

N° d'ordre 627

50376
1990
317

50376
1990
317

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

pour obtenir le titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité : BIOCHIMIE

par

FRANCK TALMONT



**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DU MILIEU HYDROTHERMAL
PROFOND :**

- 1- ETUDE DE TUBES D'ANNELIDES ET DE
VESTIMENTIFERES.

- 2- ETUDE STRUCTURALE D'UN EXOPOLYSACCHARIDE
SECRETE PAR UNE BACTERIE MARINE.



030385 9

Soutenu le 4 Décembre 1990 devant la Commission d'examen :

Président : Jean MONTREUIL
Rapporteurs : Françoise GAILL
Gérard STRECKER
Examineurs : Georges BARBIER
Gérard CUVELIER
Bernard FOURNET
Daniel PRIEUR

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur Bernard FOURNET , dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité mixte du CNRS N°111 : Relations structure-fonction des constituants membranaires. Directeur : Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL). Il a bénéficié d'une aide de l'Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer (IFREMER) et du Conseil Régional de Bretagne.

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

1. Publications :

TALMONT F., and FOURNET B., 1990

Chemical composition of mucins from deep sea hydrothermal vent tubicolous annelid worms.

Comp. Biochem. Physiol. 96B, 753-759.

TALMONT F., and FOURNET B.

Isolation and characterization of methylated sugars from the tube of the hydrothermal vent tubicolous annelid worm *Alvinella pompejana*.

Soumis à FEBS Letters.

TALMONT F., VINCENT P., FONTAINE T., GUEZENNEC J., PRIEUR D., and FOURNET B.

Structural investigation of an acidic exopolysaccharide from a deep sea hydrothermal vent marine bacteria.

Accepté à Food hydrocolloids.

2. Communications

TALMONT Franck, 1988

Composition glucidique du tube muqueux de l'annélide polychète *Paralvinella*.

Colloque national sur l'hydrothermalisme océanique, Brest 22-24 novembre 1988, France.

PRIEUR D., JEANTHON C., VINCENT P., TALMONT F., and GUEZENNEC J., 1990.

Biotechnological potentials of deep sea hydrothermal vent microorganisms : heavy metal accumulation and production of exopolysaccharides.

Proceedings of the First International Marine Biotechnology Conference, Tokyo september 3-6 1990, Japan.

TALMONT F., VINCENT P., GUEZENNEC J., PRIEUR D., and FOURNET B., 1990.

Etude d'un exopolysaccharide excrété par une bactérie marine du milieu hydrothermal profond.

XIII^{èmes} journées de la chimie et de la biochimie des glucides. First mediterranean conference on carbohydrates, 21-23 mai 1990, Avignon, France.

TALMONT F., VINCENT P., GUEZENNEC J., PRIEUR D., and FOURNET B., 1990.

Etude d'un exopolysaccharide excrété par une bactérie marine du milieu hydrothermal profond.

XVII^e forum des jeunes chercheurs, biochimie et biologie moléculaire, 3-6 juillet 1990, Lille, France.

TALMONT F., VINCENT P., GUEZENNEC J., PRIEUR D., and FOURNET B., 1990.

Structural investigation of an acidic exopolysaccharide from a deep sea hydrothermal vent marine bacteria.

3rd International workshop on plant polysaccharides, 19-21 septembre 1990, Le Croisic, France.

AYMARD P., CUVELIER G., LAUNAY B., GUEZENNEC J., BARBIER G.,
TALMONT F., and FOURNET B., 1990.

Propriétés rhéologiques de nouveaux polysaccharides bactériens
d'origine marine.

3rd International workshop on plant polysaccharides, 19-21
septembre 1990, Le Croisic, France.

VINCENT P., TALMONT F., PRIEUR D., FOURNET B., GUEZENNEC J., and
PIGNET P., 1990.

Production and characterization of polysaccharides synthetised
by deep-sea hydrothermal vent bacteria.

4 th European Marine Microbiology Symposium, 8-12 october 1990,
Kiel, RFA.

Abréviations

| | |
|---------------|---|
| KBr | : bromure de potassium |
| MHDP | : méta hydroxy diphényle |
| CPG | : chromatographie en phase gazeuse |
| DI | : diamètre intérieur |
| DMSO | : diméthyl-sulfoxyde |
| ATFA | : acide trifluoroacétique |
| SM | : spectrométrie de masse |
| FAB | : fast atom bombardement (bombardement à atomes rapides) |
| CLHP | : chromatographie liquide haute performance |
| SFC | : supercritical fluid chromatography (chromatographie en phase supercritique) |
| SFC-CI-MS | : supercritical fluid chromatography-chemical ionization-mass spectrometry (couplage chromatographie en phase supercritique-spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique) |
| SFC-FID | : supercritical fluid chromatography-flamm ionization detector (chromatographie en phase supercritique, détection par ionisation de flamme) |
| FAB-CID-MS-MS | : fast atom bombardement-collision induced decomposition-mass spectrometry-mass spectrometry (bombardement à atomes rapides-collision-spectrométrie de masse en tandem) |
| Tris/HCl | : tris-(hydroxyméthyl)-amino méthane/acide chlorhydrique |
| DEAE | : diéthyl-amino-éthyl |
| MeOH/HCl | : méthanol chlorhydrique |

