-partie, la difficulté reste d'établir un lien quelconque entre la nature de la souche, le type de polysaccharide excrété et les propriétés attendues, ce qui nécessite une phase de *screening* afin de sélectionner de nouvelles souches et tester les propriétés de leurs exopolymères.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail de thèse qui concerne l'étude physico-chimique de polysaccharides originaux excrétés par de nouvelles souches de bactéries. Ce programme de recherches s'inscrit dans le cadre d'un pôle mobilisateur "Essor des biotechnologies" du Ministère de la Recherche et de la Technologie. Il regroupe plusieurs laboratoires français universitaires et industriels ( le CERMAV de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble : USMG : Mme le Pr. RINAUDO, directrice du programme ; le laboratoire de botanique, cryptogamie, biologie cellulaire

et génétique de l'USMG : Mme SEIGLE-MURANDI ; le laboratoire d'écologie microbienne de la rhizosphère du centre de pédologie de l'Université de Nancy : Mrs BALANDREAU et GUENIOT ; le laboratoire de cryptogamie de l'Université de Toulouse : Mrs CHAVANT et MONTANT ; l'institut français du pétrole : Mr BALLERINI ; Rhône-Poulenc : Mrs JARRY et RECORDON, Mme PIGEOT ; le CIRTA : Mr MENINGAUD ; le CECA : Mr BRIGAND).



## RESULTATS

## I - CULTURE DES BACTERIES ET ISOLEMENT DU POLYSACCHARIDE

La souche bactérienne productrice du polysaccharide (succinoglycane) dont nous nous proposons d'étudier la structure primaire a été isolée et cultivée par le Centre de Pédologie Biologique de Nancy (Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère).

### A - MATERIELS ET METHODES

La souche est mise en préculture sur un milieu liquide nutritif pendant le temps nécessaire pour obtenir une concentration suffisante de bactéries (environ  $10^8$  à  $10^9$  individus/ml) en phase exponentielle de croissance (culture d'une nuit ou de 24 heures). Les bactéries sont séparées du milieu nutritif par centrifugation à 15 000 trs/min, pendant 10 minutes, à 15°C et en conditions stériles. Les culots sont récupérés dans 5 ml d'eau physiologique (NaCl 8 ‰), qui permettent l'ensemencement des milieux de culture. Sur ces précultures on vérifie, par étalement sur boîte de Pétri et par observation au microscope, la pureté de la souche utilisée.

Pour la production de polysaccharide, les bactéries sont cultivées sur des milieux synthétiques carencés en azote et enrichis en substrats carbonés (30 g/l).

La sélection de cette souche s'est simplement appuyée sur la stabilité de la culture, la facilité de récupération et de remise en solution du polymère et sur le niveau de viscosité des solutions obtenues.

La figure 13 p. 66 illustre le protocole expérimental de culture de bactérie et de préparation du polysaccharide.

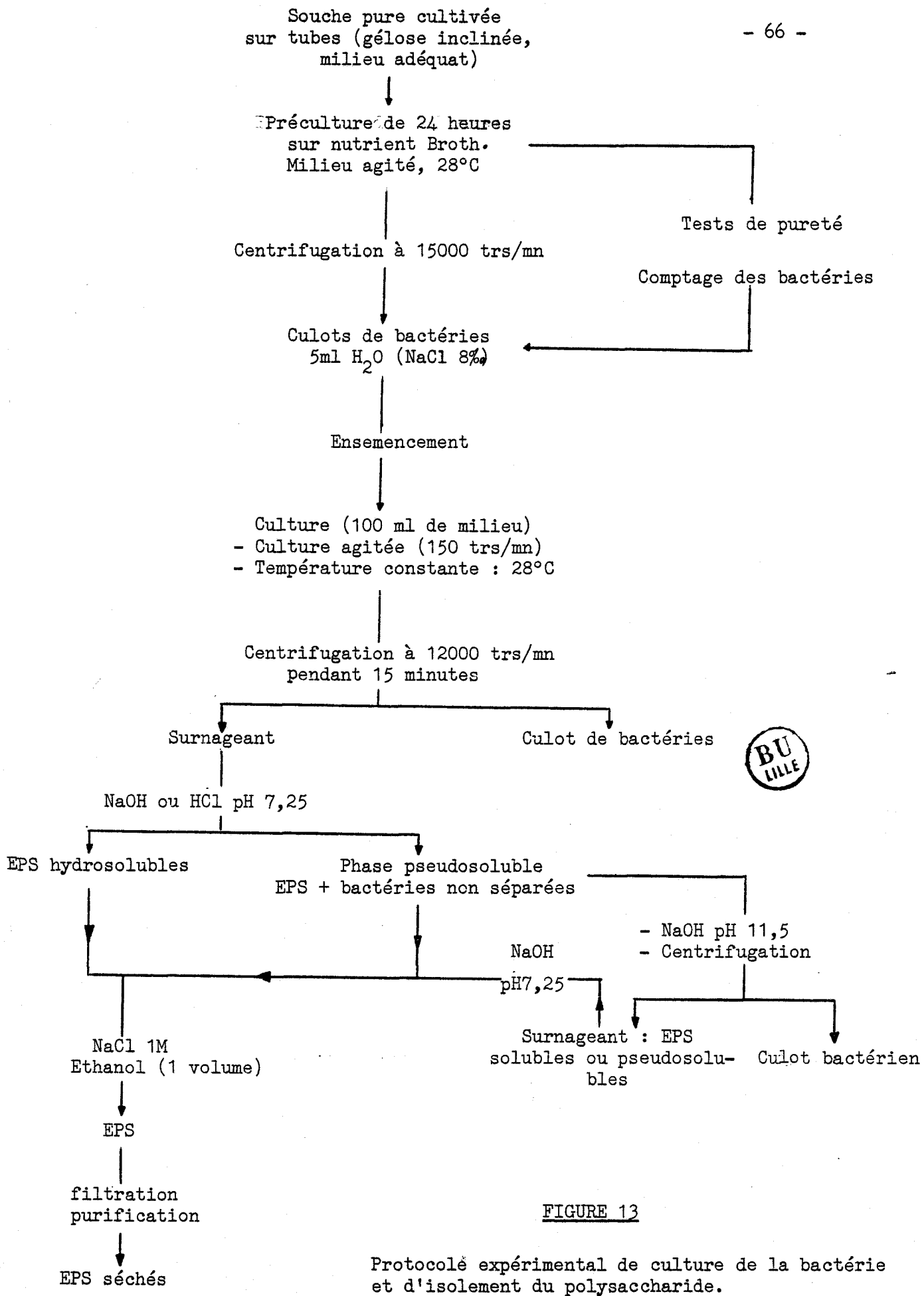


FIGURE 13

Protocole expérimental de culture de la bactérie et d'isolement du polysaccharide.

## B - RESULTATS

La souche utilisée fournit un exopolysaccharide hydrosoluble à pH neutre, précipitable par alcool et filtrable facilement.

Le rendement de production (  $\frac{\text{carbone des EPS}}{\text{carbone utilisé}}$  ) est de 600 mg par litre de culture. Cette production a été obtenue dans des conditions standards (température, agitation, temps, milieu minéral, concentration en sucres) mais elle peut être améliorée (par la connaissance des conditions optimales de culture) en jouant sur les facteurs physiologiques.

## C - CONCLUSION

L'amélioration de la souche passe par l'augmentation de la production mais surtout par l'accroissement du rendement, qui, lui, détermine la rentabilité. En effet, le rendement étant fonction de la quantité d'exopolysaccharide produite et de substrat carboné consommé, il s'avère que l'optimum de production ne correspond pas toujours à l'optimum de rendement.

Des études plus poussées doivent être effectuées afin de déterminer les conditions optimales de milieu (composition minérale, substrat carboné) et de culture (température, agitation, aération, temps) permettant d'obtenir le meilleur rendement.

Cette optimisation passe de plus par une étude physiologique poussée de la souche et par la recherche de mutants hyperproducteurs.

## II - COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DU POLYSACCHARIDE

### A - RECHERCHE DES PROTEINES

La présence de protéines qui contaminent les préparations de nombreux exopolysaccharides nous a incité à rechercher systématiquement ces molécules dans l'échantillon produit.

1) Dosage colorimétrique selon la méthode de LOWRY et al. (142).

#### a) Préparation des solutions

Solution A :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2% dans NaOH 0, 1N

Solution B : sulfate de cuivre, 5  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 % dans le tartrate de sodium, potassium, 1%

Solution C : 50 ml de solution A + 1 ml de solution B

#### b) Dosage

A 1ml de la solution polysaccharidique (1mg) sont ajoutés 5ml de solution C, le mélange est agité puis laissé au repos pendant 10 minutes. 0,5 ml du réactif Folin-ciocalteu, préalablement dilué au demi, est additionné. La solution ainsi préparée est laissée 30 minutes à l'obscurité. Ce dosage se fait également sur des solutions témoins de sérum albumine bovine (Sigma) à différentes concentrations.

Ainsi les protéines se révèlent en bleu et la lecture au spectrophotomètre se fait à la longueur d'onde 750 nm. Ce dosage est effectué en triple.

c) Résultats

Ce dosage s'est avéré négatif sur notre échantillon. Toutefois, pour confirmer ce résultat, nous avons utilisé une méthode chromatographique permettant, en des temps très courts, de séparer du polymère une éventuelle contamination protéique adsorbée sur celui-ci.

2) Recherche des protéines par chromatographie en phase liquide à haute pression (CLHP)

a) Principe et méthodes

Le principe de la séparation des différents composés est fondé sur l'hydrophobie plus ou moins grande des molécules. Les polysaccharides acides hydrophiles, sont exclus du gel de silice greffée, les protéines plus hydrophobes sont retenues et éluées par un gradient de solvant organique (acétonitrile).

1 mg d'échantillon dissous dans 1 ml d'eau et purifié par filtration (filtres 0,45  $\mu$ , Millipore) est analysé en CLHP de phase inverse, sur une colonne semi-préparative Aquapore RP - 300, 10  $\mu$ , pore de 300 Å de silice greffée C-8 (30 x 0,3 cm, Brownlee Labs).

Pour cela, nous disposons d'un chromatographe Spectra-Physics comprenant :

- un détecteur UV à longueur d'onde variable, modèle 8 400
- un intégrateur informatisé, modèle 4 100
- un appareil de confection de gradients ternaires microproces-  
sorisé, modèle 8 700
- une pompe et une boucle d'injection de 500  $\mu$ l.

Le gradient d'analyse est le suivant :

Temps	0	10	20	35	45	60	80
H <sub>2</sub> O (%)	100	100	80	80	50	50	0
CH <sub>3</sub> CN (%)	0	0	20	20	50	50	100

La détection des molécules est effectuée à 200 nm et 280 nm avec un détecteur UV réglé à une sensibilité de 0,08, l'intégrateur étant réglé à la sensibilité 8. Le débit de l'éluant est de 2ml/min. La pression maximale est fixée à 200 bars.

Le même protocole est appliqué sur 1 mg d'échantillon préalablement traité au sodium dodécyl sulfate (1ml SDS 1%, 80°C, 10 minutes) (BDH), traitement qui permet de décrocher du polymère des protéines éventuellement adsorbées.

#### b) Résultats

Les 2 analyses ne nous ont donné qu'un seul pic au volume d'exclusion de la colonne. Le dosage des protéines sur ce pic est négatif,

confirmant le résultat obtenu sur l'échantillon natif avant chromatographie.

Nous pouvons donc conclure à l'absence de protéines dans la solution polysaccharidique.

## B - RECHERCHE DES ACIDES URONIQUES

### 1) Dosage au carbazol-sulfurique de DISCHE (143)

#### a) Matériels et méthodes

Dans un tube à essais, on introduit 1ml de solution à doser (1mg d'échantillon) et 6 ml d'acide sulfurique concentré (R.P. Prolabo). Le tube est refroidi dans un bain d'eau glacé. L'acide sulfurique est ajouté lentement et régulièrement le long des parois du tube. Le mélange est agité à l'aide d'une tige de verre et le tube maintenu pendant 20 minutes dans un bain-marie bouillant.

Le tube est refroidi rapidement et 0,2 ml d'une solution alcoolique de carbazol (carbazol Prolabo 0,1g ; éthanol absolu qsp 100 ml) est ajouté. Le mélange est agité. Une coloration pourpre, qui augmente d'intensité à l'obscurité, doit se développer. Après un séjour de 3 heures à l'obscurité, la mesure des absorbances s'effectue à la longueur d'onde 530 nm. La coloration est stable pendant 1 heure et la réaction est sensible puisque 2  $\mu$  g d'acide uronique peuvent être dosés. Ce dosage est effectué en triple sur l'échantillon et de la même façon sur des solutions témoins d'acide glucuronique (50  $\mu$  g/ml : Prolabo) et d'oses neutres (200  $\mu$  g/ml), ces derniers interférant dans le dosage.



b) Résultats

Nous n'observons pas de coloration caractéristique de la présence de résidus uronosidyles. Nous nous sommes assurés de ce résultat par l'emploi de 2 techniques chromatographiques : la CLHP et la CPG.

2) Identification des acides uroniques par CLHP

a) Matériels et méthodes

Le principe de la séparation est fondé d'une part sur l'acidité relative des monosaccharides et d'autre part sur leur hydrophobicité. Plus un monosaccharide sera acide, plus vite il sera élué car il sera repoussé par les groupements  $\text{SO}_3^-$  (sulfonates) greffés sur le gel de la colonne. Plus il sera hydrophobe, plus il interagira avec la matrice benzénique hydrophobe du gel, ce qui retardera son élution.

1 mg de polymère est hydrolysé par 1 ml d'acide trifluoroacétique (Merck, Darmstadt, R.F.A.) 4 N pendant 4 heures à 100°C. L'agent d'hydrolyse est alors éliminé par 3 codistillations à l'aide de méthanol (rotavapor Büchi) afin d'éviter l'interférence du pic de solvant avec l'élution des acides uroniques en CLHP. Le résidu sec est repris par 500  $\mu\text{l}$  d'eau.

100  $\mu\text{l}$  de ce mélange de monosaccharides sont ensuite chromatographiés sur une colonne de type Aminex ion exclusion HPX 87-H (forme  $\text{H}^+$ ; 300 x 7,8 mm ; Biorad). Le débit de l'éluant ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,008N) est de 0,6 ml/min. La détection des produits est assurée par réfractométrie (Spectra-Physics, modèle 6040, sensibilité 16). La pompe utilisée est une Shimadzu LC-5A : sa pression maximale est fixée à 60 bars. L'enregistrement des diagrammes est donné par un intégrateur Spectra-Physics modèle 4 100 réglé à la sensibilité 8.

Le même protocole chromatographique est appliqué à un mélange témoin contenant acide glucuronique, acide galacturonique, glucose, galactose, pyruvate, glucuronolactone, succinate et acétate : le choix de ce mélange a été dicté par la présence de certains de ces composés dans le polysaccharide.

b) Résultats.

La figure 14 p. 74 illustre le résultat de la chromatographie sur le mélange témoin (A) et sur le polysaccharide hydrolysé (B). L'analyse du polymère ne montre pas de pics dans la zone de fractionnement des acides uroniques et de leurs lactones correspondantes.

Nous observons toutefois 4 pics ayant des temps de rétention similaires aux glucose, galactose, pyruvate et succinate. Les réponses du glucose et du galactose d'une part, celles du pyruvate et du succinate d'autre part, sont sensiblement égales (calcul fait par injection de solutions témoins de différentes concentrations). Pour 1 résidu de galactose, nous obtenons 7 à 8 résidus de glucose : pour 1 résidu de pyruvate, 1 de succinate. Ces résultats préliminaires indiquent que ce type de chromatographie s'avère être un outil efficace dans l'identification mais aussi le dosage de résidus acides non glucidiques et de certains oses neutres. Ces résultats méritent toutefois d'être confirmés par d'autres méthodes plus sensibles (CPG pour les monosaccharides, RMN pour les résidus acides non osidiques).

Nous savons d'autre part que les liaisons acide uronique-ose neutre sont très difficilement hydrolysées par des méthodes classiques, ce qui rend difficile l'identification de ces résidus uronosidyles. Pour confirmer l'absence de ces résidus dans le polymère, nous avons analysé le polysaccharide par CPG après modification des acides uroniques.

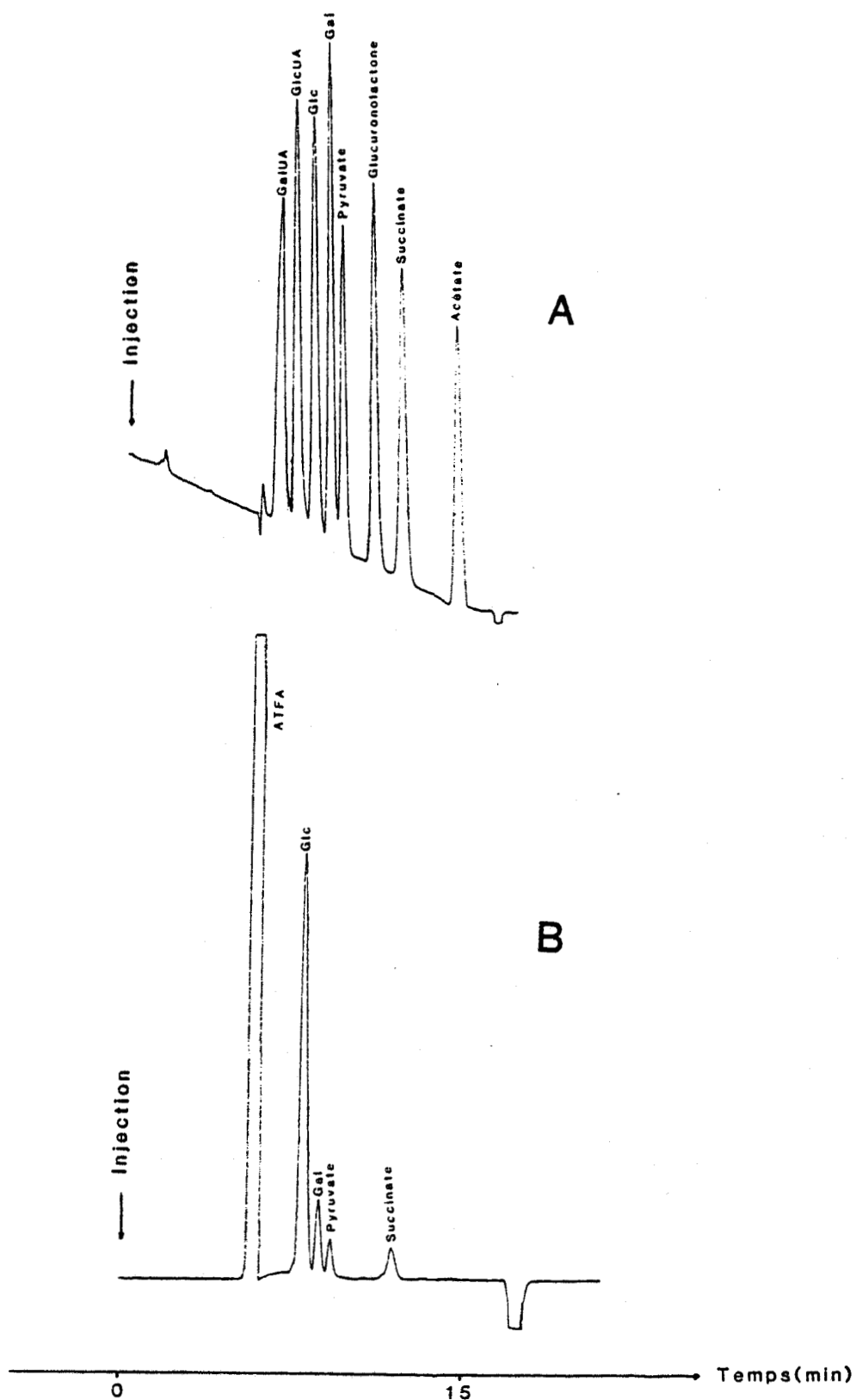


FIGURE 14

Chromatographie liquide haute pression (CLHP) sur colonne Aminex ion exclusion HPX 87-H forme  $H^+$  (300 x 7,8 mm, Biorad) d'un mélange témoin (A) et du polysaccharide hydrolysé (B).

3) Analyse du polymère par CPG près réduction des acides uroniques par la méthode de TAYLOR et CONRAD (17)

a) Matériels et méthodes

Il est possible de réduire un acide uronique en son ose neutre correspondant (cf. généralités p. 16 ).

Pour ce faire, 10 mg de polymère ont été mis à dissoudre la nuit dans 5 ml d'eau pour obtenir une solution bien homogène. 10 mg de N-cyclohexyl-N'-( $\beta$ ' - (N-méthyl-morpholino) éthyl) - carbodiimide- para-toluène sulfonate (Prolabo) ont été ensuite ajoutés par petites quantités, le pH étant maintenu à 4,75 par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N. La solution est laissée 1 heure sous agitation à température ambiante à pH 4,75 puis réduite par une solution de borohydrure de potassium 2M (5ml) après avoir ajusté le pH à 8 à l'aide d'ammoniaque 1N. Quelques gouttes d'octanol (Prolabo) sont ajoutées à la solution pour éliminer les mousses. Après 2 heures sous agitation, à température ambiante et à pH8, le mélange est dialysé 2 jours contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

Le polysaccharide ainsi modifié est alors hydrolysé par de l'acide trifluoroacétique (Merck) 4N pendant 4 heures à 100°C. L'acide est éliminé par plusieurs codistillations en présence de méthanol. Les monosaccharides ainsi libérés sont repris dans de l'eau ajustée à pH9 à l'aide d'ammoniaque 1N et réduits par une solution de borohydrure 1M (2ml) pendant 2 heures à température ambiante. La réduction est arrêtée par addition de résine Dowex 50 x 8 (forme H<sup>+</sup>, Biorad) jusqu'à pH4. L'acide borique est éliminé en présence de méthanol par plusieurs codistillations. Après lyophilisation, les alditols sont peracétylés par un mélange de pyridine (Prolabo, 200  $\mu$ l) et d'anhydride acétique (Prolabo, 400  $\mu$ l) une nuit à température ambiante. L'acétylat séché sous azote est repris par 1 ml de méthanol distillé.

1  $\mu$ l de cette fraction est chromatographié sur un appareil Girdel série 300 (détection : ionisation de flamme) équipé d'une colonne capillaire en verre imprégnée de silicone OV-101 (25m x 0,2 mm), la température étant programmée de 160°C à 240°C à raison de 2°C/min.

Le même protocole d'étude est appliqué sur 500  $\mu$ g de polysaccharide natif préalablement mis en présence de 100  $\mu$ g de témoin interne (méso-inositol) et lyophilisé.

#### b) Résultats

Les analyses CPG des alditols acétates du polysaccharide natif et du polymère réduit au carbodiimide nous ont donné deux diagrammes strictement identiques (figure 15 p. 78) : nous n'observons, après réduction, ni l'apparition d'un nouveau monosaccharide ni l'augmentation de quantité d'un monosaccharide préexistant dans le polymère. Ce résultat confirme l'absence d'acides uroniques dans l'exopolymère glucidique étudié.

### C - MISE EN EVIDENCE ET DOSAGE DES MONOSACCHARIDES

#### 1) Matériels et Méthodes

Nous avons utilisé l'hydrolyse trifluoroacétique sur 500  $\mu$ g de polysaccharide en présence de 100  $\mu$ g de méso-inositol (témoin). C'est en effet la technique qui donne le meilleur rendement de libération des monosaccharides. Après réduction et acétylation, les alditols acétates sont analysés par CPG sur colonne capillaire : le protocole expérimental est identique à celui décrit dans le chapitre précédent (p.75 )

## 2) Résultats

Le rendement d'hydrolyse calculé par rapport au témoin est de 60 %. Une hydrolyse prolongée améliore ce rendement mais il est à craindre qu'une dégradation des oses ne prenne place.

Le chromatogramme obtenu est présenté sur la figure 15 p.78 (A). Il permet d'identifier le glucose et la galactose dans les rapports molaires de 7 pour 1, rapports déjà décrits chez un exopolysaccharide de *Rhizobium meliloti* (COURTOIS (144)).

Nous pouvons noter l'absence totale de pentoses et d'osamines.

Est aussi présenté sur la figure 15, le résultat de l'analyse par CPG des alditols acétates après réduction au carbodiimide des acides uroniques (B).

## D - IDENTIFICATION DE SUBSTITUANTS DE TYPE PYRUVATE ET SUCCINATE

### 1) Identification chromatographique

Les substituants pyruvyles, succinyles et acétyles peuvent être identifiés, après hydrolyse par l'acide trifluoroacétique, par chromatographie d'exclusion d'ions sur colonne HPX 87H selon le protocole décrit p. 72.

Nous avons toutefois vérifié leur présence par RMN du proton à 400 MHz. Cette vérification est en effet très importante car ces substituants confèrent à la molécule ses propriétés rhéologiques.

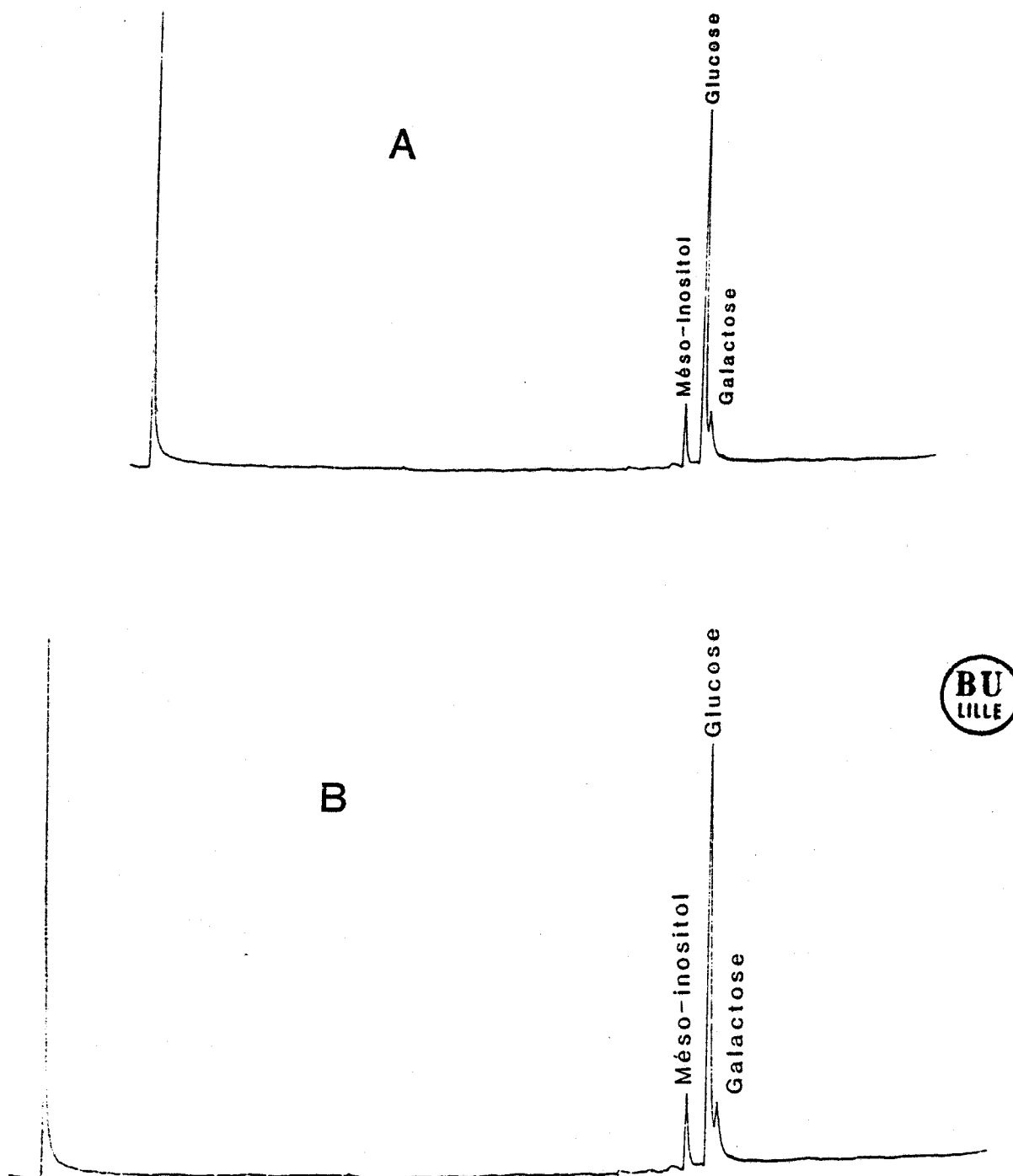


FIGURE 15

Chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire de silicone OV-101 des alditols acétates du polysaccharide natif (A) et du polymère traité par le carbodiimide (B) (témoin interne : méso-inositol).

2) Identification par RMN du proton à 400 MHz (\*)

a) *Protocole expérimental*  
=====

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz du proton a été réalisée sur un spectromètre BRUKER AM 400-WB à transformée de Fourier couplé à un ordinateur ASPECT 3000. Les analyses ont été effectuées à 303°K (30°C) et 355°K (82°C) sur 1 mg de polysaccharide dissous dans 500 µl d'eau lourde (D<sub>2</sub>O 99,96 %, C.E.A., France) : les protons mobiles sont préalablement échangés par plusieurs solubilisations du polysaccharide dans l'eau lourde suivies de lyophilisations intermédiaires. Les glissements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au sel de sodium de l'acide (triméthylsilyl)-2,2'-3,3' propionique-d<sub>4</sub> (δ = 0,000 ppm).

b) *Résultats*  
=====

Les spectres de RMN à 400 MHz du polysaccharide effectués à 30°C et à 82°C sont présentés sur la figure 16 p. 80.

Nous pouvons constater la faiblesse des signaux à 30°C et ce aussi bien dans les régions de résonance des protons des substituants pyruvate, acétate et succinate (entre 1,40 ppm et 2,80 ppm) que dans la région de résonance des protons anomériques : ceci rend difficile l'exploitation des résultats de ce spectre.

---

(\*)

Les analyses ont été effectuées au Centre Commun de Mesures de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I par Monsieur J.M. WIERUSZESKI



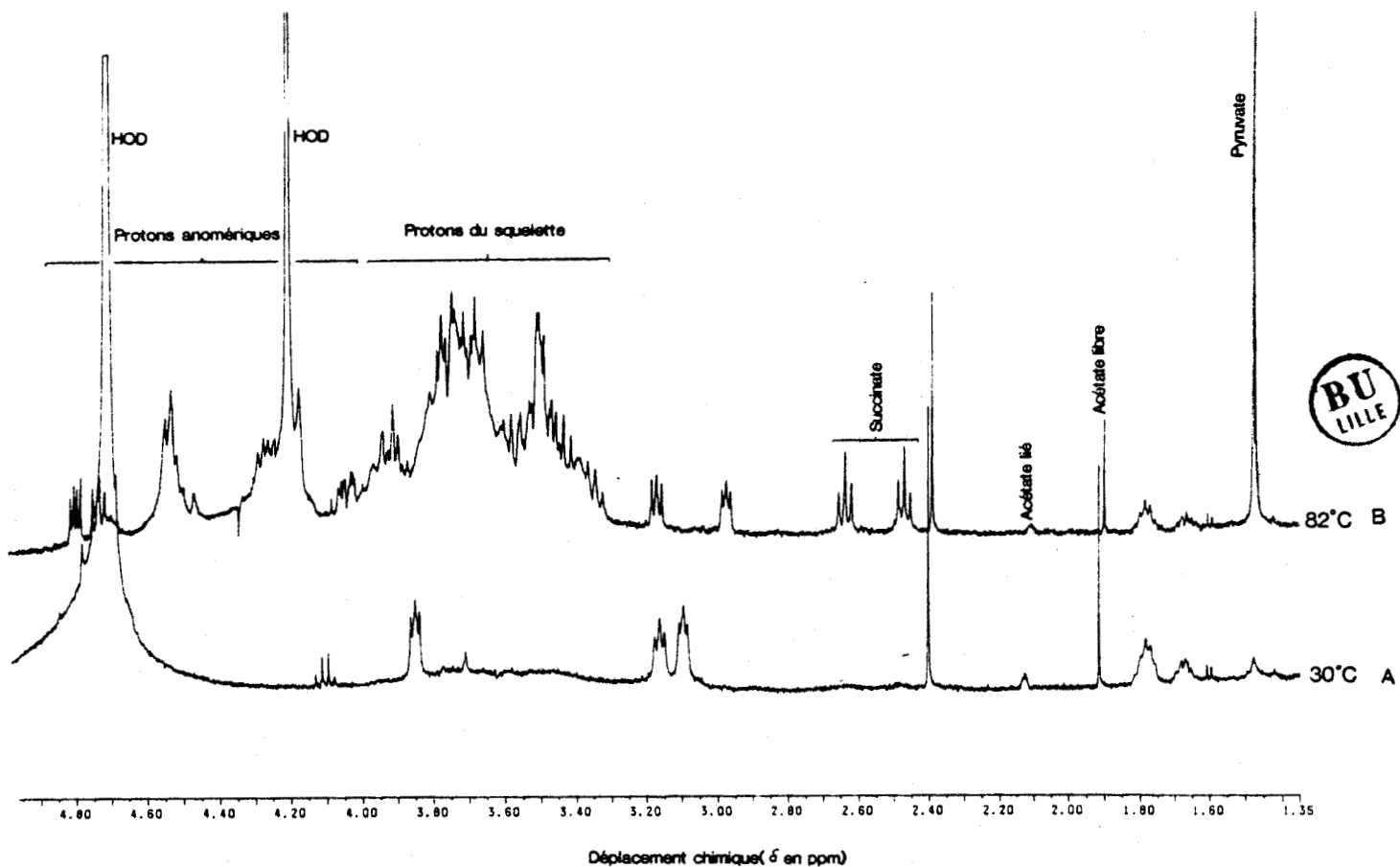


FIGURE 16

RMN du proton à 400 MHz d'1 mg de polysaccharide analysé à 30°C (A) et 82°C (B). Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés par rapport au sel de sodium de l'acide (triméthylsilyl)-2,2'-3,3' propionique- $d_4$  ( $\delta = 0,000$  ppm).

Par contre, le spectre résultant de l'analyse à 82°C est tout à fait interprétable. Dans les hauts champs, nous mettons en évidence le singulet du méthyle du pyruvate ( $\delta = 1,478$  ppm), l'absence du singulet du méthyle de l'acétate ( $\delta = 2,165$  ppm) et la présence d'un triplet dédoublé correspondant aux deux groupements  $\text{CH}_2$  du succinate ( $\delta = 2,471$  ppm et 2,639 ppm).

Les valeurs de déplacements chimiques que nous avons déterminées sont conformes à celles décrites par MORRIS et al. (127). Vers le milieu du spectre ( $4,20 \text{ ppm} > \delta > 3,30 \text{ ppm}$ ) sont identifiés les signaux des protons du squelette.

Comme nous l'avons mentionné précédemment (p. 33), nous constatons que l'augmentation de la température déplace le signal de l'eau (30°C :  $\delta = 4,75$  ppm ; 82°C :  $\delta = 4,25$  ppm) ce qui permet de dévoiler complètement les protons anomériques qui résonnent dans le pied du signal HOD : cette constatation permet de conclure à l'anomérie  $\beta$  de toutes les liaisons glycosidiques du polysaccharide. Toutefois, dans l'état actuel d'avancement de nos travaux, il ne nous est pas encore possible d'assigner à chaque déplacement chimique le proton anomérique correspondant.

Le manque de résolution dans l'analyse effectuée à température ordinaire est certainement à mettre à l'actif de la conformation spatiale du polysaccharide comme cela a déjà été mis en évidence pour d'autres exopolysaccharides. Par exemple, les xanthanes, selon la température, les concentrations en sels et en polymère, peuvent exister sous 2 états : l'un désordonné, l'autre ordonné sous forme d'hélice (MILAS et RINAUDO (145)), le passage de la forme ordonnée à la forme désordonnée s'effectuant à une certaine température dite de transition conformationnelle. COURTOIS (144) réalisant des études de RMN du proton à différentes températures sur des

exopolysaccharides de *Rhizobium meliloti*, montre que les substituants n'apparaissent totalement sur les spectres qu'au dessus d'une certaine température. Ce fait indique que ces résidus sont bloqués par l'organisation moléculaire à température ambiante. Par agitation thermique, les polymères se désorganisent, dévoilant ainsi complètement ces groupements.

Nous constatons le même phénomène sur le polysaccharide étudié : en particulier le démasquage très net des substituants lors de la désorganisation du polymère par chauffage à 82°C.

### III - ANALYSE STRUCTURALE DU POLYSACCHARIDE

#### A - PERMETHYLATION DU POLYSACCHARIDE NATIF

Cette technique permet, par substitution des hydroxyles libres du polymère, d'identifier les points d'attache des liaisons glycosidiques du polysaccharide.

Nous avons utilisé la méthode de PAZ PARENTE et al.(31) au lithium méthyl sulfinyl carbanion.

##### 1) Matériels et méthodes

##### a) Préparation de la base de méthylation

L'appareillage utilisé consiste en un ballon de 500 ml muni d'un réfrigérant connecté à une colonne désséchante de chlorure de calcium (Sigma) et d'une ampoule à brome de 250 ml : le montage est relié à une trompe à eau. Avant la réaction, le système est purgé par de l'hélium.

Sous atmosphère d'hélium, 120 ml de diméthyl-sulfoxyde (DMSO) sont introduits dans le ballon de 500ml et 250ml de butyllithium 1,6M dans l'hexane (Janssen chimica, Beerse, Belgique) dans l'ampoule à brome. A la température de la pièce, sous pression réduite (30 mm de mercure)

et sous agitation magnétique, le butyllithium dans l'hexane est introduit dans le ballon. Le butane produit par la réaction du butyllithium avec le diméthyl-sulfoxyde, ainsi que l'hexane, sont éliminés à l'aide de la trompe à eau.

L'addition de butyllithium est effectuée en 2 heures et la couleur du mélange passe au vert foncé. Le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures à température ambiante puis ramené à la pression atmosphérique par introduction d'hélium. Le réactif ainsi préparé est réparti dans des tubes (100 x 13 mm, Sovirel, France) sous atmosphère d'hélium et conservé à + 4°C.

#### b) Méthylation

500  $\mu$ g de polysaccharide lyophilisés dans un tube Sovirel (100 x 13 mm, France) sont solubilisés par 150  $\mu$ l de DMSO fraîchement distillé. 150  $\mu$ l de lithium méthyl sulfinyl carbanion préalablement décongelé sont additionnés. Le tube est agité, bouché et placé 1 heure dans un bain à ultrasons puis laissé au contact des solvants pendant 2 heures à 20°C. Après refroidissement à -20°C (10 min), 300  $\mu$ l d'iodure de méthyle conservé à + 4°C (Merck, Darmstadt, R.F.A.) sont ajoutés. Nous effectuons une nouvelle sonication pendant 1 heure.