| | |
|--------------------|---|
| CPG-SM | : couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse |
| IE (EI) | : impact électronique (electronic impact) |
| IC (CI) | : ionisation chimique (chemical ionization) |
| Gal | : galactose |
| Glc | : glucose |
| Man | : mannose |
| Rham | : rhamnose |
| Fuc | : fucose |
| GlcUA | : acide glucuronique |
| GalUA | : acide galacturonique |
| GlcNAc | : N-acétyl-glucosamine |
| GlcNH ₂ | : glucosamine |
| GalX | : 4,6-O-(1-carboxyéthylidène)-galactose . |
| 6-d-h | : 6-désoxy-hexose |
| KDO | : acide 2-céto-3-désoxy-octulosonique |
| Pyr | : acide pyruvique |
| Ac | : acétate |
| P | : polysaccharide |
| Hex | : hexose neutre |
| HexUA | : acide hexuronique |

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 7 |
| INTRODUCTION | 11 |
| GENERALITES | 16 |
| I. LE MILIEU HYDROTHERMAL | 16 |
| 1. Découverte | 16 |
| 2. Situation géographique | 17 |
| 3. L'écosystème hydrothermal | 17 |
| 3.1. Caractéristiques physico-chimiques | 17 |
| a. Géochimie | 17 |
| b. Pression | 23 |
| c. Température | 23 |
| 3.2. Microfaune associée | 24 |
| a. Introduction | 24 |
| b. Biomasse bactérienne | 24 |
| c. Caractéristiques métaboliques des bactéries hydrothermales | 25 |
| d. Les bactéries thermophiles | 27 |
| 3.3. Macrofaune associée | 29 |
| a. Description des peuplements | 29 |
| b. <i>Riftia pachyptila</i> et <i>Tevnia jerochonana</i> | 33 |
| c. <i>Alvinella pompejana</i> et <i>Paralvinella</i> | 35 |

| | |
|---|-----------|
| II. LES POLYSACCHARIDES DE BACTERIES MARINES | 37 |
| 1. Introduction | 37 |
| 2. Polysaccharides et mécanisme d'adhésion des bactéries marines | 38 |
| 2.1. Généralités | 38 |
| 2.2. Mécanisme | 38 |
| a. Adhésion non spécifique | 38 |
| b. Adhésion spécifique | 39 |
| 2.3. Mise en évidence des polysaccharides intervenant dans l'adhésion | 40 |
| a. Mise en évidence par microscopie électronique | 40 |
| b. Mise en évidence par analyse chimique | 42 |
| 3. Propriétés de quelques polysaccharides de bactéries marines | 44 |
| 3.1. Propriétés rhéologiques | 45 |
| 3.2. Propriétés antitumorales | 46 |

| | |
|---|-----------|
| TRAVAUX PERSONNELS | 48 |
| I. ETUDE DES CONSTITUANTS DES TUBES ET MUCUS EXCRETES PAR DES VERS VESTIMENTIFERES ET ANNELIDES DU MILIEU HYDROTHERMAL PROFOND | 48 |
| 1. Composition centésimale | 48 |
| 1.1. Introduction | 48 |
| 1.2. Article 1 : Chemical composition of mucins from deep sea hydrothermal vent tubicolous annelid worms. | 49 |
| 1.3. Conclusion | 57 |
| 2. Isolement et caractérisation de monosaccharides méthylés extraits du tube d' <i>Alvinella pompejana</i> | 59 |
| 2.1. Introduction | 59 |
| 2.2. Article 2 : Isolation and characterization of methylated sugars from the tube of the hydrothermal vent tubicolous annelid worm <i>Alvinella pompejana</i> | 61 |
| 2.3. Conclusion : Les O-méthyl-glycosides dans la nature | 78 |
| II. ETUDE D'UN POLYSACCHARIDE EXCRETE PAR UNE BACTERIE ISOLEE DU MILIEU HYDROTHERMAL PROFOND | 85 |
| A. INTRODUCTION | 85 |
| B. MATERIEL ET METHODES | 85 |
| 1. Matériel biologique | 85 |
| 2. Culture des bactéries | 86 |
| 3. Isolement du polysaccharide | 87 |

| | |
|--|----|
| 4. Purification du polysaccharide | 87 |
| 4.1. Chromatographie d'échange d'ions | 87 |
| 4.2. Chromatographie de gel filtration | 90 |
| 5. Caractérisation du polysaccharide | 90 |
| 5.1. Electrophorèse en gel d'agarose | 90 |
| 5.2. Détermination du poids moléculaire | 91 |
| 5.3. Analyse par spectroscopie Infra-Rouge | 91 |
| 5.4. Pouvoir optique rotatoire | 92 |
| 5.5. Dosages colorimétriques | 92 |
| a. Recherche des protéines selon la méthode de Lowry <u>et al.</u> (1951) | 92 |
| b. Recherche des oses neutres selon la méthode à l'orcinol sulfurique de Tillmans et Philippi (1929) modifiée par Rimington (1931) | 93 |
| c. Recherche des acides uroniques | 94 |
| - Méthode de Dische (1947) | 94 |
| - Méthode de Blumenkrantz et Asboe-Ansen (1973) | 96 |
| d. Recherche des osamines par la méthode modifiée de Elson et Morgan (1933) | 96 |
| 5.6. Recherche des lipides | 98 |
| 5.7. Recherche chromatographique des substituants de type acétate, pyruvate, succinate, et des acides uroniques | 98 |
| a. Chromatographie sur colonne d'exclusion d'ions | 98 |
| b. Chromatographie en phase gazeuse des acides organiques | 99 |
| 5.8. Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse | 99 |
| a. Identification et dosage des monosaccharides sous forme de méthylglycosides triméthylsilylés | 99 |