La méthylation est arrêtée par addition de 2 ml d'eau saturée de thiosulfate de sodium (R.P. Normapur, Prolabo). Après 4 extractions par 2 ml de chloroforme (Merck) du polysaccharide perméthylé, les phases chloroformiques sont rassemblées et lavées par 4 fois 2 ml d'eau et séchées par du sulfate de sodium (Prolabo). Le milieu réactionnel est filtré sur laine de verre, concentré sous courant d'azote et déposé sur une colonne de Séphadex LH-20 (30 x 1 cm, 25-100  $\mu$ , Pharmacia, Uppsala, Suède) stabilisée dans un mélange chloroforme-éthanol (1 : 1). Le polymère méthylé est récupéré

au volume mort de la colonne, le DMSO étant élué plus tard : cette filtration sur gel permet de purifier le polysaccharide méthylé.

Le milieu réactionnel est évaporé sous azote puis lyophilisé.

c) Hydrolyse du polysaccharide perméthylé, acétylation et analyse des éthers méthyliques acétylés par CPG

Le résidu sec est méthanolysé 24 heures à 80°C par 500  $\mu$ l de méthanol chlorhydrique 0,5 N. Le solvant est évaporé sous azote : les éthers méthyliques méthyl-glycosylés sont peracétylés par un mélange de pyridine et d'anhydride acétique ( v : v ; 1 : 1 ; 100  $\mu$ l ; R.P. Normapur : Prolabo) pendant une nuit à 20°C.

Après évaporation des solvants, les éthers sont analysés par CPG sur un appareil Girdel 300 équipé d'une colonne capillaire imprégnée de silicone OV - 101 (25 m x 0,2 mm). Ces éthers sont identifiés par un détecteur à ionisation de flamme et élués par un gradient de température de 120°C à 240°C à raison de 2°C/min. La pression du gaz vecteur (hélium) est de 0,05 bar. Les résultats de ces analyses sont confirmés par spectrométrie de masse couplée à la CPG selon la méthode décrite par FOURNET et al. (146). Le spectromètre de masse est de type RIBER - MAG - 10 - 10 (énergie d'ionisation : 70 eV). Dans ce cas, les conditions chromatographiques sont modifiées comme suit : gradient de température, 100°C à 240°C à raison de 5°C/min.

2) Résultats

Le chromatogramme obtenu est présenté sur la figure 17 p. 87 .  
L'analyse du spectre de masse de chaque éther méthylique confirme l'identification chromatographique. L'intégration du courant ionique total de chaque ion permet d'obtenir les rapports molaires des éthers méthyliques (tableau X ci-dessous)

TABLEAU X

Rapports molaires des éthers méthyliques méthyl-glycosylés et acétylés obtenus par intégration du courant ionique total de chaque ion (spectrométrie de masse). Polysaccharide natif.

---

Ethers méthyliques	Rapports molaires <sup>a</sup>
2, 3, 4 - Tri - O - méthyl-glucose	0,7 (1)
2, 3, 6 - Tri - O - méthyl-glucose	1,6 (2)
2, 4, 6 - Tri - O - méthyl-glucose	1,8 (2)
2, 3 - Di - O - méthyl-glucose	1,7 (2)
2, 4, 6 - Tri - O - méthyl-galactose	1 (1)

---



a : calculés sur la base d'1 résidu de 2, 4, 6 - tri - O - méthyl - galactose.

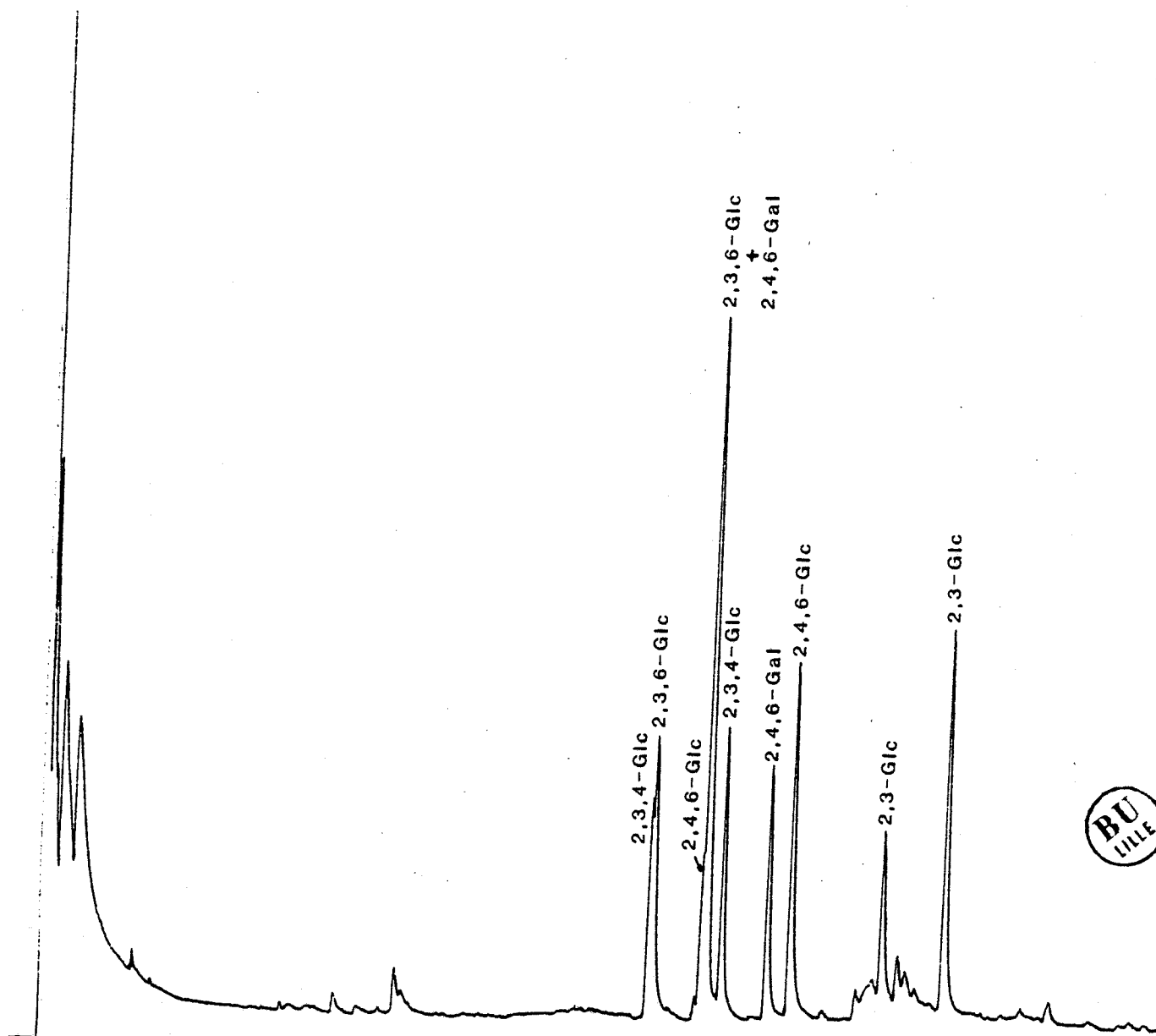


FIGURE 17

Chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire de verre imprégnée de silicone OV - 101 (25m x 0,2 mm) des éthers méthyliques méthyl-glycosylés et acétylés du polysaccharide natif.



Nous pouvons constater l'absence totale de monosaccharides perméthylés, laissant supposer que les oses en position terminale non réductrice sont tous substitués par des résidus pyruvyles. La présence d'un éther diméthylque permet de conclure à une structure branchée. L'identification d'un deuxième résidu de 2,3 - di - O - méthyl - glucose peut être imputée à un monosaccharide disubstitué par un groupement de type pyruvate qui résiste bien à la méthylation. La perméthylation du polysaccharide préalablement dépyruvate permettra de conclure définitivement à la présence de pyruvate en position terminale non réductrice de la chaîne latérale sur le glucose.

Enfin nous pouvons affirmer que ce polymère est composé de 7 résidus de glucose pour 1 résidu de galactose, ce qui confirme les résultats obtenus par hydrolyse trifluoroacétique et analyse par CPG des acétates d'alditols.

## B - PERMETHYLATION DU POLYSACCHARIDE DEPYRUVATE

### 1) Matériels et méthodes

Nous avons employé la technique de dépyruvatation décrite par LEW et HEIDELBERGER (57).

500  $\mu$ g de polymère sont chauffés pendant 1 heure à 80°C en présence d'1ml d'acide sulfurique 5mM. Le mélange est ensuite dialysé une nuit contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

Le résidu sec est méthylé, analysé par CPG et par couplage CPG - SM comme précédemment décrit.

2) Résultats

La figure 18 p.90 montre l'apparition d'un nouvel éther méthylique identifié comme du perméthyl glucose. Le calcul des rapports molaires des différents éthers méthyliques (tableau XI ci-dessous) indique une diminution du 2,3 - di - O - méthyl - glucose correspondant à l'augmentation du perméthyl glucose. Ce résultat permet de conclure à la substitution du résidu de glucose en position terminale non réductrice des chaînes latérales du polymère par 1 résidu d'acide pyruvique conjugué par liaison acétalique sur les hydroxyles des carbones 4 et 6.

L'identification de 0,4 résidu de perméthyl glucose ainsi que 1,2 résidu de 2,3 - di - O - méthyl - glucose indique qu'il y a eu dépyruvatisation partielle.

Cependant, cette dernière expérience permet de conclure sans ambiguïté à la présence d'une chaîne latérale dans l'unité de répétition (1 résidu de perméthyl glucose pour 1 résidu de 2,3 - di - O - méthyl - glucose), unité constituée d'1 résidu de galactose pour 7 résidus de glucose.

TABLEAU XI

Rapports molaires des éthers méthyliques méthyl-glycosylés et acétylés obtenus par intégration du courant ionique total de chaque ion (spectrométrie de masse). Polysaccharide dépyruvaté.

Ethers méthyliques	Rapports molaires <sup>a</sup>
2, 3, 4, 6 - Tétra - O - méthyl - glucose	0,4 (1)
2, 3, 4 - Tri - O - méthyl - glucose	0,8 (1)
2, 3, 6 - Tri - O - méthyl - glucose	1,8 (2)
2, 4, 6 - Tri - O - méthyl - glucose	1,8 (2)
2, 3 - Di - O - méthyl - glucose	1,2 (1)
2, 4, 6 - Tri - O - méthyl - galactose	1 (1)

a : calculés sur la base d'un résidu de 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose.



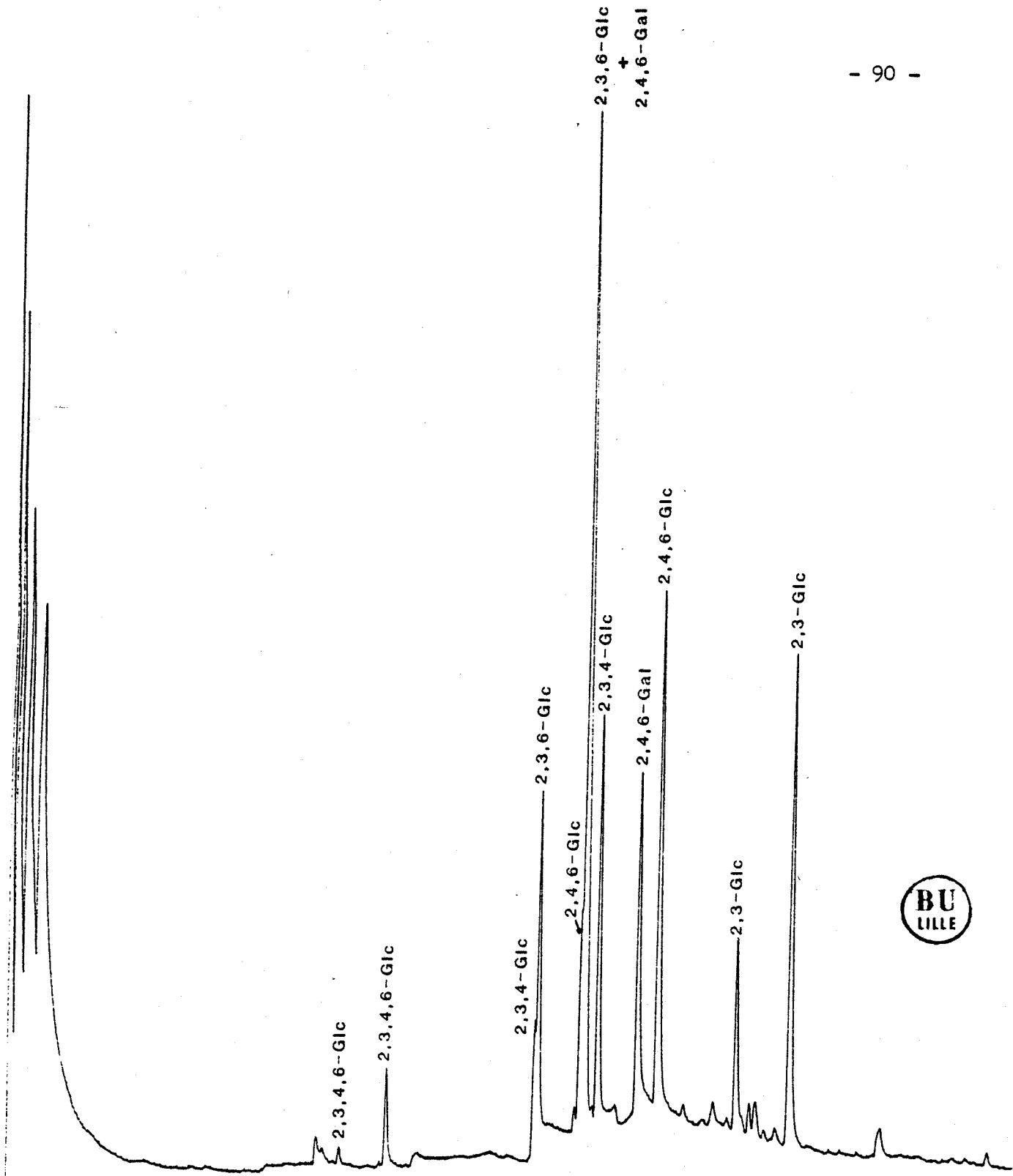


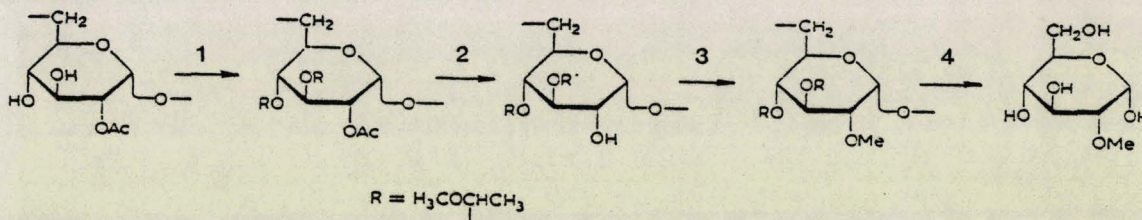
FIGURE 18

Chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire de verre imprégnée de silicone OV - 101 (25 m x 0,2 mm) des éthers méthyliques méthyl-glycosylés et acétylés du polysaccharide dépyruvate.

C - TENTATIVE DE LOCALISATION DU RESIDU SUCCINYLE

Nous venons de voir que la stabilité des liaisons acétaliques du pyruvate permet sa localisation par substitution des hydroxyles libres du polysaccharide à l'aide de la méthylation.

Cette technique n'est plus applicable en ce qui concerne les substituants succinyles qui sont saponifiés par les bases de méthylation. Il est dans ce cas nécessaire de recourir dans un premier temps à une substitution de tous les hydroxyles libres du polysaccharide (1) à l'aide d'un réactif conjugué par une liaison acétalique, puis dans un deuxième temps de saponifier le résidu acyle par une base (2) et enfin de perméthyle l'hydroxyle ainsi libéré (3). Après hydrolyse (4) et acétylation, les éthers sont analysés par CPG. Les différentes étapes sont résumées sur le schéma ci-dessous



Nous avons utilisé la méthode de DE BELDER et NORRMAN (55)

1) Matériels et méthodes

a) Traitement au méthyl vinyl éther

10 mg de polysaccharide lyophilisé ont été mis à dissoudre dans 2 ml de DMSO distillé anhydre. Le tube est placé pendant 1 heure dans un bain ultrasonique puis le mélange est transvasé dans un ballon sur lequel

sont adaptés un thermomètre et un réfrigérant muni d'un robinet.

1 mg d'acide para-toluène sulfonique (Prolabo) est alors ajouté sous agitation magnétique. Après solubilisation, 10 ml de méthyl vinyl éther (Fluka) liquéfié dans le réfrigérant sont additionnés. La température du ballon est maintenue à +15°C. L'agitation est poursuivie pendant 4 heures après l'addition du réactif.

b) Désuccinylation du polysaccharide modifié

Le mélange réactionnel est déposé directement sur une colonne de Séphadex LH - 20 (50 x 2,5 cm, 25 - 100 $\mu$ , Pharmacia) équilibrée dans de l'acétone anhydre. Le produit est élué au volume d'exclusion de la colonne collecté et concentré sous pression réduite à une température inférieure à 40°C. Le résidu sec est repris par 5 ml d'une solution de méthoxyde de sodium (Fluka) à 0,2% dans le méthanol puis le ballon muni d'un réfrigérant est placé pendant 4 heures dans un bain-marie bouillant à reflux.

c) Méthylation, hydrolyse et acétylation du polymère modifié

Le polysaccharide substitué et désuccinylé est déposé sur une colonne de Séphadex LH - 20 (30 x 1cm, 25-100 $\mu$ , Pharmacia) équilibrée dans du méthanol anhydre. Le produit est collecté au volume mort de la colonne, concentré sous pression réduite (rotavapor, Büchi) puis lyophilisé.

La méthylation, l'hydrolyse du polysaccharide méthylé, l'acétylation des monosaccharides partiellement méthylés et leur analyse par CPG

et par couplage CPG - SM sont conduites dans les conditions expérimentales décrites précédemment p. 84 et 85.

## 2) Résultats

L'analyse par CPG ne fournit aucun éther monométhyle, ce qui a été confirmé par couplage CPG - SM.

Ce résultat négatif est à mettre à l'actif de la très grande viscosité de l'exopolysaccharide à la température (+15°C) de condensation du méthyl vinyl éther. Dans ces conditions, l'accessibilité du réactif est très réduite.

Pour pallier à ce problème de viscosité, nous avons tenté de dépolymériser le polysaccharide à l'aide de glycosidases afin d'obtenir des fractions oligosaccharidiques moins visqueuses et donc plus faciles à étudier par des méthodes chimiques.

## D - UTILISATION DE GLYCOSIDASES

### 1) Extrait bactérien

L'extrait bactérien contenant des glucosidases nous a été fourni par le Pr. BOUQUELET à qui nous adressons nos remerciements.

a) Pro to o l e e x p é r i m e n t a l

200  $\mu$ g de polysaccharide natif ont été mis à dissoudre dans 100  $\mu$ l de tampon phosphate-citrate pH5, (0,02M - 0,01M). Sont alors additionnés 200  $\mu$ l de l'extrait bactérien. Le mélange est agité et placé dans un bain-marie à 45°C sous agitation constante. Un témoin blanc, constitué de 100  $\mu$ l de tampon et de 200  $\mu$ l d'extrait bactérien, ainsi que 200  $\mu$ g de polymère préalablement dépyruvaté selon la méthode de LEW et HEIDELBERGER (57), sont soumis aux mêmes conditions.

La cinétique d'hydrolyse est suivie par chromatographie sur couche mince (gel de silice, G60, Merck) : la migration des produits déposés est assurée dans le solvant n butanol, acide acétique, eau (2/1/1) : la révélation des plaques est effectuée après séchage de la couche mince, à l'aide d'orcinol-sulfurique pulvérisé, le développement de la coloration se déroulant dans une étuve à 100°C.

Les dépôts sur les plaques sont réalisés toutes les 3 heures pendant 12 heures puis aux temps d'hydrolyse 24, 30, 35 et 40 heures. Pour ce faire, la réaction est arrêtée par précipitation des protéines dans un bain-marie à 100°C pendant 3 minutes, centrifugation et dépôt de 20  $\mu$ l du surnageant sur la couche mince. L'identification des produits d'hydrolyse est donnée par comparaison des migrations avec celles d'un mélange témoin contenant des mono -, di -, tri - et tétrasaccharides.

b) R é s u l t a t s

Quel que soit le temps d'hydrolyse, nous n'observons pas de libération de mono - ou oligosaccharides pour le polysaccharide natif. Ceci peut être expliqué par la méconnaissance des enzymes précis présents dans l'extrait bactérien, par l'ignorance de leurs spécificités et sites d'action.

Toutefois, ce résultat peut aussi être imputé à un empêchement stérique d'action des glucosidases : nous savons en effet que les résidus de glucose situés en position terminale non réductrice des chaînes latérales portent des résidus pyruvyles, qui peuvent gêner l'approche enzymatique. Nous avons cependant obtenu des résultats négatifs sur le polysaccharide préalablement dépyruvaté, excluant cette dernière hypothèse.

Nous nous sommes donc intéressés à l'emploi d'enzymes commerciales purifiées, dont les spécificités d'action sont bien établies.

## 2) Laminarinases (EC 3.2.1.6., Sigma)

Ce sont des enzymes (exoglucanases) actifs sur les  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) glucanes, par exemple la laminarine, polysaccharide extrait de l'algue marine *Laminaria*.

Nous avons utilisé 2 laminarinases d'origines différentes : l'une isolée de mollusque, l'autre de *Penicillium*.

### a) Protocole expérimental

100  $\mu$ g de polysaccharide natif sont dissous dans 100  $\mu$ l de tampon citrate-acide citrique pH5. Est additionnée 0,01 unité enzymatique (10  $\mu$ g d'équivalent glucose libérés par minute). Le mélange est agité et placé dans un bain-marie à 37°C sous agitation constante.

Le même protocole est appliqué sur 100  $\mu$ g de polymère préalablement dépyruvaté et sur 100  $\mu$ g de laminarine (Sigma). Le témoin blanc est constitué de 100  $\mu$ l de tampon et de 0,01 unité enzymatique.



La cinétique et le suivi de l'hydrolyse sont réalisés comme précédemment décrit.

### b) Résultats

L'hydrolyse enzymatique se déroule normalement sur la laminarine indiquant l'activité glucosidasique. Nous n'obtenons cependant pas de libération de glucose pour le polymère natif et dépyruvaté, indiquant soit l'absence de résidu glucosyl lié en  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) en position terminale non réductrice, soit une difficulté d'accessibilité de l'enzyme au substrat de par la viscosité du biopolymère. Nous verrons, après les résultats d'acétolyse, que le glucose en position terminale non réductrice est bien lié en  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) sur un autre résidu glucosyl, ce qui semble indiquer que c'est bien la viscosité du polysaccharide donc son arrangement spatial très ordonné en solution, qui empêche l'activité enzymatique.

### 3) Conclusions

Nous ne pouvons pas tirer des conclusions définitives des manipulations précédentes. Il semble en effet que nous soyons gênés par la viscosité du polymère, ce qui se traduit par une distribution très ordonnée des chaînes polysaccharidiques ; cette disposition empêcherait aux enzymes d'agir sur les monosaccharides concernés.

De plus, la présence de résidus de type pyruvate et succinate ne permet pas aux enzymes d'agir. Ce fait est en faveur du rôle protecteur des exopolysaccharides vis à vis d'agents anti-bactériens, comme les bactériophages.

La solution à ces problèmes sera donnée par l'identification et l'isolement du bactériophage, spécifique du polysaccharide étudié, portant les endo-enzymes permettant d'obtenir l'unité de répétition du biopolymère.

E - OXYDATION PERIODIQUE - DEGRADATION DE SMITH

Le polysaccharide a été oxydé par l'acide periodique à l'aide de la technique de GOLDSTEIN et al. (40).

En présence de métaperiodate de sodium, tous les groupements  $\alpha$  - glycols sont rompus. Les fonctions aldéhydiques formées sont réduites par du borohydrure de potassium. Les oligosaccharides résistant à l'oxydation sont libérés après hydrolyse par l'acide trifluoroacétique, séparés par CLHP puis analysés par CPG et par couplage CPG - SM.

1) Matériels et méthodes

a) Oxydation periodique

A une solution de 20 mg de polysaccharide dans 5 ml d'eau distillée sont additionnés 5 ml de métaperiodate de sodium (Prolabo) 0,1M. Cette concentration a été déterminée grâce aux résultats de méthylation permettant de calculer la consommation théorique, de façon à opérer en présence d'un excès de periodate. Le mélange est maintenu à +4°C à l'obscurité pendant 168 heures.

La réaction est ensuite arrêtée par addition de 2 ml d'éthylène glycol (Prolabo), afin de détruire le periodate restant, puis le mélange est dialysé pendant 48 heures contre de l'eau distillée. Les polyaldéhydes formés lors de l'oxydation sont réduits par 100 mg de borohydrure de potassium (Prolabo) pendant une nuit à température ambiante en solution aqueuse de pH 10. Le borohydrure en excès est détruit par de l'acide acétique à 50 % (Prolabo). La solution est évaporée à siccité puis débarrassée de l'acide borique par 5 codistillations à l'aide de méthanol (Merck).

b) Dégradation de Smith

Le résidu sec est repris par 5 ml d'acide trifluoroacétique 1N, l'hydrolyse étant poursuivie pendant 20 heures à température ambiante. L'acide est ensuite éliminé par 3 codistillations avec du méthanol (Merck).

c) Séparation par CLHP des oligosaccharides résistant à l'oxydation

Les oligosaccharides résistant à l'oxydation sont purifiés par chromatographie de filtration sur gel sur colonne TSK PW G2000 (300 x 7,8 mm, Biorad) dans les conditions expérimentales suivantes ; pompe Shimadzu LC-5A, débit du solvant (eau) : 0,4 ml/min, détection réfractométrique (réfractomètre Spectra-Physics modèle 6040 : sensibilité 8).

La chromatographie est effectuée en 5 injections de 500  $\mu$ l chacune

d) Analyse des oligosaccharides par CPG après méthanolyse et trifluoroacétylation

Les oligosaccharides purifiés sont lyophilisés puis une partie est analysée par CPG des méthyl-glycosides trifluoroacétylés selon la méthode décrite par ZANETTA et al. (147).

La moitié de chaque fraction oligosaccharidique lyophilisée en présence de 100  $\mu$ g de méso-inositol (témoin interne) est méthanolysée pendant 24 heures à 80°C par un mélange de méthanol-acide chlorhydrique 0,5N. Le tube est refroidi et le solvant est évaporé sous courant d'azote.

Le résidu sec est repris par 100  $\mu$ l de dichlorométhane (Prolabo) et 100  $\mu$ l d'anhydride trifluoroacétique (Merck). La trifluoroacétylation est effectuée par 2 chauffages successifs de la solution à 150°C pendant 5 minutes.

7  $\mu$ l de la solution de méthyl-glycosides trifluoroacétylés sont analysés par CPG dans les conditions expérimentales suivantes : chromatographe Varian Aerograph type 1400, colonne de verre remplie de silicone OV - 210 sur support chromosorb W(H.P.) à 5% (100 - 120 mesh), température programmée de 100°C à 220°C à raison de 2°C/min, température de l'injecteur et du détecteur : 220°C, débit du gaz vecteur (hélium) : 20 ml/min.



e) Etude de la structure des oligosaccharides par perméthylation

Les protocoles expérimentaux de méthylation et d'analyse par CPG des éthers méthyliques sont identiques à ceux décrits p. 84-85. Ils sont appliqués sur la seconde moitié de chaque oligosaccharide.

## 2) Résultats

### a) CLHP

La figure 19 p. 101 illustre la purification et la séparation des oligosaccharides résistant à l'oxydation periodique.

Nous avons pu noter que la réponse des oligosaccharides au détecteur réfractométrique n'était pas augmentée lors d'une oxydation periodique plus longue. Ceci indique que nous avons obtenu, au bout de 168 heures, une coupure quantitative de toutes les liaisons  $\alpha$ -glycols.

La figure fait apparaître 2 pics de temps de rétention équivalents à un disaccharide (A) et un monosaccharide (B). Or, les résultats de la méthylation du polysaccharide original ont montré que 3 résidus ne sont pas susceptibles à l'action du periodate : 2 résidus de glucose (2,4,6-tri-O-méthyl-glucose) et 1 résidu de galactose (2,4,6-tri-O-méthyl-galactose). Les pics obtenus en CLHP sont donc à priori constitués de ces 3 résidus.

### b) Analyse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés par CPG

La figure 20 p. 102 illustre le résultat de la chromatographie en phase gazeuse des méthyl-glycosides trifluoroacétylés des pics A et B obtenus après CLHP.

Le pic A est constitué uniquement de glucose alors que le pic B contient du galactose et un peu de glucose, probablement contaminant du pic A.

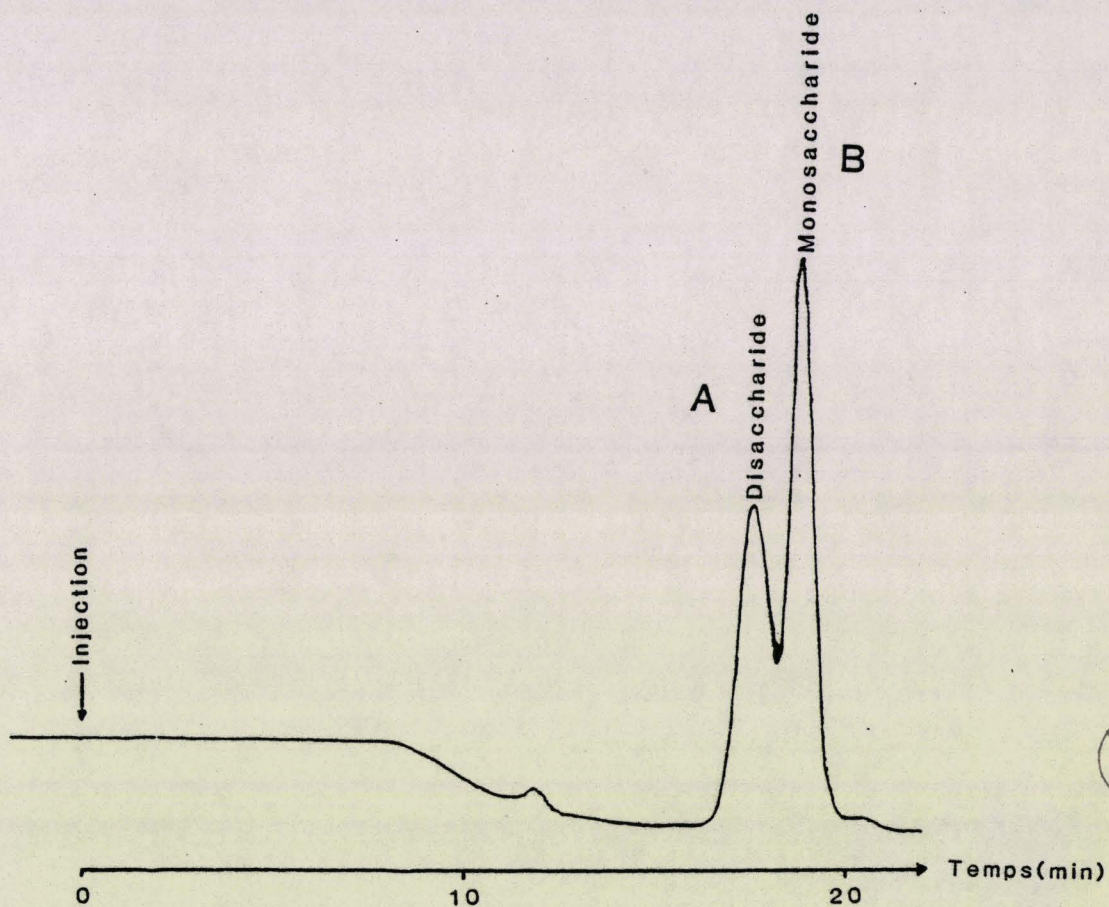


FIGURE 19

Séparation des oligosaccharides résistant à l'oxydation périodique par CLHP de filtration sur gel sur colonne TSK PW G2000 (300 x 7,8mm ; Biorad).

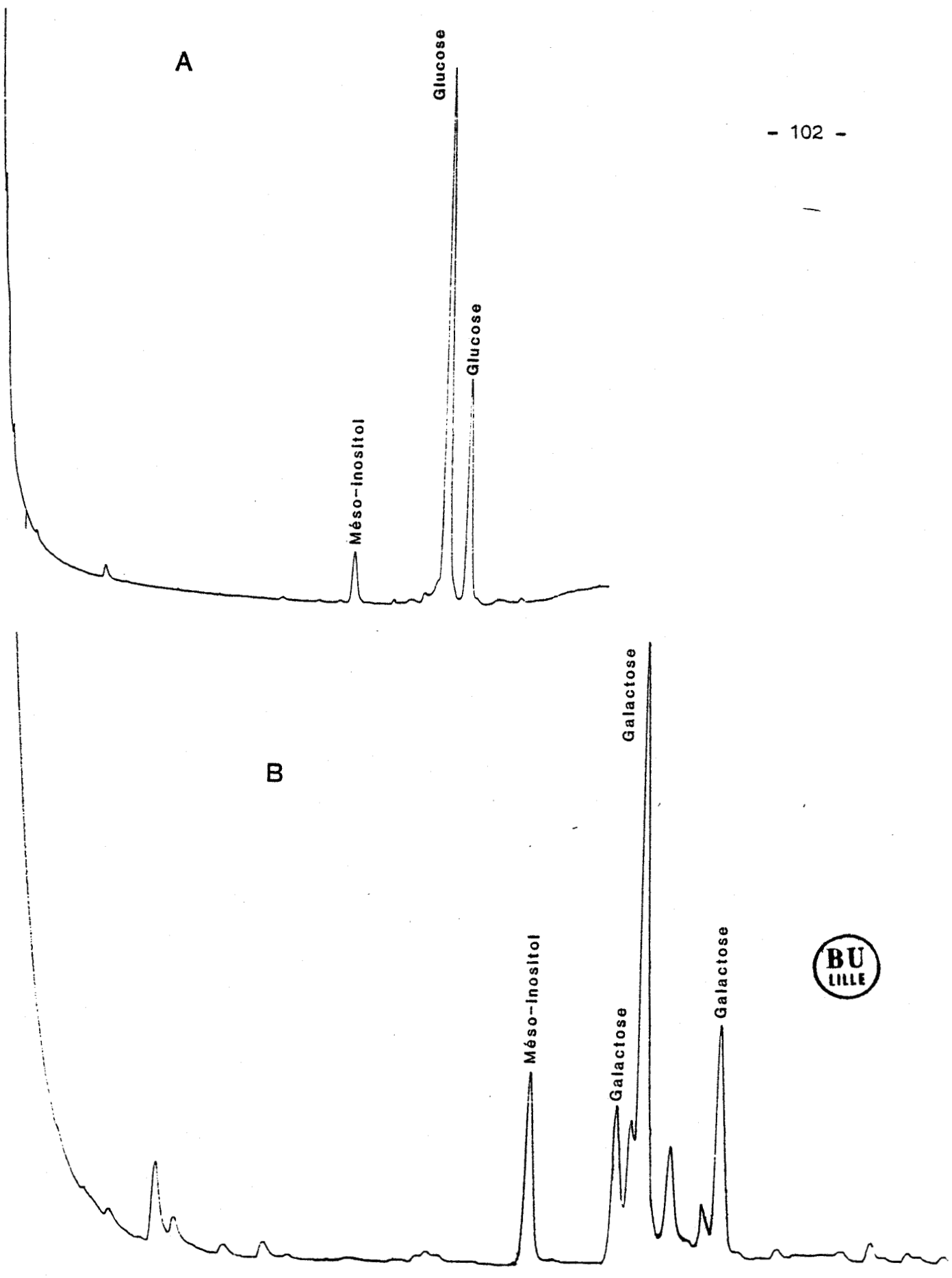


FIGURE 20

Analyse, par CPG sur colonne de verre remplie de silicone OV-210, des méthylglycosides trifluoroacétylés des pics A et B isolés après CLHP.

Ces résultats, conjugués à ceux de la méthylation du polysaccharide original, permettent d'envisager la présence du disaccharide (1 → 3) Glc (1 → 3) Glc (1 → dans le pic A et du monosaccharide (1 → 3) Gal (1 → dans le pic B. Ces hypothèses sont confirmées ci-après par méthylation.

c) Analyse structurale des pics A et B par CPG après perméthylation

Les figures 21 et 22 p. 104 et 105 illustrent les chromatogrammes en phase gazeuse des éthers méthyliques obtenus après perméthylation, méthanolyse et acétylation du pic A et du pic B respectivement. Le pic A est constitué de 2 éthers méthyliques du glucose : le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucose et le 2,4,6-tri-O-méthyl-glucose dans des rapports molaires (calculés par intégration du courant ionique total de chaque ion en couplage CPG - SM) de 1 pour 1. Cette expérience confirme que le pic A est bien un disaccharide Glc (1 → 3) Glc résistant à l'oxydation periodique. Le pic B est principalement constitué de 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactose mais aussi d'éthers méthyliques du glucose qui correspondent à une contamination du pic A. Ce résultat indique que le galactose, résistant à l'oxydation periodique, est bien conjugué par son hydroxyle du carbone 3 dans la chaîne polysaccharidique.

F - ACETOLYSE PARTIELLE

Cette méthode coupe préférentiellement les liaisons 1 → 6, les liaisons 1 → 3 et 1 → 4 étant clivées plus lentement.