| | |
|---|-----|
| b. Identification et dosage des monosaccharides sous forme d'acétates d'alditols | 100 |
| * Hydrolyse trifluoroacétique | 100 |
| * Hydrolyse sulfurique (Saeman et al., 1954) | 101 |
| * Identification et dosage des acides uroniques après réduction de la fonction acide carboxylique en fonction alcool (Dutton, 1986) | 101 |
| 6. Analyse structurale du polysaccharide | 102 |
| 6.1. Méthylation | 102 |
| 6.2. Réduction des acides uroniques par le carbodiimide | 103 |
| 6.3. Réduction du polysaccharide perméthylé par le borohydrure de lithium | 105 |
| 6.4. Dégradation du polysaccharide par le lithium dans l'éthylène diamine | 105 |
| a. Méthode | 105 |
| b. Séparation des oligosaccharides résistants à la dégradation au lithium | 106 |
| c. Etude structurale des oligosaccharides | 107 |
| 6.5. Hydrolyse partielle | 107 |
| a. Hydrolyse | 107 |
| b. Chromatographie d'échange d'ions | 108 |
| 6.6. Spectrométrie de masse | 108 |
| a. Couplage CPG-SM | 108 |
| b. Spectrométrie de masse en mode d'ionisation FAB | 109 |
| c. Spectrométrie de masse en tandem | 109 |
| 6.7. Chromatographie en phase supercritique (SFC) | 110 |
| a. SFC-FID | 112 |
| b. SFC-CI-MS | 112 |

| | |
|--|------------|
| C. RESULTATS | 114 |
| 1. Culture des bactéries et isolement du polysaccharide | 114 |
| 2. Etude de la fraction brute | 114 |
| 2.1. Dosages centésimaux | 114 |
| 2.2. Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse. | 117 |
| 3. Purification du polysaccharide | 119 |
| 3.1. Chromatographie d'échange d'ions sur colonne de gel de DEAE Trisacryl | 119 |
| 3.2. Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose 4B | 121 |
| 4. Caractérisation du polysaccharide purifié | 122 |
| 4.1. Electrophorèse en gel d'agarose | 122 |
| 4.2. Détermination du poids moléculaire | 125 |
| 4.3. Analyse par spectroscopie Infra-Rouge | 125 |
| 4.4. Pouvoir optique rotatoire | 128 |
| 5. Composition qualitative et quantitative du polysaccharide purifié | 128 |
| 5.1. Dosages centésimaux | 128 |
| 5.2. Recherche chromatographique des substituants de nature non glucidique et des acides uroniques | 128 |
| a. Chromatographie sur colonne d'exclusion d'ions | 128 |
| b. Chromatographie en phase gazeuse des acides organiques | 130 |
| 5.3. Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse | 130 |
| a. Après méthanolyse et triméthylsilylation | 130 |

| | |
|---|-----|
| b. Après hydrolyse, réduction et peracétylation | 133 |
| c. Après réduction des acides uroniques | 136 |
| * Réduction des acides uroniques au carbodiimide | 136 |
| * Réduction des acides uroniques selon <u>Dutton et al.</u> | 136 |
| (1986) | |
| 5.4. Conclusions | 137 |
| 6. Analyse structurale du polysaccharide | 137 |
| 6.1. Méthylation | 137 |
| a. Méthylation du polysaccharide natif | 137 |
| b. Méthylation du polysaccharide natif réduit au carbodiimide | 138 |
| c. Analyse du polysaccharide perméthylé après réduction par le borohydrure de lithium | 140 |
| d. Conclusions | 141 |
| 6.2. Dégradation du polysaccharide natif par le lithium métal dans l'éthylène diamine | 142 |
| a. Rendement | 142 |
| b. Fractionnement de la fraction résistante à la dégradation par le lithium dans l'éthylène diamine | 142 |
| c. Etude structurale de la fraction Li VI | 145 |
| * Analyse par spectrométrie de masse en mode FAB positif et par couplage CPG-SM en mode ionisation chimique | 145 |
| * Analyse par couplage CPG-SM en mode impact électronique | 145 |
| d. Conclusion | 150 |
| 6.3. Hydrolyse partielle | 150 |
| a. Cinétique d'hydrolyse | 150 |

| | |
|---|---------|
| b. Etude de l'hydrolysate partiel par spectrométrie de masse en mode FAB négative (produit natif), en mode FAB positive (produit perméthylé) et en mode MS-MS | 152 |
| * Analyse en FAB négative | 152 |
| * Analyse en FAB positive | 154 |
| * Analyse en mode MS-MS | 156 |
| - Fragmentation des oligosaccharides | 156 |
| - Fragmentation des liaisons glycosidiques | 158 |
| - Fragmentation du cycle des monosaccharides | 158 |
| - Etude de la fragmentation des oligosaccharides de l'hydrolysate partiel par collision | 160 |
| . Collision du trisaccharide | 161 |
| . Collision des tétra et pentasaccharides | 161 |
| c. Etude de l'hydrolysate partiel par chromatographie en phase supercritique | 166 |
| * SFC-FID | 167 |
| * SFC-CI-MS | 167 |
| d. Conclusions | 170 |
| 7. Conclusions | 171 |
| CONCLUSION GENERALE | 174 |
| BIBLIOGRAPHIE | 177 |