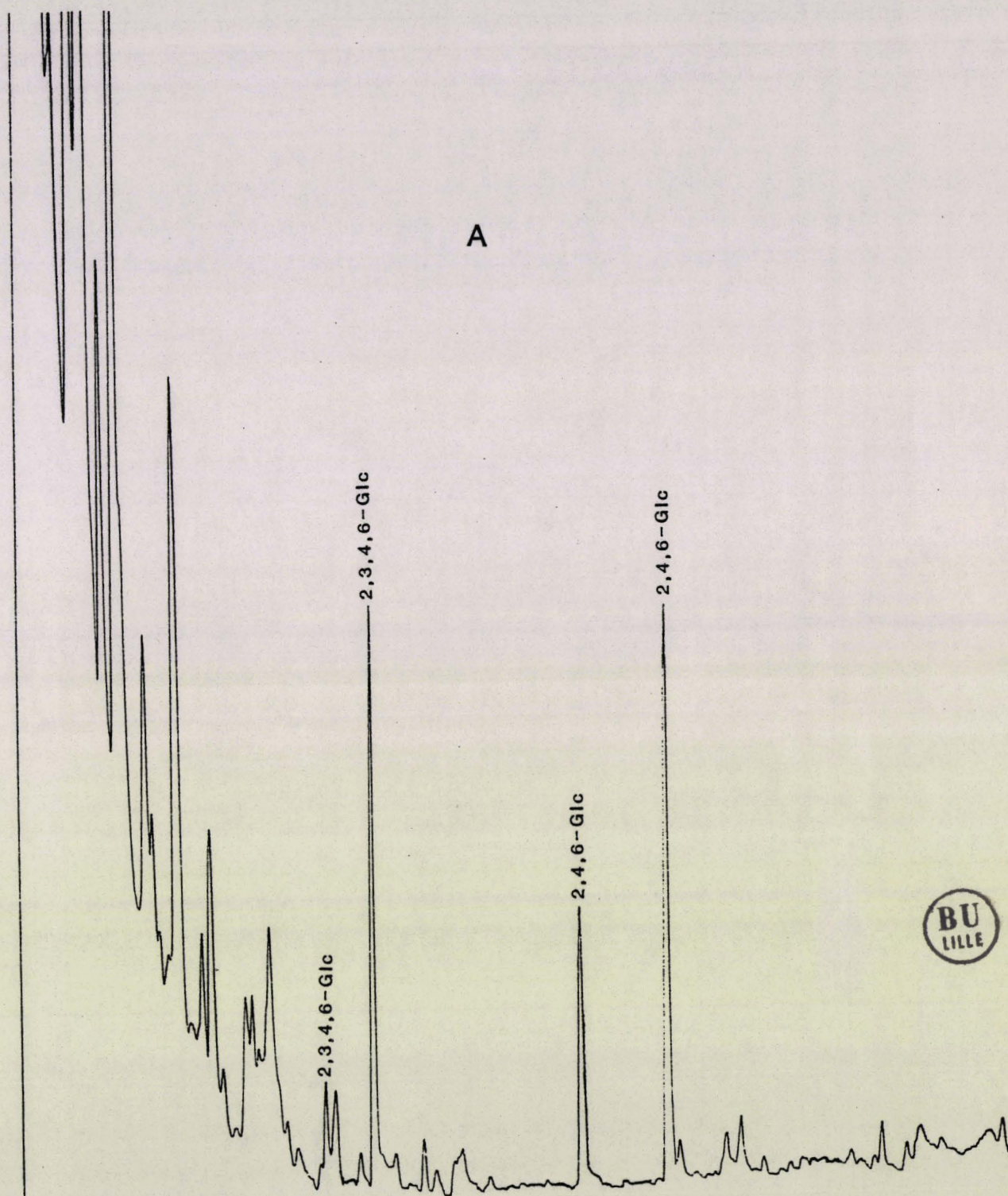


FIGURE 21

Analyse, par CPG sur colonne capillaire de verre imprégnée de silicone OV-101, des éthers méthyliques méthyl-glycosylés et acétylés du pic A isolé après CLHP.

B

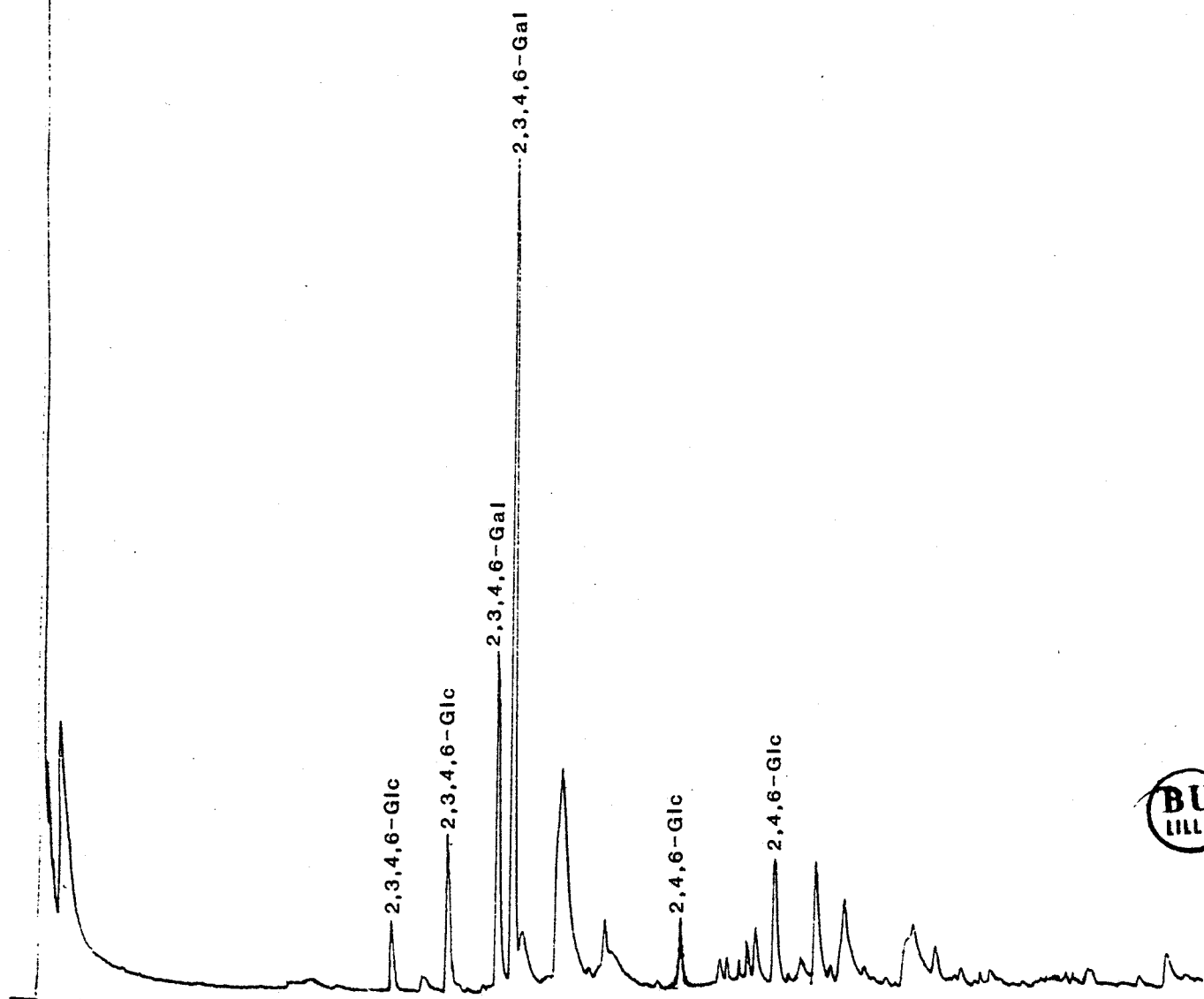


FIGURE 22

Analyse, par CPG sur colonne capillaire de verre imprégnée de silicone OV-101, des éthers méthyliques méthyl-glycosylés et acétylés du pic B isolé après CLHP.

1) Matériels et méthodes

a) Acétolyse

Nous avons utilisé le procédé décrit par BAYARD et MONTREUIL (148)

10 mg de polysaccharide sont dissous dans 1ml de réactif acétolysant (acide acétique, anhydride acétique, acide sulfurique ; 10 : 10 : 1 ; Prolabo) conservé à +4°C. La réaction est poursuivie pendant 48 heures à température ambiante. La solution est ensuite déposée sur 2 g de glace, le milieu étant neutralisé à l'aide de bicarbonate de sodium.

Les mono- et oligosaccharides acétylés sont extraits 5 fois par 2 ml de chloroforme (Merck). Les phases chloroformiques réunies sont lavées par une solution saturée de bicarbonate de sodium puis séchées par du sulfate de sodium anhydre.

La phase organique est évaporée sous courant d'azote, reprise par 1 ml d'acétone et 2 ml d'eau : le pH de la solution est ajusté à 10 à l'aide d'ammoniaque 1N. La réduction des oligosaccharides est effectuée par addition de 10 mg de borohydrure de potassium qui en outre réalise la O-désacétylation des oligosaccharides. La réaction est poursuivie pendant une nuit à température ambiante puis arrêtée par addition de résine Dowex 50 x 8 (forme H<sup>+</sup>, Biorad) jusqu'à atteindre un pH de 4. La solution est filtrée puis codistillée en présence de méthanol afin d'éliminer l'acide borique formé.

b) Séparation des mono- et oligosaccharides aldéols

Le résidu sec est repris par 1 ml d'eau et les oligosaccharides sont purifiés et séparés par CLHP de filtration sur gel sur 2 colonnes branchées en série (TSK PW G3000, 300 x 7,5 mm, Biorad ; TSK PW G2000,

300 x 7,8 mm, Biorad). Le débit de l'éluant (eau, Millipore) est de 0,4 ml/min. La détection des composés est assurée par réfractométrie (réfractomètre Spectra-Physics, modèle 6040, sensibilité 8).

La chromatographie est réalisée en deux temps. Une première injection permet d'éliminer le polysaccharide résiduel qui migre au volume d'exclusion des colonnes. Les oligosaccharides retardés sont alors reinjectés dans les mêmes conditions.

c) Analyse des mono- et oligosaccharides alditols purifiés, par CPG après méthanolyse et triméthylsilylation.

Chaque pic obtenu après CLHP est lyophilisé puis la moitié de chacun est analysée par CPG des méthyl-glycosides triméthylsilylés selon la méthode de GERWIG et al. (149). Le même protocole est appliqué sur un témoin blanc.

Les oligosaccharides sont méthanolysés par 1ml d'un mélange de méthanol et d'acide chlorhydrique 0,5N pendant 24 heures à 80°C. Après extraction des acides gras par 3 fois 100  $\mu$  l d'heptane, le solvant est séché sous courant d'azote. La triméthylsilylation est effectuée par 100  $\mu$  l de bis-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA, Pierce) et 100  $\mu$  l de pyridine (Merck). La réaction de silylation est poursuivie pendant 4 heures à température ambiante.

Les méthyl-glycosides triméthylsilylés sont analysés par CPG dans les conditions expérimentales suivantes : appareil Girdel série 300, colonne capillaire de silicone OV-101 greffé chimiquement (25 m x 0,2 mm, CP Sil 5-CB, Chrompack) température programmée de 120°C à 240°C à raison de 2°C/min, température de l'injecteur et du détecteur fixée à 230°C, pression du gaz vecteur (hélium) 0,05 bar. Les rapports d'intégration de chaque éther triméthylsilylé des monosaccharides sont calculés à l'aide d'un intégrateur Spectra-Physics (modèle 4100).

La figure 23 p.109 illustre la séparation des mono- et oligo-saccharides alditoles obtenus après 48 heures d'acétolyse. Nous avons arrêté la réaction à ce temps car nous sommes aperçus qu'une acétolyse prolongée (72 heures et plus) provoque non pas l'apparition de nouveaux oligo-saccharides mais une diminution de la quantité des oligosaccharides déjà présents au profit des monosaccharides. Il est à noter qu'au bout de 4 heures d'acétolyse, le seul pic apparaissant possède un temps de rétention équivalent à un tétrasaccharide (A). Puis, après 6 heures d'acétolyse, apparaissent simultanément 2 pics qui correspondent à un trisaccharide (B) et à un monosaccharide (D). Le disaccharide (C) n'est identifié qu'après 12 heures d'acétolyse. Il est difficile d'interpréter ces résultats : c'est la raison pour laquelle nous sommes employés à analyser chacun des 4 pics ainsi que le pic d'exclusion qui correspond, comme nous le verrons plus loin, au motif de base, dépourvu des chaînes latérales.

a) Séparation des mono- et oligosaccharides alditoles par CLHP

2) Résultats

Le protocole de méthylation des oligosaccharides alditoles ainsi que l'analyse des éthers méthyliques par CPG et couplage CPG-SM sont identiques à ceux décrits p. 84 et 85.

d) Étude à l'analyse des oligosaccharides alditoles par CPG après perméthylation, méthylation et acétylation

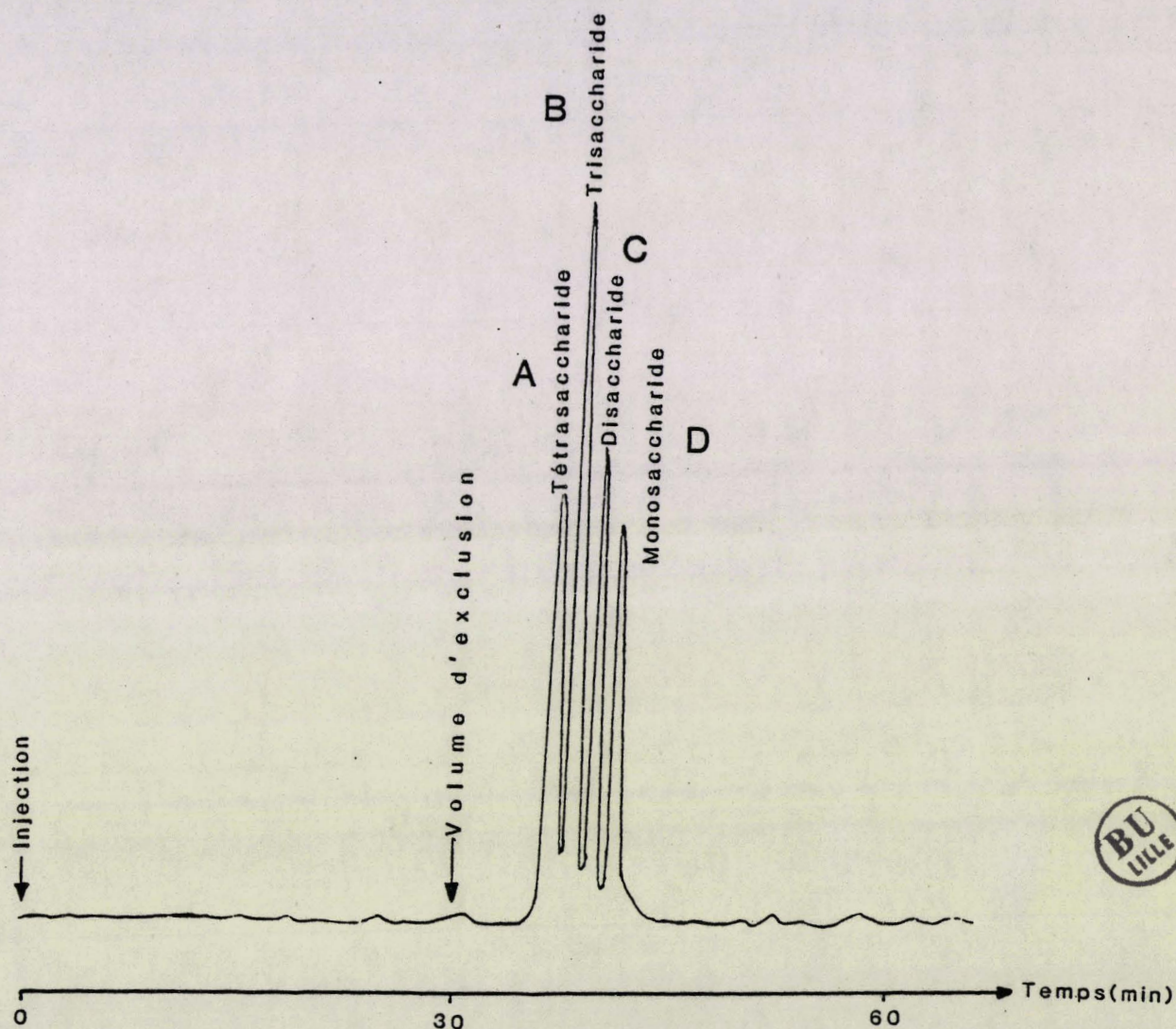


FIGURE 23

Séparation, par CLHP sur colonnes couplées de TSK PW G3000 et PW G2000, des mono- et oligosaccharides alditols obtenus par acétolyse du polysaccharide débarrassé du pic d'exclusion (la flèche indique le temps de rétention du polysaccharide résiduel : 30 minutes).

b) Analyse des mono- et oligosaccharides alditols par CPG  
après méthanolyse et triméthylsilylation

Le tableau XII p. 111 donne les résultats de la composition en monosaccharides des pics obtenus par CLHP (pic exclu, A, B, C, D). Nous pouvons constater d'une part que les oligosaccharides sont constitués uniquement de glucose et d'autre part que les compositions molaires sont en parfait accord avec le diagramme d'élution de CLHP (composé A, tétrasaccharide : composé B, trisaccharide : composé C, disaccharide : composé D, glucitol). Quant au pic d'exclusion, l'absence sur les diagrammes de CPG d'un pic significatif d'alditol permet de conclure à l'état polysaccharidique de cette fraction.

c) Analyse structurale des fractions oligo- et polysaccharidiques  
obtenues par CLHP de l'acétolysat du polysaccharide

Les figures 24 à 27 p.115 à 118 illustrent les résultats de l'analyse par CPG des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse du perméthyl polysaccharide (pic exclu) et des perméthyl oligosaccharides alditols A, B et C. Le tableau XIII p. 114 fournit les rapports molaires des éthers méthyliques des différentes fractions (rapports calculés par intégration du courant ionique total de chaque ion, par couplage CPG-SM).

Nous constatons que le pic exclu contient presque exclusivement 2 éthers méthyliques : le 2, 4, 6-tri-O-méthyl-galactose et le 2, 3, 6-tri-O-méthyl-glucose dans les rapports de 1 pour 3 (2,6) respectivement. Nous ne retrouvons pas ces 2 résidus dans les pics A, B et C. La présence en faible quantité des 3 autres éthers méthyliques (2, 3, 4- et 2,4,6-tri-O-méthyl-glucose et 2, 3-di-O-méthyl-glucose) est à mettre à l'actif d'une petite proportion de polymère natif non acétolysé. Toutefois, l'absence d'éthers perméthylés dans ce pic exclu indique, sans ambiguïté, la nature polysaccharidique de cette fraction.

TABLEAU XII

Compositions molaires en monosaccharides des fractions obtenues par CLHP de l'acétolysat du polysaccharide.

Fractions	Monosaccharides		
	Gal	Glc	Glucitol
Pic exclu (1)	1	3,2 (3)	
Pic A (2)		2,8 (3)	1
Pic B (2)		2,1 (2)	1
Pic C (2)		0,9 (1)	1
Pic D (2)			1

(1): rapports calculés sur la base d'1 résidu de galactose.

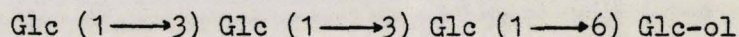
(2): rapports calculés sur la base d'1 résidu de glucitol.



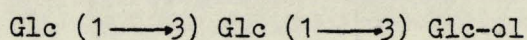


En outre, l'absence de 2,3-di-O-méthyl-glucose dans les pics A, B et C ainsi que dans le pic exclu marque l'action effective du réactif acétolysant sur les liaisons (1→6). Ce résultat est confirmé par la présence de 3 résidus de 2,3,6-tri-O-méthyl-glucose dans le pic exclu alors que la perméthylation du polysaccharide original ne donne que 2 de ces résidus. Nous voyons d'autre part que les pics A, B et C contiennent du perméthyl-glucose non identifié dans le pic exclu, indiquant la libération des chaînes latérales de l'unité de répétition du biopolymère.