INTRODUCTION

L'écosystème qui se développe à proximité des sources hydrothermales profondes possède des caractéristiques qui en font un milieu totalement original. En effet, la profondeur (2600 m environ), la pression (260 atm), la présence de métaux lourds, ainsi que la température (qui peut atteindre 350°C), n'en font pas a priori un milieu propice au développement de la vie. Pourtant, le milieu est colonisé par une communauté animale extrêmement dense.

Actuellement, l'accessibilité aux sites d'hydrothermalisme est limitée par le nombre de sous-marins capables de les atteindre. L'Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer (IFREMER), avec l'aide du sous-marin *Nautilus*, mène des programmes scientifiques d'étude du milieu hydrothermal.

Notre thèse s'inscrit dans le cadre de ces programmes, et nos recherches se sont développées dans deux directions. Le premier thème abordé est fondamental, et concerne la caractérisation biochimique des tubes et mucus de vers vestimentifères et annélides qui se développent dans le milieu hydrothermal. Le deuxième thème est plus appliqué et concerne l'étude structurale d'un exopolysaccharide excrété par une bactérie du milieu hydrothermal profond.

GENERALITES

I. LE MILIEU HYDROTHERMAL

1. Découverte.

L'existence d'un écosystème à forte densité de population et riche en espèces nouvelles qui se développent à proximité des sources hydrothermales d'eau profonde, reste, à ce jour, l'une des découvertes scientifiques les plus importantes.

Les sources chaudes du fond des océans s'avèrent être communes le long des dorsales sous-marines, là où surgit la nouvelle croûte océanique qui repousse de part et d'autre de vastes zones de la surface terrestre. En fait, la théorie de la tectonique des plaques avait permis à **Elder** d'en prédire l'existence en 1965.

En pratique, des équipes de géologues travaillant au niveau de la faille des Galapagos ont mis en évidence, au cours des années 1970, des anomalies de température au dessus des axes de propagation de la faille océanique, anomalies attribuées aux panaches d'eau chaude émis par les sources hydrothermales (**Williams et al.**, 1974 ; **Klittgord et Mudie**, 1974). Des photographies prises lors de l'expédition des Pléiades (**Lonsdale**, 1977) avaient révélé la présence, près des sources chaudes, de peuplements particuliers (gros coquillages de couleur blanchâtre). Enfin, également en 1977, une équipe américaine dotée du sous-marin *Alvin* effectua une série de plongées sur la crête des Galapagos par 86° Ouest au niveau de l'équateur (**Corliss et al.**, 1979). Ces plongées devaient permettre de faire des observations directes de la zone hydrothermale, des mesures physiques ainsi que des échantillonnages de fluide et de sédiments. Au cours de ce travail, les géologues eurent la surprise de découvrir à proximité des sources chaudes une communauté

animale constituée d'organismes de tailles et de morphologies étonnantes.

Cette découverte amena une série de travaux sur les peuplements hydrothermaux que nous allons détailler.

2. Situation géographique.

Deux régions de l'océan mondial sont connues pour donner naissance à des phénomènes d'hydrothermalisme. La première est localisée dans le Pacifique Oriental (Fig. 1, p. 18) et a été explorée par plusieurs équipes américaines (Corliss et al., 1979 ; Grassle et al., 1979), françaises (Desbruyères et al., 1982 a) et canadiennes (Tunnicliffe et al., 1985). Ces différents sites sont les suivants : du large de Vancouver jusqu'au large de Lima : la faille de Juan de Fuca, le bassin des Guyamas dans le golfe de Californie, les sites 13° Nord et 21° Nord, le site des Galapagos. Ces différents sites ont la caractéristique commune d'être peuplés par des communautés animales dépendantes des sources hydrothermales actives. La seconde localisation géographique se situe au niveau de la faille de l'Atlantique Médian (26° 08' Nord) et a été peu étudiée jusqu'à présent (Rona et al., 1986).

3. L'écosystème hydrothermal.

3.1. Caractéristiques physico-chimiques.

a. Géochimie.

L'activité hydrothermale est une conséquence directe de la formation des nouvelles croûtes océaniques. Là où deux plaques

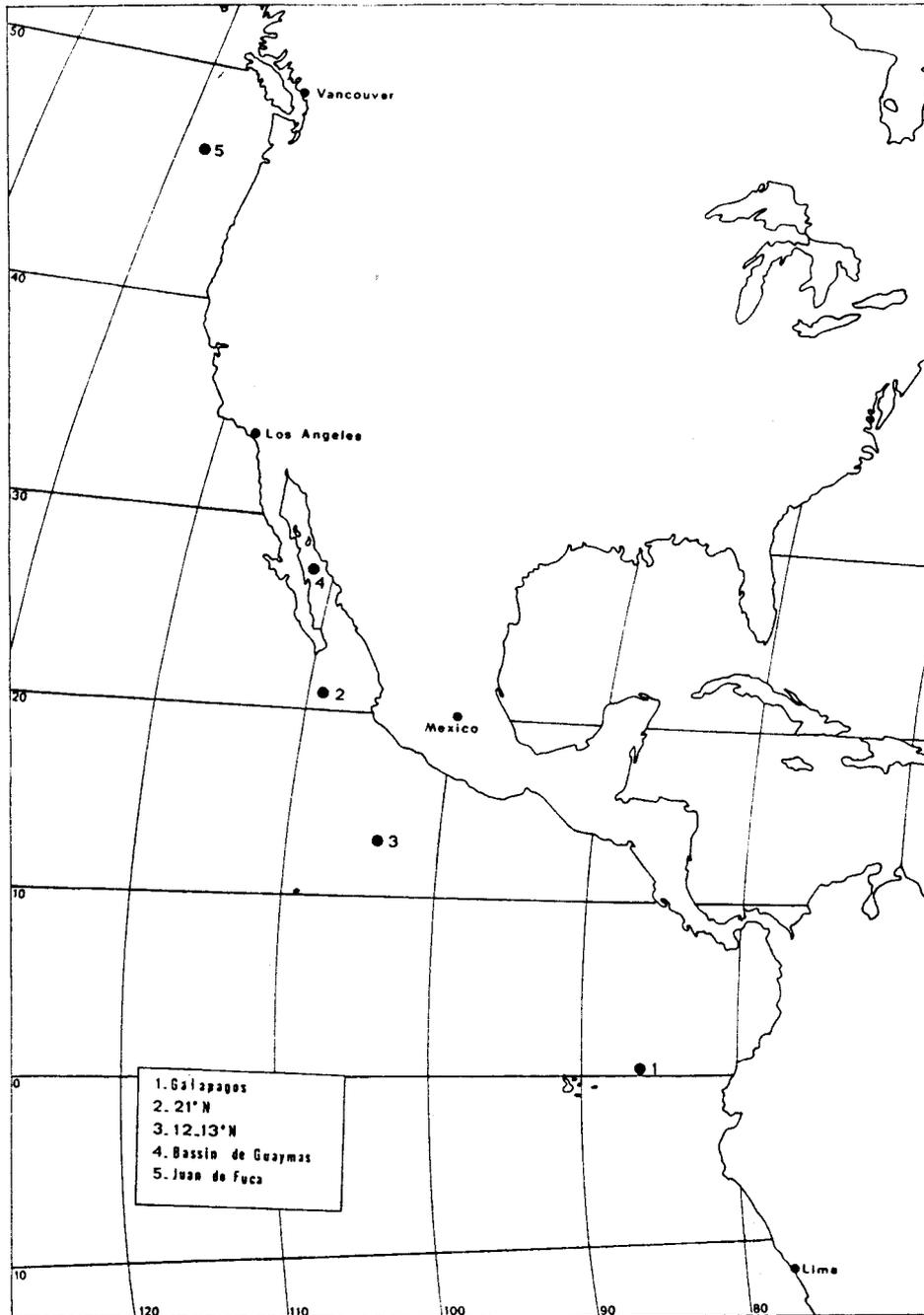


Figure 1 : Localisation des principaux sites hydrothermaux actifs explorés dans le Pacifique Oriental (Prieur et al., 1987).



Figure 2 : Fumeur noir en activité (cliché IFREMER).

s'écartent, le magma, dont la température est d'environ 1200°C, s'élève jusqu'au plancher océanique.

Ce magma va former une nouvelle croûte très perméable en raison des failles et fissures induites par la contraction thermique de refroidissement. L'eau du plancher océanique, dont la température est de 2°C, peut circuler à travers la croûte et atteindre les zones d'intrusion. C'est donc à ce niveau que se fait la rencontre entre l'eau de mer et la roche basaltique chaude. Cette rencontre donne naissance à des solutions de composition chimique particulière qui vont remonter vers le plancher océanique et être expulsées au niveau des fumeurs noirs (Edmond et al., 1982 ; Edmond et Von Damm, 1983.)

Le fumeur noir (Fig. 2, p. 20 ; Fig. 3, p. 21) correspond à une formation minérale qui se crée lors de la rencontre entre la solution hydrothermale et l'eau de mer par précipitation de sulfate de calcium (sous forme d'anhydrite). A mesure que le bord d'attaque de la cheminée progresse, il se trouve exposé au fluide hydrothermal non dilué, il se redissout alors pour être ensuite remplacé par un précipité de sulfures minéraux (sulfure de fer, de zinc, de cuivre).

Le fluide hydrothermal possède des caractéristiques minérales différentes de celles de l'eau de mer ambiante. En particulier, on peut constater un enrichissement qui peut atteindre 10^8 pour le fer, le zinc, le cuivre et le nickel. De plus, la solution contient 210 ppm de sulfure d'hydrogène alors que l'eau de mer n'en contient pas. D'autre part, si le fluide est saturé en silice, il ne contient ni magnésium, ni sulfates.