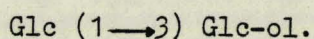
Ces résultats prouvent que l'acétolyse permet la libération des chaînes latérales conjuguées sur le squelette de base (pic exclu) par une liaison (1→6). Ce squelette de base est constitué de 4 monosaccharides : 3 résidus de glucose pour 1 de galactose. Quant aux fractions oligosaccharidiques isolées, elles représentent la chaîne latérale de l'unité répétitive. L'oligosaccharide A constitue la chaîne latérale complète, la perméthylation permettant de donner la séquence suivante pour cet oligomère :



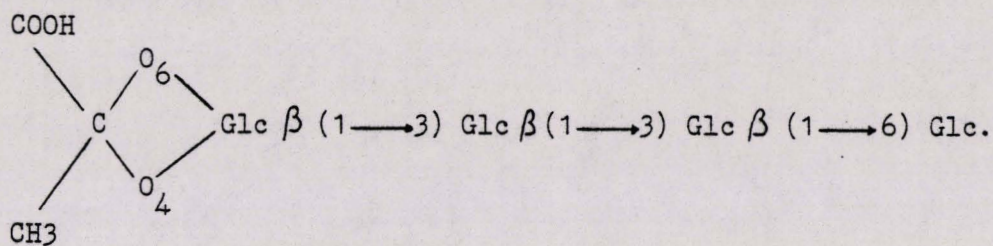
les deux autres oligosaccharides (pics B et C) constituent des fragments de la chaîne latérale : le pic B, par rupture de la liaison (1→6) du tétrasaccharide A, fournit le trisaccharide suivant :



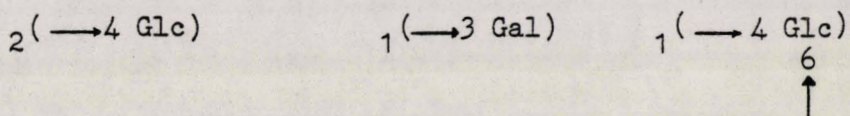
quant au pic C, il est de nature disaccharidique de séquence :



Compte tenu des résultats de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et de ceux de la perméthylation, on peut donner avec certitude la séquence complète de la chaîne latérale du polysaccharide : cette unité se termine par un résidu pyruvyle conjugué sur le glucose terminal non réducteur par une liaison acétalique sur les hydroxyles des carbones 4 et 6 (présence de 2 résidus de 2,3-di-O-méthyl-glucose dans le polymère natif et de 1 résidu de 2,3-di-O-méthyl-glucose pour 1 résidu de perméthyl glucose dans le polymère dépyruvaté). Cette unité latérale possède donc la structure :



Comme nous l'avons vu ci-dessus, la chaîne principale est constituée de 4 monosaccharides : 3 résidus de glucose pour 1 de galactose. Tous ces monosaccharides sont en liaison  $\beta$ , mais dans l'état actuel d'avancement de nos travaux, il n'est pas possible de donner la séquence de cette chaîne. Nous résumons donc nos résultats sous la forme suivante :



Nous pouvons donc conclure, au terme de cette étude de perméthylation, à la séquence de répétition suivante pour le polysaccharide :

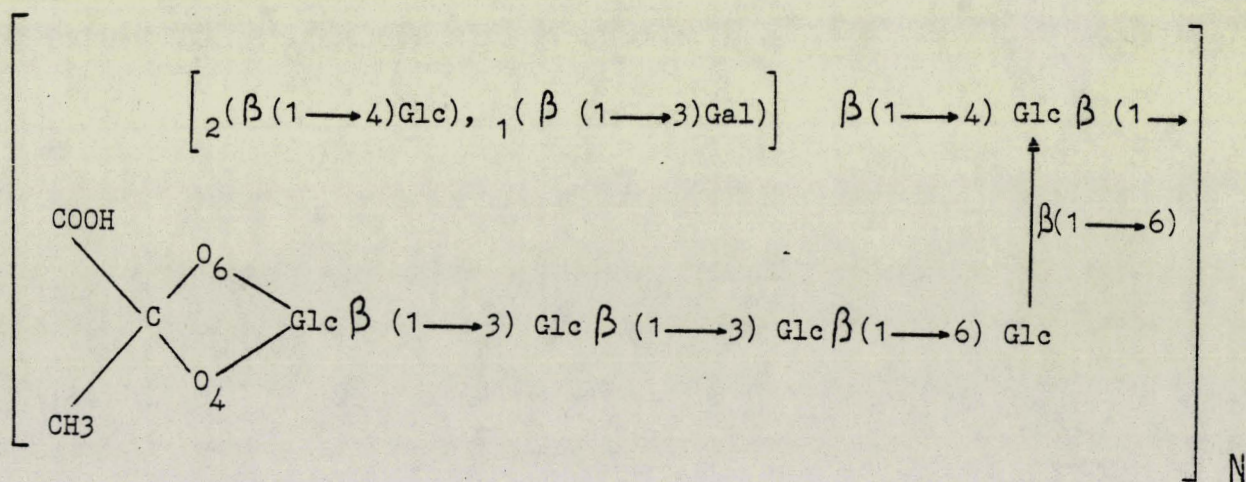


TABLEAU XIII

Rapports molaires des éthers méthyliques (calculés par couplage CPG-SM par intégration du courant ionique total de chaque ion) obtenus par méthanolyse du polysaccharide natif dépyruvaté perméthylé et par méthanolyse du pic exclu et des pics A, B, C, isolés par CLHP après acétolyse et perméthylés.

Fractions	Ethers méthyliques						
Polysaccharide natif dépyruvaté (1)	0,4	0,8	1,8	2,3,6-Glc	2,4,6-Glc	2,3-Glc	1,2,3,4,5-Glc <sup>ol</sup> ou 1,2,3,5,6-Glc <sup>ol</sup>
Pic exclu (1)						1	1,2
Pic A (2)	1		2,6			1	0,8
Pic B (2)							0,7
Pic C (2)							0,7
							1,2

(1) : rapports calculés sur la base d'1 résidu de 2,4,6-tri-O-méthyl-galactose.

(2) : rapports calculés sur la base d'1 résidu de 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucose.



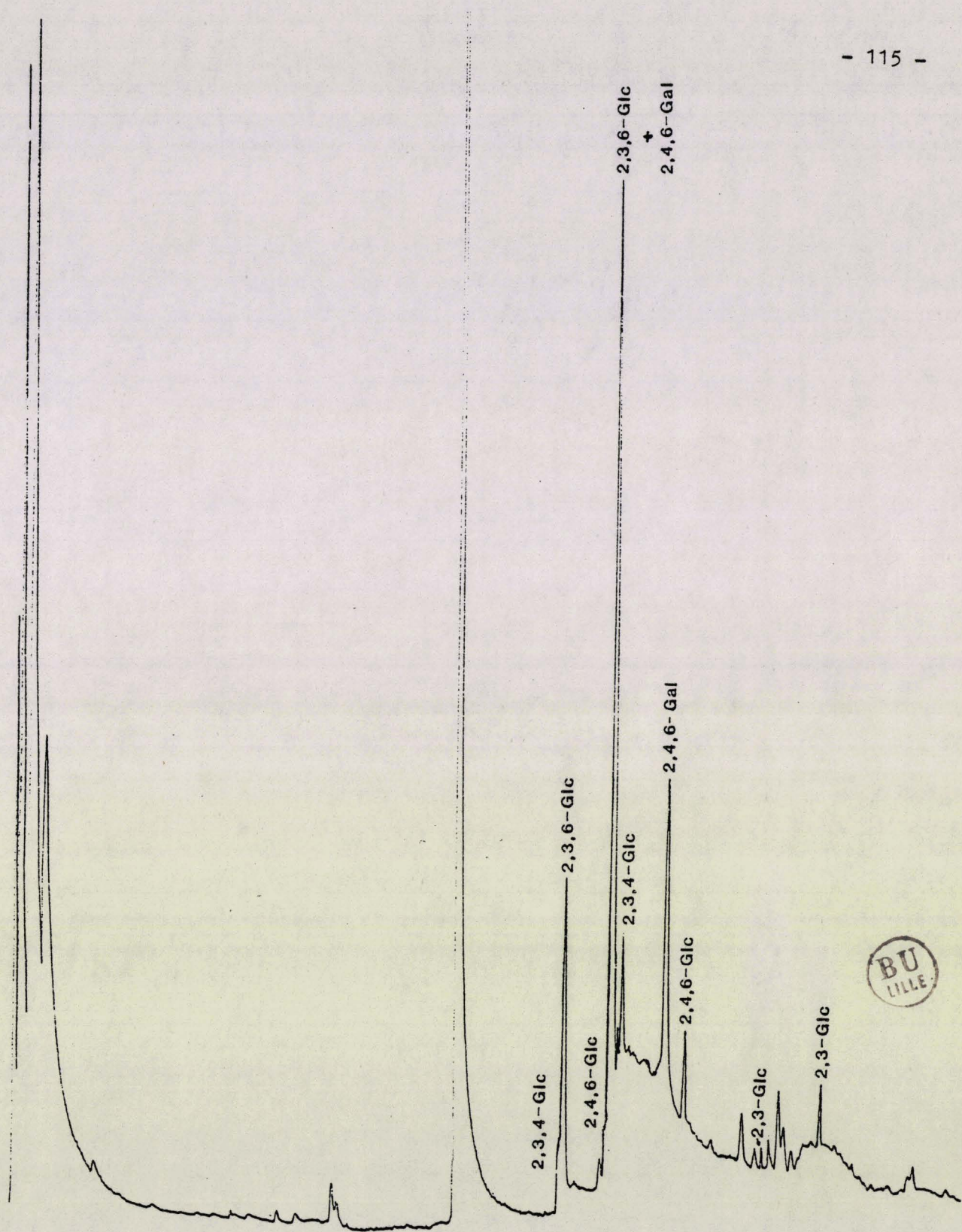


FIGURE 24

Analyse, par CPG sur colonne capillaire imprégnée de silicone OV-101, des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse du pic exclu, isolé par CLHP après acétolyse et perméthylé.

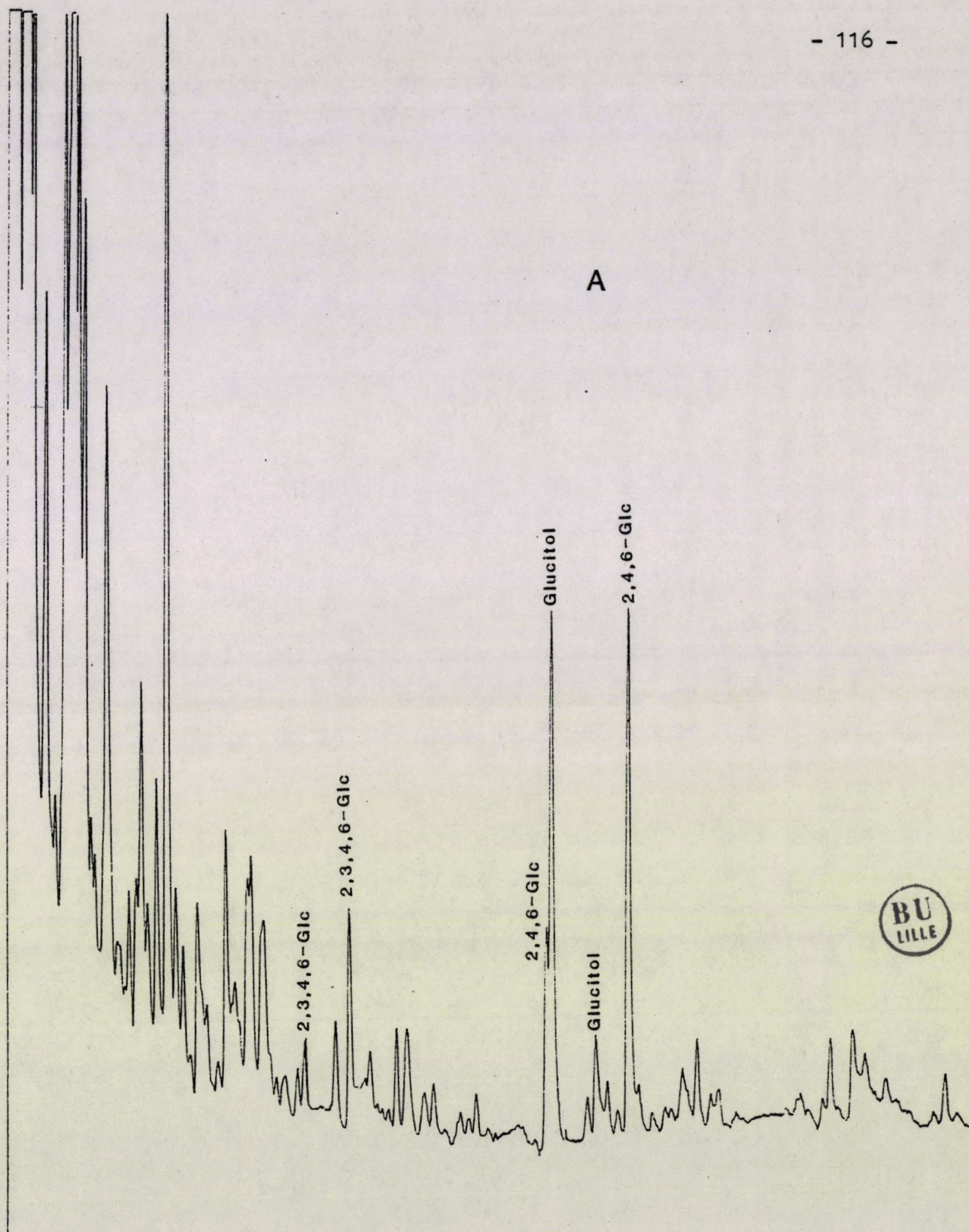


FIGURE 25

Analyse, par CPG sur colonne capillaire imprégnée de silicone OV-101, des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse du pic A (tétrasaccharide), isolé par CLHP après acétolyse et perméthylé.

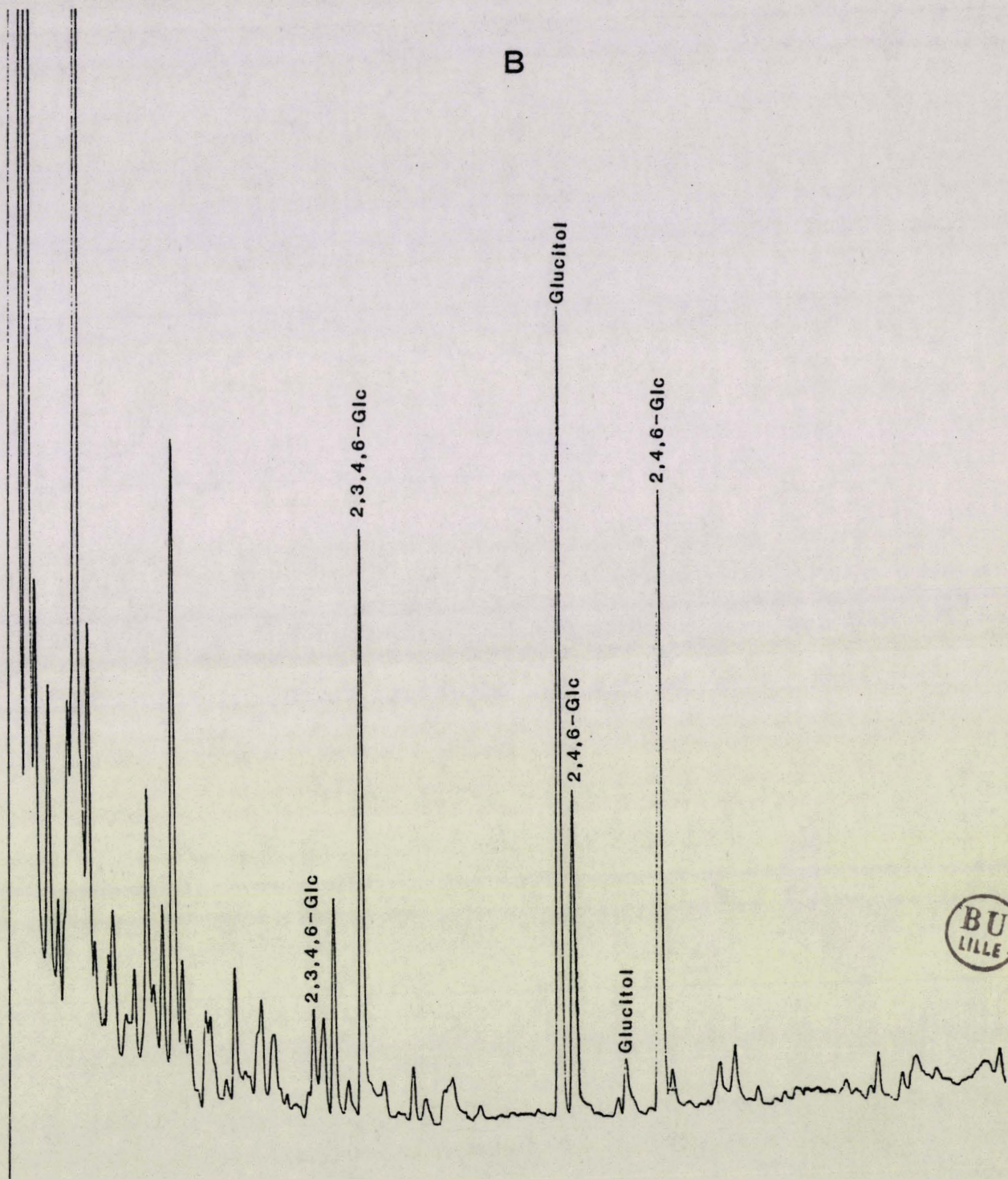


FIGURE 26

Analyse, par CPG sur colonne capillaire imprégnée de silicone OV-101, des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse du pic B (trisaccharide), isolé par CLHP après acétolyse et perméthylé.