La Figure 4 (p. 22) résume l'ensemble des réactions minérales induites par les phénomènes d'hydrothermalisme. On peut ainsi constater que le milieu hydrothermal est très contaminé en éléments toxiques

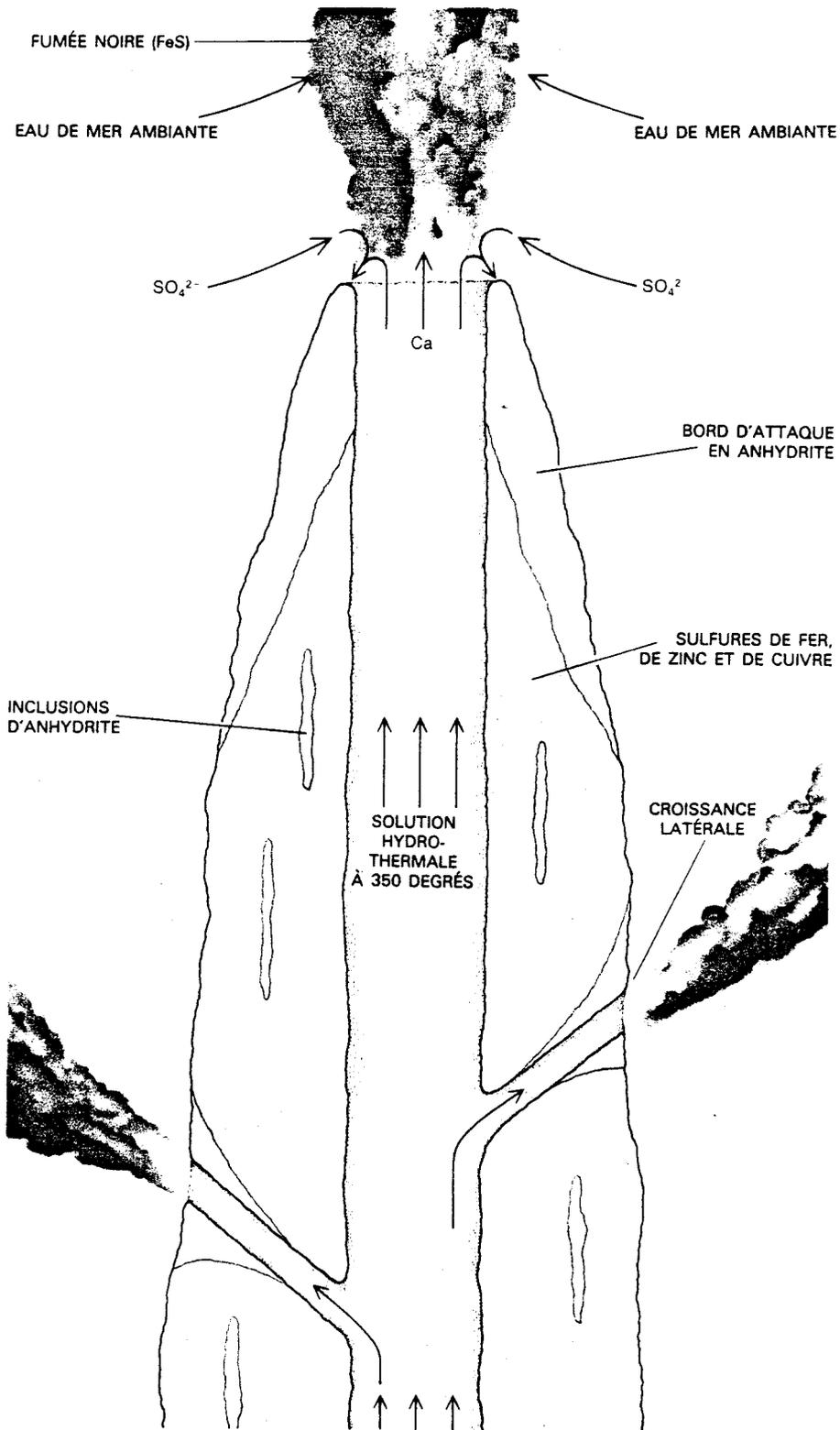


Figure 3 : Représentation schématique d'un fumeur noir (Edmond and Van Damm, 1983).

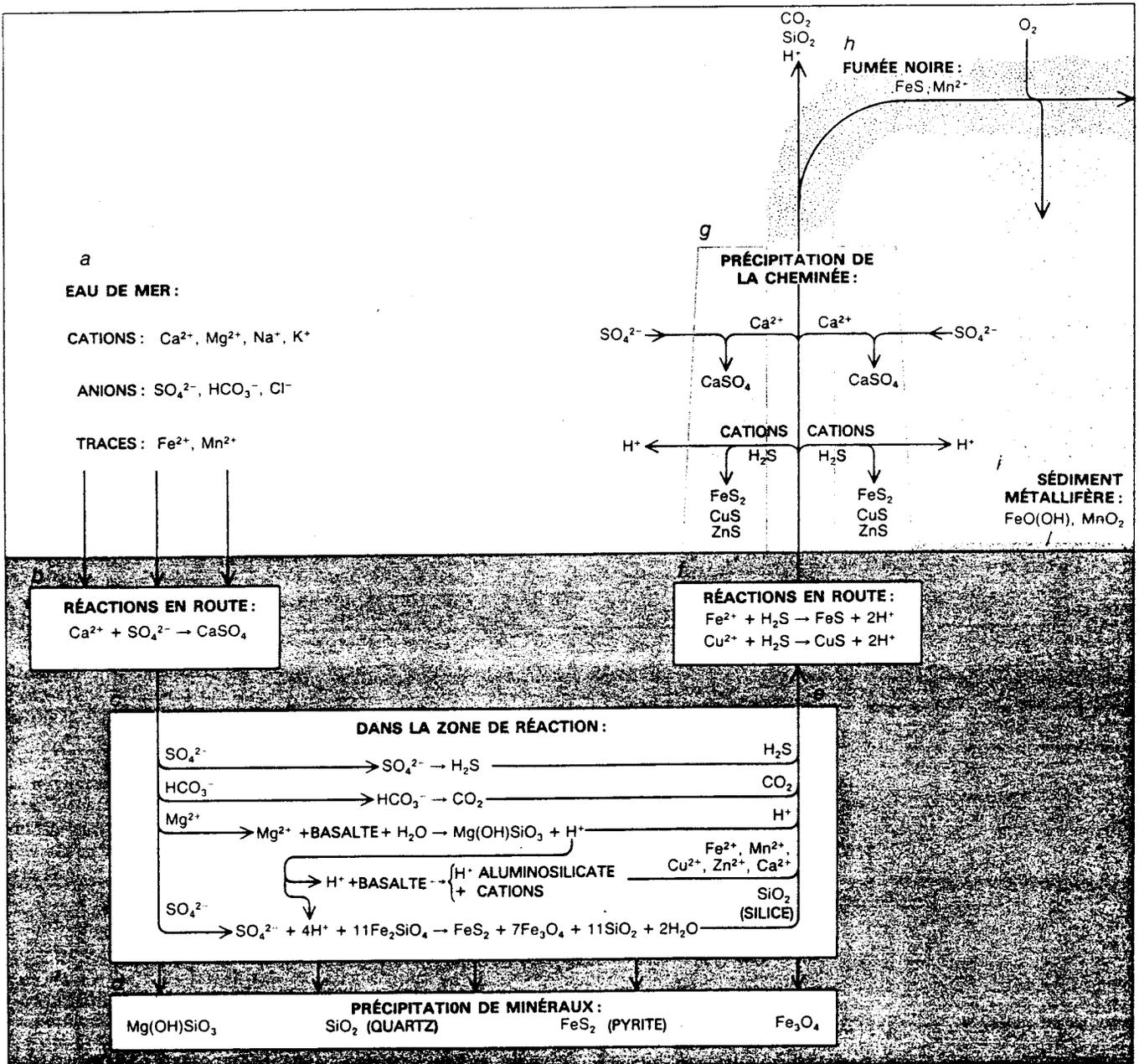


Figure 4 : Schéma représentant les réactions chimiques induites lors de la rencontre du fluide hydrothermal et de l'eau de mer (Edmond and Von Damm, 1983).

pour le monde vivant (métaux lourds en particulier). C'est dans cet environnement que va se développer toute une communauté animale inféodée aux sources.

b. Pression.

L'activité hydrothermale prend place au niveau du plancher océanique à des profondeurs qui atteignent 2500 m. On sait que le poids de la masse d'eau induit tous les dix mètres une augmentation de pression de 10 atm, ce qui implique que l'écosystème se développe sous une pression d'environ 250 atm.

c. Température.

Le fluide hydrothermal est émis au niveau des cheminées à une température voisine de 350°C. La solution, limpide et homogène, se mélange aussitôt à l'eau de mer dont la température est de 2°C. Cette rencontre induit la formation d'un gradient de température qui se développe entre le lieu d'émission du fluide et l'eau de mer, sur quelques dizaines de mètres. Différentes catégories d'organismes vont se développer de façon concentrique autour des cheminées en fonction de leur tolérance vis à vis de la température et de la composition de l'eau de mer.

En fait, le fluide peut être plus ou moins dilué avant d'être émis. Ainsi, il est possible de rencontrer sur un même site, à côté des fumeurs noirs, des fumeurs blancs dont la température (150-270°C) est inférieure à celle des fumeurs noirs. De plus, et c'est le cas aux Galapagos, le fluide peut être extrêmement dilué et simplement émis au niveau de fissures ; sa température ne dépasse pas alors 15°C (Laubier et Desbruyères, 1984).

3.2. Microfaune associée.

a. Introduction.

Lors de la découverte des communautés animales inféodées aux sources hydrothermales, les auteurs se sont demandé, à la vue des biomasses animales mises en jeu, quelles étaient les sources de nourriture utilisées. En effet, ces communautés se situent à des profondeurs de 2500 m qui interdisent toute production photosynthétique.

Lonsdale (1977), a proposé deux hypothèses, quant aux sources de nourriture disponibles :

La première met en cause des courants thermoconductifs d'advection induits par les sources hydrothermales, qui entraîneraient vers les sites de l'eau enrichie en matières organiques d'origine photosynthétique.

La deuxième hypothèse fait intervenir des bactéries chimiosynthétiques comme premier maillon de la chaîne alimentaire.