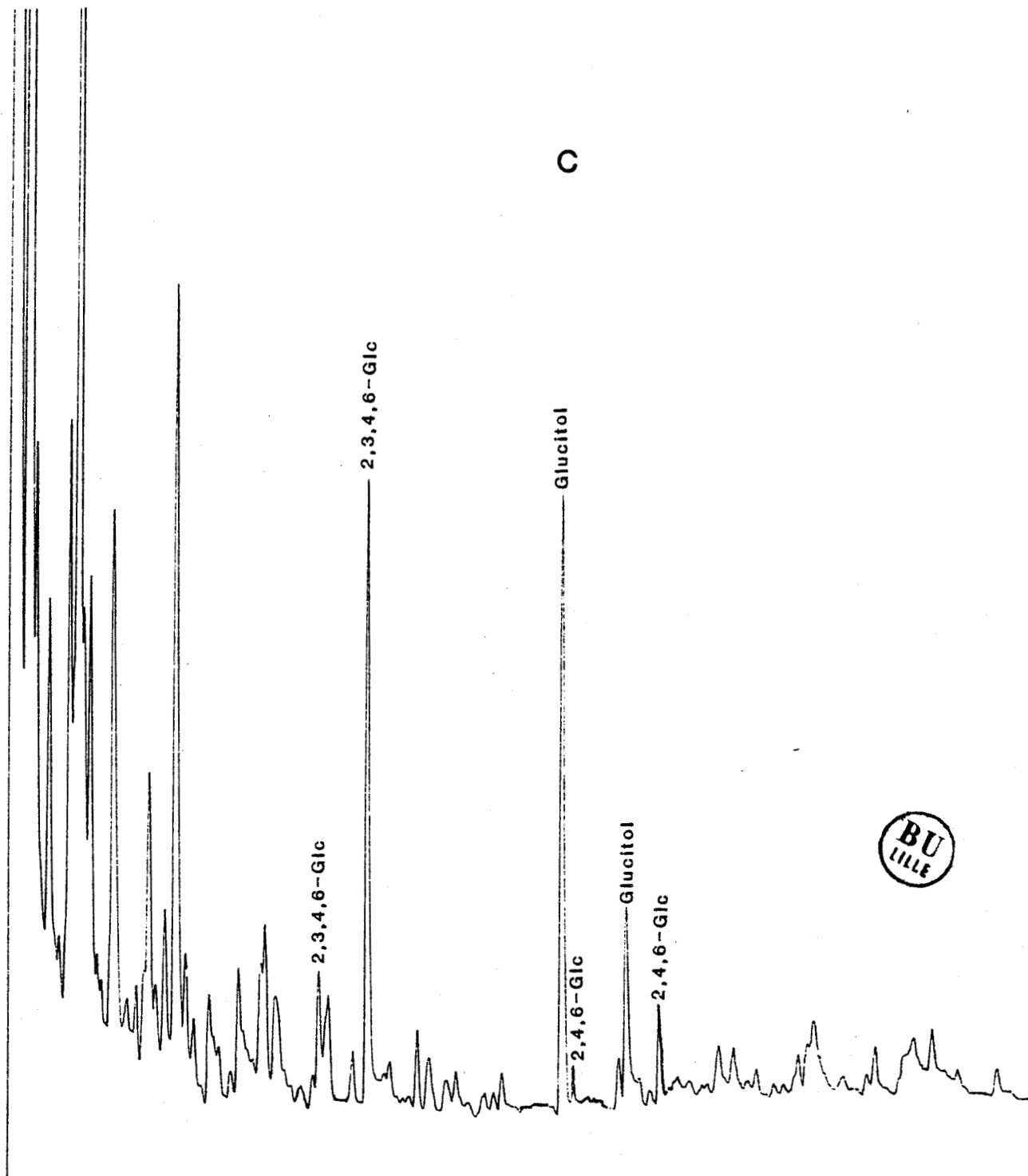


FIGURE 27

Analyse, par CPG sur colonne capillaire imprégnée de silicone OV-101, des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse du pic C (disaccharide), isolé par CLHP après acétolyse et perméthylé.

IV - PROPRIETES RHEOLOGIQUES - FACTEURS INFLUENCANT LA VISCOSITE

---

DU POLYSACCHARIDE

---

Ces études ont été effectuées au Centre d'Etudes et de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) de Grenoble par MM. A. HEYRAUD et Ph. COLIN-MOREL.

A - ETUDE DE LA VISCOSITE RELATIVE DU POLYSACCHARIDE

Le pouvoir épaississant du polymère est simplement estimé par le niveau de viscosité obtenu sur une solution à 1g/l dans le chlorure de sodium 0,1M. A titre comparatif, nous avons également présenté sur la figure 28 p.121 les valeurs des viscosités relatives mesurées sur des solutions de xanthane (Rhodopol).

Ces calculs sont effectués à l'aide d'un viscosimètre LOW-SHEAR 30 (Contraves) équipé d'un programmeur RHEOSCAN 30 et thermostaté à  $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$  grâce à un régulateur de température HAAKE.

Ce viscosimètre a la configuration d'un appareil de Couette dans lequel le gradient de vitesse est sensiblement constant. Ce gradient est engendré par le mouvement de rotation l'un par rapport à l'autre de deux cylindres coaxiaux entre lesquels se trouve le liquide à étudier. Le cylindre intérieur est suspendu à un fil de torsion, le cylindre extérieur pouvant être animé d'un mouvement de rotation uniforme de vitesse angulaire  $\omega$  connue. Les couches périphériques sont entraînées par le cylindre extérieur et, par action de proche en proche, le cylindre intérieur tend à suivre le



mouvement de rotation ; le fil de suspension exerce un couple antagoniste qui va en croissant avec l'angle de rotation ; en régime permanent, le cylindre intérieur prend une position d'équilibre fixe telle que le couple de torsion du fil de suspension équilibre exactement les forces de frottement qui s'exercent sur toute la surface latérale du cylindre interne.

Cette variation du couple mesurée par le fil de torsion est traduite en viscosité.

Ce type de viscosimètre permet de travailler à de faibles gradients de cisaillement ( $\dot{\gamma} = 0,01747 \text{ s}^{-1}$  à  $\dot{\gamma} = 128,5 \text{ s}^{-1}$ ).

Les viscosités relatives sont calculées selon la formule :

$$\eta_{\text{rel}} = \frac{\eta_{\text{mesurée}}}{\eta_0}$$

où  $\eta_0$  = viscosité du solvant à une température donnée.

La viscosité réduite correspond à

$$\eta_{\text{réd}} = \frac{\eta_{\text{rel}} - 1}{C} \text{ en ml.g}^{-1}$$

où C = concentration du polymère en g. ml<sup>-1</sup>.

La viscosité intrinsèque ( $[\eta]$ ) correspond à l'extrapolation à concentration nulle de la viscosité réduite ( $\eta_{\text{réd}}$ ).

La figure 28 p. 121, illustrant les résultats des viscosités relatives du polysaccharide et du xanthane en fonction du gradient de cisaillement, montre la très grande similitude entre les deux tracés. Cette étude indique la très grande valeur rhéologique de notre exopolymère.

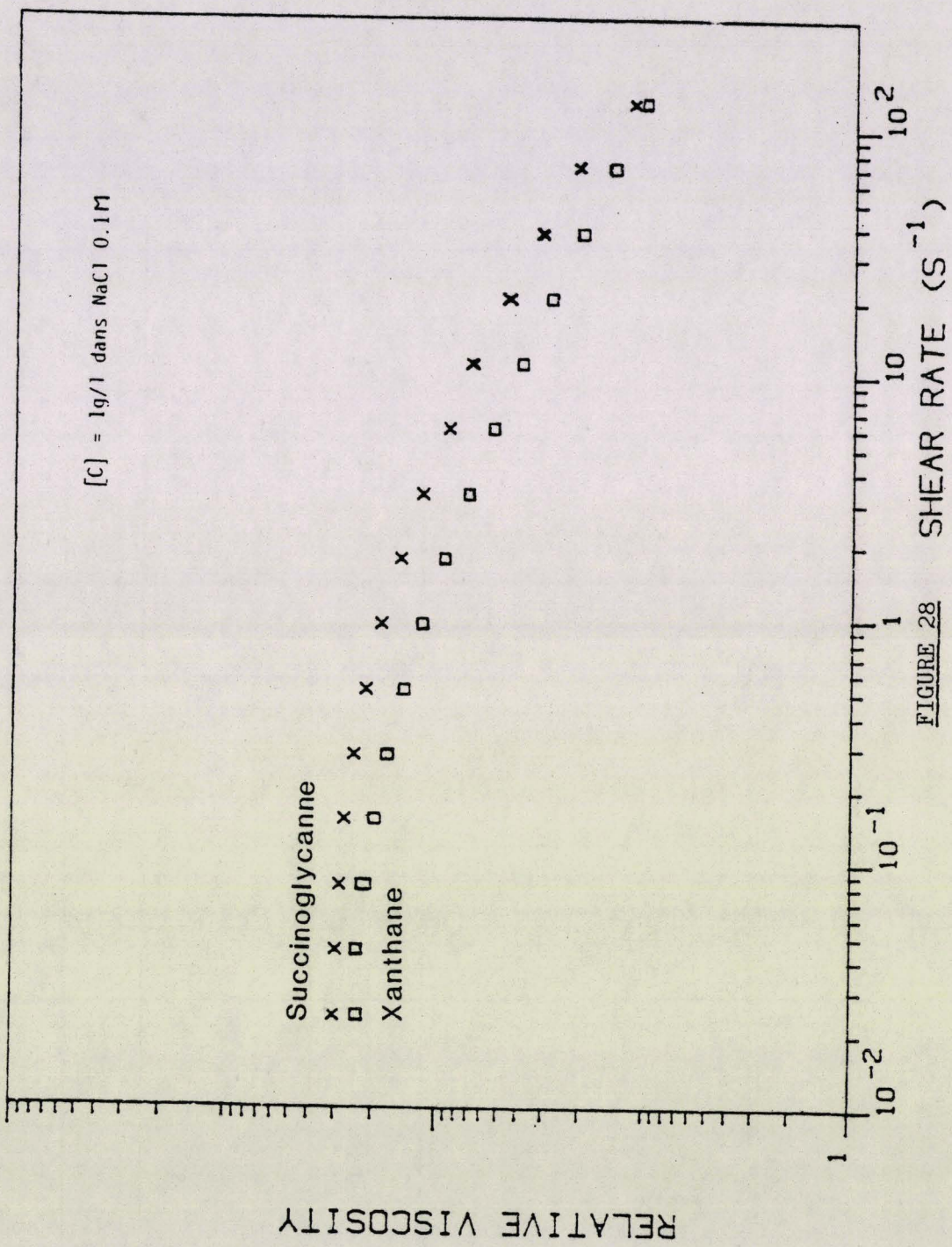


FIGURE 28 SHEAR RATE (S<sup>-1</sup>)

Valeurs des viscosités relatives obtenues en fonction du gradient de cisaillement, pour l'exopolysaccharide étudié et un xanthane.



B - INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE SUR LA VISCOSITE

Les mesures ont été réalisées sur des solutions à 1g/l dans l'eau, dans le chlorure de sodium 0,1M (5,8g/l) et 1,7M (100g/l) et dans le chlorure de calcium 0,3M (20g/l).

Nous donnons les valeurs de viscosités relatives pour un gradient de cisaillement  $\dot{\gamma} = 0,08 \text{ s}^{-1}$

TABLEAU XIV



Influence de la force ionique sur la viscosité relative du polysaccharide.

	H <sub>2</sub> O	NaCl 0,1M	NaCl 1,7M	CaCl <sub>2</sub> 0,3M
Succinoglycane	692,2	286,4	195	304,6
Xanthane (Rhodopol)	626	193,9	223,3	164,4

Nous constatons une diminution de la viscosité relative liée à l'addition d'un électrolyte. Le cation, quant à lui, ne semble pas jouer un rôle important.

C - INFLUENCE DU pH SUR LA VISCOSITE

Le tableau ci-dessous fournit les valeurs des viscosités relatives dans des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) et de soude (NaOH), pour un gradient de cisaillement  $\gamma = 0,08s^{-1}$ .

TABLEAU XV

Influence du pH sur la viscosité relative du polymère.



	HCl 0,5N	NaOH 0,09N	NaOH 0,54N
Succinoglycane	221,9	141,1	2,64
Xanthane (Rhodopol)	32	-	Gel

Nous pouvons constater que l'exopolysaccharide possède une certaine stabilité pour des valeurs de pH comprises entre 1 et 12.

D - STABILITE THERMIQUE DU BIOPOLYMERE

Une solution à 1g/l dans l'eau a été chauffée à 90°C. A intervalles réguliers ont été mesurées les viscosités relatives pour un gradient de cisaillement  $\gamma = 0,94 s^{-1}$

TABLEAU XVI

Influence de la température sur la viscosité relative du polysaccharide.

Temps	0	10min	24 h	48 h	96 h	162 h
Viscosité relative du succinoglycane à 90°C	321,84	25,67	6,91	2,99	3,63	2,13

Nous pouvons noter la très mauvaise stabilité du polymère. Il présente une température de transition conformationnelle, indiquant le passage de la forme "ordonnée" à la forme "désordonnée", aux alentours de 66°C. Un chauffage prolongé peut de plus s'accompagner d'une dégradation du polysaccharide : cette dégradation pourrait être due à la libération des substituants pyruvyle et succinyle.



E - CONCLUSION DES ETUDES RHEOLOGIQUES

Compte tenu des études réalisées à ce jour, nous pouvons conclure que ce nouveau biopolymère présente des propriétés de viscosité intéressantes. Cependant, sa stabilité thermique est faible puisqu'un simple chauffage à des températures voisines de 70°C entraîne une chute non négligeable de sa viscosité.

Cette dernière propriété limitera sans doute les champs d'applications de cet exopolymère qui présente cependant une bonne tenue en présence de sels ainsi qu'une bonne stabilité pour des pH compris entre 1 et 12.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons dégager de ces travaux sont les suivantes.

- Les protocoles simples de culture de la nouvelle souche de bactérie du sol et de préparation de l'exopolysaccharide permettent d'envisager sa production à grande échelle. Le rendement de production peut toutefois être amélioré par la connaissance des conditions optimales d'obtention de l'exopolymère et par la recherche de mutants bactériens hyperproducteurs.

- Les propriétés rhéologiques indiquent que le polysaccharide présente une viscosité équivalente à celle du xanthane. Cette viscosité n'est pas trop altérée par des variations de pH mais elle chute avec l'augmentation de la température. Ces premiers résultats, obtenus au Centre d'études et de recherches sur les macromolécules végétales de Grenoble, semblent indiquer que ce nouveau polymère pourrait trouver une application comme épaississant principalement pour les industries agro-alimentaires.

- Les compositions qualitatives et quantitatives indiquent que ce biopolymère ne contient pas de protéines ni d'acides uroniques. Il est constitué, pour 1 résidu de galactose, de 7 résidus de glucose, 1 résidu de pyruvate et 1 de succinate.

- Les résultats de l'étude structurale effectuée par des méthodes chimiques (perméthylation, oxydation périodique, acétolyse partielle) et spectroscopiques (résonance magnétique nucléaire à 400 MHz) indiquent :

que tous les monosaccharides sont conjugués par une liaison anomérique de type  $\beta$

que l'exopolysaccharide est constitué d'unités de répétition qui comportent une chaîne latérale tétrasaccharidique formée de 4 résidus de glucose. Cette

chaîne latérale est fixée sur l'hydroxyle du carbone 6 d'un résidu de glucose de la chaîne principale. Cette dernière est composée de 3 résidus de glucose pour 1 de galactose.

- Les études de localisation du résidu pyruvyle, réalisées par comparaison des résultats obtenus par perméthylation du polysaccharide natif et du polymère dépyruvaté, montrent sans ambiguïté sa conjugaison par liaison acétalique sur les hydroxyles des carbones 4 et 6 du résidu de glucose situé en position terminale non réductrice de la chaîne latérale.

- Les recherches de positionnement du résidu succinyle par vinylation suivie de méthylation n'ont pas abouti. Cet échec est dû à la haute viscosité du polysaccharide à la température de réaction (+15°C) qui empêche l'accessibilité du réactif aux hydroxyles du biopolymère. Nous orientons actuellement nos travaux par l'utilisation d'un autre réactif d'acétalation (le 2,4-dihydropyrane) qui permet de travailler à température ordinaire.

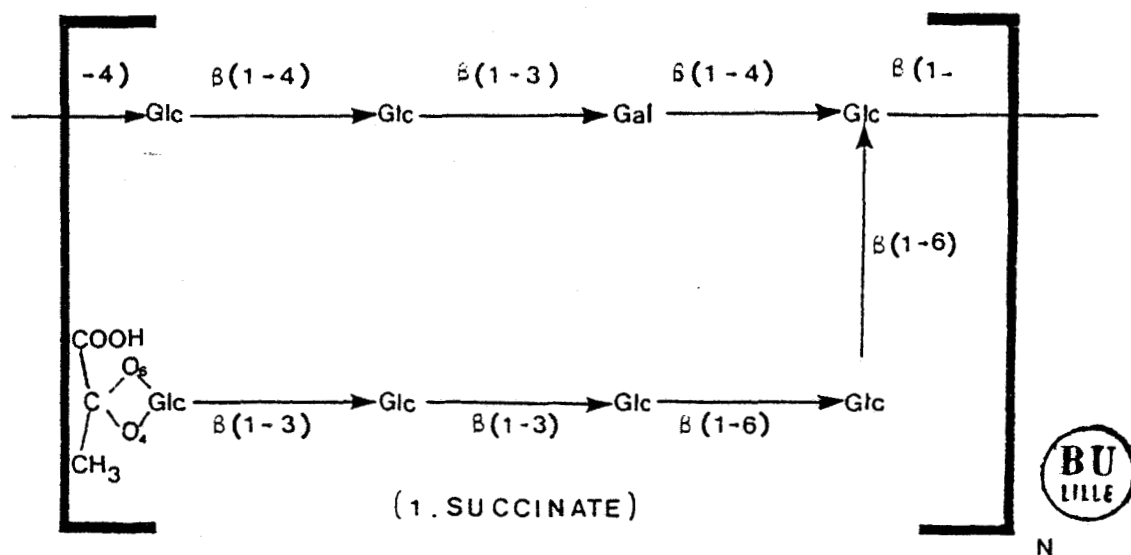
Il serait intéressant d'étudier les variations du comportement rhéologique de la solution polysaccharidique en fonction du degré de substitution par les résidus pyruvyle et succinyle afin de mieux cerner leurs rôles dans la conformation spatiale et donc dans les propriétés rhéologiques.

- Les hydrolyses enzymatiques à l'aide de glucosidases spécifiques (laminarinases) sur le polymère natif et dépyruvaté n'ont pas donné de résultats. Cette absence de libération de monosaccharides est à mettre à l'actif de la grande viscosité des solutions de polysaccharides et à la présence des substituants protecteurs de type pyruvate et succinate.

- Les résultats des études effectuées sur cet exopolymère permettent d'envisager une séquence primaire très voisine ou identique à celle décrite par JANSSON et al. (150) pour un exopolysaccharide excrété



par une souche de *Rhizobium meliloti*, la seule différence étant la nature du résidu O-acyle (acétyle pour le polymère décrit par JANSSON et al., succinyle pour notre polysaccharide). Par analogie, la séquence primaire de notre exopolysaccharide pourrait être la suivante.



- Les études menées sur ce biopolymère bactérien ont montré qu'il est difficile d'appliquer les méthodes physico-chimiques classiques lorsque le degré de viscosité des solutions d'exopolymères est important. Cette difficulté sera levée par l'isolement et l'utilisation d'endoglycosidases spécifiques comme celles contenues dans les bactériophages. L'emploi de ces enzymes, en annulant la viscosité et en augmentant la solubilité des oligosaccharides libérés, permettra d'obtenir des spectres de RMN interprétables fournissant des indications sur la localisation du résidu succinyle. D'autre part, il sera possible, sur ces oligomères isolés, d'utiliser des méthodes chimiques et enzymatiques spécifiques qui aboutiront à l'établissement définitif de la séquence primaire de l'exopolysaccharide.

- L'étude structurale que nous avons entreprise s'avère donc très importante car elle devrait permettre de mieux cerner les relations

existant entre la séquence primaire et la conformation de cet exopolysaccharide. Ces recherches nous conduiront donc à mieux comprendre les propriétés rhéologiques de ce polymère, en particulier sa haute viscosité.

BIBLIOGRAPHIE

	Références	Pages
ALBERSHEIM P., NEVINS D.J., ENGLISH P.D. et KARR A. Carbohydr. Res., 5 (1967) 340-345.	8	14
ALLERHAND A. Pure Appl. Chem., 41 (1975) 247-273.	62	32
AMAN P., Mc NEIL M., FRANZEN L.-E., DARVILL A.G. et ALBERSHEIM P. Carbohydr. Res., 95 (1981) 263-282.	58	30
ASPINALL G.O. The polysaccharides, edited by G.O. Aspinall, Academic Press, New York, 2 (1983) 1-9.	2	2,3,7
ATALLA R.H. et DIMICK B.E. Carbohydr. Res., 39 (1975) C1-C3.	120	51
BARKER S.A., BOURNE E.J. et WHIFFEN D.H. Methods Biochem. Anal., 3 (1956) 213.	117	51
BARNOUD F., GAGNAIRE D., ODIER L. et VINCENDON M. Biopolymers, 10 (1971) 2269-2273.	73	41
BARRETO-BERGTER E.M., TRAVASSOS L.R. et GORIN P.A.J. Carbohydr. Res., 86 (1980) 273-285.	99	43
BAYARD B. et MONTREUIL J. Carbohydr. Res., 24 (1972) 427-443.	148	106
BENDER H., LEHMANN J. et WALLENFELS K. Biochim. Biophys. Acta, 36 (1959) 309-316.	140	62
BERRY J.M., DUTTON G.G.S., HALL L.D. et MACKIE K.L. Carbohydr. Res., 53 (1977) C8-C10.	103	43
BEURRET M. Thèse Doct., U.S.M.G. (1984).	41	21,23,27,28 43,44,45
BJÖRNDAL H., LINDBERG B., PILOTTI Å. et SVENSSON S. Carbohydr. Res., 15 (1970) 339-349.	33	18,19
BLAKE J.D. et RICHARDS G.N. Carbohydr. Res., 14 (1970) 375-387.	6	14
BOBBITT M. Adv. Carbohydr. Chem., 11 (1956) 1.	39	21
BOCIEK S.M. et WELTI D. Carbohydr. Res., 42 (1975) 217-226.	111	51
BOURNE E.J., SIDEBOTHAM R.L. et WEIGEL H. Carbohydr. Res., 22 (1972) 13-22.	82	42
BRUVIER C. Thèse Doct. Sci., Lille (1983).	43	25,26

	Références	Pages
BUNDLE D.R., SMITH I.C.P. et JENNINGS H.J. J. Biol. Chem., 249 (1974) 2275-2281.	71	41
CADMUS M.C., ROGOVIN S.P., BURTON K.A., PITTSLEY J.E., KNUTSON C.A. et JEANES A. Can. J. Microbiol., 22 (1976) 942-948.	126	58
CAEL J.J., KOENIG J.L. et BLACKWELL J. Carbohydr. Res., 29 (1973) 123-134.	119	51
CASU B., SCOVENNA G., CIFONELLI A.J. et PERLIN A.S. Carbohydr. Res., 63 (1978) 13-27.	112	51
CHALK R.C., EVANS M.E., PARRISH F.W. et SOUSA J.A. Carbohydr. Res., 61 (1978) 549-552.	116	51
CHENG C.-C., WONG S.-L. et CHOY Y.-M. Carbohydr. Res., 73 (1979) 169-174.	105	43
CHOY Y.-M et DUTTON G.G.S. Can. J. Chem., 51 (1973) 3021-3026.	102	43
CHRISTIAEN D. Thèse Doct. 3ème cycle, Lille (1981).	122	51,52
COHEN G.H. et JOHNSTONE D.B. J. Bacteriol., 88 (1964) 329-338.	135	60
COLSON P., JENNINGS H.J. et SMITH I.C.P. J. Am. Soc., 96 (1974) 8081-8087.	78	42
COLTHUP N.B., DALY L.H. et WIBERLEY S.E. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Academic Press, New York (1964).	107	49
COURTOIS B. Thèse Doct. Sci., Lille (1984).	144	77,81
CURVALL M., LINDBERG B. et LÖNNGREN J. Carbohydr. Res., 41 (1975) 235-239.	36	20
DARVILL A.G., Mc NEIL M. et ALBERSHEIM P. Plant Physiol., 62 (1978) 418-422.	28	18
DE BELDER A.N. et NORRMAN B. Carbohydr. Res., 8 (1968) 1-6.	55	27,30,91
DE BRUYN A., ANTEUNIS M., DE GUSSEM R. et DUTTON G.G.S. Carbohydr. Res., 47 (1976) 158-163.	70	37

	Références	Pages
DE BRUYNE C.K. et WOUNTERS-LEYSEN J. Carbohydr. Res., 17 (1971) 45-56.	7	14
DELL A., MORRIS H.R., EGGE H., VON NICOLAI H. et STRECKER G. Carbohydr. Res., 115 (1983a) 41-52.	59	31
DELL A. et BALLOU C.E. Carbohydr. Res., 120 (1983) 95-111.	60	31
DELL A., DUTTON G.G.S., JANSSON P.-E., LINDBERG B., LINQUIST U. et SUTHERLAND I.W Carbohydr. Res., 122 (1983b) 340-343.	52	27
DIETRICH C.P., NADER H.B. et PERLIN A.S. Carbohydr. Res., 41 (1975) 334-338.	77	42
DISCHE Z. J. Biol. Chem., 167 (1947) 189.	143	71
DUCKWORTH M. et YAPHE W. Chem. Ind., London (1970) 747-748.	18	15
DUTTON G.G.S. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 28 (1973) 11-159.	13	14
DUTTON G.G.S., SAVAGE A.V. et VIGNON M. Can. J. Chem., 58 (1980) 2588-2591.	47	27
DUTTON G.G.S. et FOLKMAN T.E. Carbohydr. Res., 80 (1980) 147-161.	100	43
DUTTON G.G.S. et SAVAGE A.V. Carbohydr. Res., 83 (1980) 351-362.	104	43
DUTTON G.G.S., MACKIE K.L., SAVAGE A.V., RIEGER-HUG D. et STIRM S. Carbohydr. Res., 84 (1980) 161-170.	46	27,43
DUTTON G.G.S. et MERRIFIELD E.H. Carbohydr. Res., 103 (1982) 107-128.	51	27
DUTTON G.G.S. et KARUNARATN D.N. Carbohydr. Res., 138 (1985) 277-291.	53	27
FINNE J., KRUSIUS T. et RAUVALA H. Carbohydr. Res., 80 (1980) 336-339.	30	18
FOURNET B., STECKER G., LEROY Y. et MONTREUIL J. Anal. Biochem., 116 (1981) 489-502.	146	85
FRIEBOLIN H., FRANK N., KEILICH G. et SIEFERT E. Makromol. Chem., 177 (1976) 845-858.	85	42

	Références	Pages
GAGNAIRE D. et VIGNON M. Makromol. Chem., 178 (1977) 2321-2333.	80	42
GAGNAIRE D. et TARAVEL F.R. J. Am. Soc., 101 (1979) 1625-1626.	75	41
GERWIG G.J., KAMERLING J.P. et Vliegenthart J.F.G. Carbohydr. Res., 129 (1984) 149-157.	149	107
GOLDSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A. et SMITH F. Methods Carbohydr. Chem., 5 (1965) 361-370.	40	21,97
GORIN P.A.J. et SPENCER J.F.T. Can. J. Chem., 46 (1968) 2299-2310.	92	43
GORIN P.A.J., SPENCER J.F.T. et BHATTACHARJEE S.S. Can. J. Chem., 47 (1969) 1499-1505.	93	43
GORIN P.A.J., SPENCER J.F.T. et MAGUS R.J. Can. J. Chem., 47 (1969) 3569-3576.	94	43
GORIN P.A.J. Can. J. Chem. 51 (1973) 2105-2109.	95	43
GORIN P.A.J. Carbohydr. Res., 39 (1975) 3-10.	74	41
GORIN P.A.J., HASKINS R.H., TRAVASSOS L.R. et MENDONCA-PREVIATO L. Carbohydr. Res., 55 (1977) 21-33.	96	43
GORIN P.A.J., MENDONCA-PREVIATO L., PREVIATO J.P. et TRAVASSOS L.R. J. Protozool., 26 (1979) 473-483.	98	43
GOULDEN J.D.S. et SCOTT J.E. Nature, 220 (1968) 698-699.	110	51
HAKOMORI S.I. J. Biochem., 55 (1964) 205-208.	26	17
HALL L.D. Adv. Carbohydr. Chem., 19 (1964) 51-93.	63	32
HAMILTON J.K., PARTLOW E.V. et THOMPSON N.S. Tappi, 41 (1958) 804.	15	15
HARADA T. Extracellular microbial polysaccharides, edited by P.A. Sandford and A. Laskins, A.C.S. Symp. Ser., 45 (1977) 265-283.	131	59
HARRIS M.J. et TURVEY J.R. Carbohydr. Res., 15 (1970) 51-56.	115	51
HAUG A., LARSEN B. et SMIDSRØD O. Carbohydr. Res., 32 (1974) 217-225	133	60

	Références	Pages
HAWORTH W.N. J. Chem. Soc., 107 (1915) 8.	21	17
HERWATS L., LASZLO P. et GENARD P. Nouv. J. Chim., 1 (1977) 173-176.	72	41
HOFFMAN J., LINDBERG B. et SVENSSON S. Acta Chem. Scand., 26 (1972) 661-666.	42	25
HOUGH L., JONES J.V.S. et WUSTEMAN P. Carbohydr. Res., 21 (1972) 9-17.	12	14
JANSSON R-E., KENNE L. et LINDBERG B. Carbohydr. Res., 45 (1975) 275-282.	125	58
JANSSON R-E., KENNE L., LINDBERG B., LJUNGGREN H., LONNGREN J. RUDEN U. et SVENSSON S. J. Am. Chem. Soc., 99 (1977) 3812-3815.	150	126
JEANES A., HAYNES W.C., WILHAM C.A., RANKIN J.C., MELVIN E.H., AUSTIN M.J., CLUSKEY J.E., FISHER B.E., TSUCHIYA H.M. et RIST C.E. J. Am. Chem. Soc., 76 (1954) 5041-5052.	128	58
JOHNSON J., KIRKWOOD S., MISAKI A., NELSON T.E., SCARLETTI J.V. et SMITH F. Chemistry and Industry, 41 (1963) 820-822.	139	62
JONES R.N. et SANDORFY C. Chemical applications of Spectroscopy, edited by W. West, Wiley (Interscience), New York, (1956) 271-290.	108	49
JOSELEAU J.-P., LAPEYRE M., VIGNON M. et DUTTON G.G.S. Carbohydr. Res., 67 (1978) 197-212.	101	43
KANG K.S., VEEDER G.T. et RICHEY D.D. Extracellular microbial polysaccharides, edited by P.A. Sandford and A. Laskins, A.C.S. Symp. Ser., 45 (1977) 211-219.	138	61
KANG K.S. et Mc NEELY W.H. Extracellular microbial polysaccharides, edited by P.A. Sandford and A. Laskins, A.C.S. Symp. Ser., 45 (1977) 220-230.	137	61
KARPLUS M. J. Chem. Phys., 30 (1959) 11.	68	35
KENNE L. et LINDBERG B. The polysaccharides, edited by G.O. Aspinall, Academic Press, New York, 2 (1983) 287-363.	4	8,9,12
KENNEDY J.F. Proteoglycans. Biological and chemical aspects in Human Life, Elsevier, Amsterdam, (1979) 112-113.	19	15



	Références	Pages
KENNEDY J.F. et WESTMAN D.A. Anal. Chim. Acta, 55 (1971) 448-449.	20	15
KISS J. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 29 (1974) 229-303.	35	20
KOTOWYCZ G. et LEMIEUX R.U. Chem. Rev., 73 (1973) 669-698.	64	32
KUHN R., TRISCHMANN H. et LOW I. Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 67 (1955) 32.	23	17
KUHN R. et EGGE H. Chem. Ber., 96 (1963) 3338-3348.	25	17
LAPEYRE M. Thèse Doct. 3ème cycle, U.S.M.G. (1977).	37	21,22
LAWSON C.J. et SUTHERLAND I.W. Polysaccharides in economic microbiology, edited by A.H. Rose, Academic Press, 2 (1978) 337-392.	129	59
LEVY G.A., HAY A.J., CONCHIE J. et STRACHAN I. Biochim. Biophys. Acta, 222 (1970) 333.	11	14
LEW J.Y. et HEIDELBERGER M. Carbohydr. Res., 52 (1976) 255-258.	57	30,88
LINDBERG B. Methods in enzymology, edited by V. Ginsburg, Academic Press, New York, 28 part B (1973) 178-195.	27	17
LINKER A. et JONES R.S. J. Biol. Chem., 241 (1966) 3845-3851.	134	60
LLOYD A.G., DODGSON K.S., PRICE R.G. et ROSE F.A. Biochim. Biophys. Acta, 46 (1961) 108-115.	114	51
LONDON R.E., KOLLMAN V.H. et MATWIYOFF N.A. Biochemistry, 14 (1975) 5492-5500.	76	41
..		
LONNGREN J. et SVENSSON S. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 29 (1974) 41-106.	32	18 -
LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. J. Biol. Chem., 193 (1951) 265-273.	142	68
..		
LÜDERITZ O., JANN K. et WHEAT R. Comprehensive Biochemistry, 26 part A (1968) 105-228.	1	1
MALAPRADE L. Comptes Rendus, 186 (1928) 382.	38	21
MARSHALL A.G., MARCUS T. et SALLOS J. J. Magn. Reson., 35 (1979) 227-230.	67	33

	Références	Pages
MENDONCA-PREVIATO L., GORIN P.A.J. et PREVIATO J.O. Biochemistry, 18 (1979) 149-154.	97	43
MILAS M. et RINAUDO M. Carbohydr. Res., 76 (1979) 189-196.	145	81
MORRIS E.R., REES D.A., YOUNG G., WALKINSHAW M.C. et DARKE A. J. Mol. Biol. 1 (1977) 110.	127	58,81
NAKANISHI I., KIMURA K., KUSUI S. et YAMAZAKI E. Carbohydr. Res., 32 (1974) 47-52.	132	60
NEVINS D.J., ENGLISH P.D. et ALBERSHEIM P. Plant Physiol., 42 (1962) 900.	9	14
NIEMANN H., BEILHARZ H. et STIRM S. Carbohydr. Res., 60 (1978) 353-366.	44	25
OKUTANI K. et DUTTON G.G.S. Carbohydr. Res., 86 (1980) 259-271.	106	43
ORR S.F.D. Biochim. Biophys. Acta, 14 (1954) 173-181.	113	51
PASIKA W.M. et CRAGG L.H. Can. J. Chem., 41 (1963) 777-782.	79	42
PAZ PARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B. et RICART G. Carbohydr. Res., 141 (1985) 41-47.	31	18,31,83
PECINA R., BONN G., BURTSCHER E. et BOBLETER O. J. Chromatogr., 287 (1984) 245-258.	14	15
PENMAN A. et SANDERSON G.R. Carbohydr. Res., 25 (1972) 273-282.	136	60
PERCIVAL E. Methods Carbohydr.Chem., 8 (1980) 281-285.	56	29
PERLIN A.S. MTP Int. Rev. Sci. : Org.Chem., Ser.Two, 7 (1976)1-34.	65	32
PERLIN A.S. et CASU B. The polysaccharides, edited by G.O. Aspinall, Academic Press, New York, 1 (1982) 133-193.	69	35,36,49,50
PHILLIPS L.R. et FRASER B.A. Carbohydr. Res., 90 (1981) 149-152.	29	18
PURDIE T. et IRVINE J.C. J. Chem. Soc., 83 (1903) 1021-1037.	22	17
RIEGER-HUG D. et STIRM S. Virology, 113 (1981) 363-378.	54	27

	Références	Pages
ROUDIER A.J. et EBERHARD L. Bull. Soc. Chim. Fr., (1960) 2074.	16	15
ROY N., CARROLL W.R. et GLAUDEMANS C.P.J. Carbohydr. Res., 12 (1970) 83-96.	10	14
SANDFORD P.A. et BAIRD J. The polysaccharides, edited by G.O. Aspinall, Academic Press, New York, 2 (1983) 411-490.	123	54,55
SEAMAN J.S., MOORE W.E., MITCHELL R.L. et MILLETT M.A. Tappi, 37 (1954) 336.	5	14,24
SEYMOUR F.R., KNAPP R.D. et BISHOP S.H. Carbohydr. Res., 51 (1976) 179-194.	86	42
SEYMOUR F.R. A.C.S. Symp. Ser., 103 (1979) 27-51.	91	42,43
SEYMOUR F.R., KNAPP R.D., BISHOP S.H. et JEANES A. Carbohydr. Res., 68 (1979) 123-140.	87	42
SEYMOUR F.R., KNAPP R.D., CHEN E.C.M., JEANES A. et BISHOP S.H. Carbohydr. Res., 71 (1979) 231-250.	88	42,43
SEYMOUR F.R., KNAPP R.D., CHEN E.C.M., BISHOP S.H. et JEANES A. Carbohydr. Res., 74 (1979) 41-62.	89	42,43
SEYMOUR F.R., KNAPP R.D. et BISHOP S.H. Carbohydr. Res., 74 (1979) 77-92.	84	42
SEYMOUR F.R. et KNAPP R.D. Carbohydr. Res., 81 (1980) 67-103.	90	42
SHE C.Y., DINH N.D. et TU A.T. Biochim. Biophys. Acta, 372 (1974) 345-357.	118	51
SHERWOOD R.F., BAIRD J.K., ATKINSON T., WIBLIN C.N., RUTTER D.A. et ELLWOOD D.C. Biochem. J., 164 (1977) 461-464.	130	59
SIDEBOTHAM R.L., WEIGEL H. et BOWEN W.H. Carbohydr. Res., 19 (1971) 151-159.	81	42
STACEY M. et BARKER S.A. Polysaccharides of micro-organisms, Oxford Univ. Press, London and New York, (1960).	3	8
SUTHERLAND I.W. et WILKINSON J.F. J. Gen. Microbiol., 39 (1965) 373-383.	45	27
SUTHERLAND I.W. Biochem. J., 104 (1967) 278-285.	48	27

	Références	Pages
SUTHERLAND I.W. Nature, 228 (1970) 280.	49	27
SUTHERLAND I.W. J. Gen. Microbiol., 70 (1971) 331-338.	50	27
SYKES B.D. et PATT S.L. J. Chem. Phys., 56 (1972) 3182-3184.	66	33
TAYLOR R.L. et CONRAD H.E. Biochemistry, 11 (1972) 1383-1388.	17	15,16,75
USUI T., YOKOYAMA M., YAMAOKA N., MATSUDA K., TUZIMURA K., SUGIYAMA H. et SETO S. Carbohydr. Res., 33 (1974) 105-116.	83	42
VALENT B.S., DARVILL A.G., Mc NEIL M., ROBERTSEN B.K. et ALBERSHEIM P. Carbohydr. Res., 79 (1980) 165-192.	34	19
VASKO P.D., BLACKWELL J. et KOENIG J.L. Carbohydr. Res., 19 (1971) 297-310.	121	51
VASKO P.D., BLACKWELL J. et KOENIG J.L. Carbohydr. Res., 23 (1972) 407-416.	109	49
WAEGHE T.J., DARVILL A.G., Mc NEIL M. et ALBERSHEIM P. Carbohydr. Res., 123 (1983) 281-304.	61	31
WALLENFELS K., BECHTLER G., KUHN R., TRISCHMANN H. et EGGE H. Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 2 (1963) 515-523.	24	17
YIN E.T., GALANOS C., KINSKY S., BRADSHAW R.A., WESSLER S., LÜDERITZ O. et SARMIENTO M.E. Biochim. Biophys. Acta, 261 (1972) 284-289.	124	54
YUEN S. Process Biochem., 9 (1974) 7-9, 22.	141	62
ZANETTA J.P., BRENKENRIDGE W.C. et VINCENDON G. J. Chromatogr., 69 (1972) 291-304.	147	99