Depuis ces travaux, plusieurs arguments étayent la deuxième hypothèse, mais sans totalement exclure l'hypothèse des phénomènes thermoconvectifs. Ainsi, le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ déterminé chez différents organismes laisse apparaître une source locale de la nourriture (Rau, 1981).

b. Biomasse bactérienne.

Des études de biomasse, effectuées à partir d'échantillons d'eau prélevés en différents endroits de l'écosystème hydrothermal, ont permis de déterminer des concentrations en cellules bactériennes qui peuvent varier de 10^1 à 10^6 par ml (Wirsen et al., 1986).

Ces valeurs importantes sont à rapprocher de celles déterminées pour des échantillons d'eau de mer de surface littorale (Fergusson et Rublee, 1976). Cependant, ces résultats sont assez différents de ceux déterminés par Corliss et al. (1979) (10^8 à 10^9 cellules par ml). Ces concentrations très importantes en bactéries sont dues très certainement à la présence dans l'échantillon analysé de corps bactériens arrachés du fond. Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence sur le site de Juan de Fuca de tapis bactériens recouvrant le plancher océanique.

Des conclusions identiques sur les concentrations en biomasse ont été obtenues à l'aide de méthodologies différentes comme la détermination des concentrations en ATP. Ces techniques ont permis d'évaluer la présence de 100 à 250 μg de carbone bactérien par litre d'eau hydrothermale, valeur qui chute à 10 μg de carbone total par litre d'eau non hydrothermale issue des grands fonds (Karl et al., 1980).

Cette biomasse d'eau libre est sans doute insuffisante pour assurer la nutrition de tout l'écosystème (Prieur, 1987). En fait, toutes les surfaces du milieu hydrothermal sont colonisées par la flore bactérienne et c'est donc à ce niveau que se fait la production primaire de l'écosystème.

c. Caractéristiques métaboliques des bactéries hydrothermales.

La plupart des métabolismes bactériens potentiels, compte tenu des caractéristiques chimiques du milieu hydrothermal, ont été mis en évidence (Tableau I, p. 26). Si le fluide hydrothermal contient plusieurs composés réduits (H_2S , H_2 , NH_3 , Mn^{++}) pouvant être utilisés par les bactéries chimioautotrophes, il apparaît que les bactéries de type sulfoxydantes sont majoritaires.

Tableau I : Métabolismes bactériens possibles et démontrés, dans les principaux sites hydrothermaux profonds (Prieur et al., 1987).

| Donneurs d'électrons Sources d'énergie | Accepteurs d'électrons | Source de carbone | Type métabolique | Origine de l'échantillon | Mise en évidence par culture (C) ou microscope (M) | Denombrement | Souches isolées |
|---|--|---------------------------------------|---|-------------------------------------|--|--|--|
| H ₂ | O ₂ | CO ₂ | Oxydation de l'hydrogène | NP | | Lilley et al 1983 | |
| HS ⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ⁻ | O ₂ | CO ₂ | Oxydation des sulfures | Eau, surfaces diverses, invertébrés | Jannasch (1985) (M) (C) | Wirsen et al. (1986) Tuttle et al. (1983) | Ruby et Jannasch (1982) Ruby et al. (1981) Jannasch et al (1985) |
| Fe ²⁺ , Mn ²⁺ | O ₂ | CO ₂ | Oxydation Fer et Manganese | Surfaces | Jannasch (1985) (M) | Lilley et al. (1983) | Ehrlich (1983) |
| NH ₄ ⁺ , NO ₂ ⁻ | O ₂ | CO ₂ | nitrification | Eau, invertébrés | Jannasch (1985) (C) Lilley et al. (1983) | | |
| CH ₄ et CO | O ₂ | CH ₄ , CO, CO ₂ | Oxydation du méthane et monoxyde de carbone | Surfaces, eaux invertébrés | Jannasch(1985)(M)(C) Lilley et al 1983)(M) | Lilley et al (1983) | Jannasch et Nelson (1984) |
| Composés organiques | O ₂ | C. Org | Hétérotrophes aérobies | Surfaces diverses, eau invertébrés | Jannasch (1981) (M)(C) | Lilley et al (1983) Bianchi (1986) Prieur (1987) | Weiner et al (1985) Prieur (1987) |
| H ₂ | NO ₃ ⁻ | CO ₂ | denitrifiants | | | | |
| H ₂ | S ⁰ , SO ₄ ²⁻ | CO ₂ | Sulfatoredution | | | | |
| H ₂ | CO ₂ | CO ₂ | méthanogènes | Eaux, surfaces | Baross et al (1982) (C) | Lilley et al (1983) | Jones et al (1983) |
| S ²⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ⁻ | NO ₃ ⁻ | CO ₂ | Dénitrification et sulfoxydation | Eaux, surfaces sédiments | Lilley et al (1983) (C) | | |
| C Organique | NO ₃ ⁻ | C. Org | denitrification | | | | |
| C Organique | SO ₄ ²⁻ | C. Org | Sulfatoredution | Eaux invertébrés | | Lilley et al (1983) Bianchi (1986) | |
| C Organique | C. Org | C. Org | fermentation | Eau | Deming et Baross (1986) (C) | | Harwood et al (1982) |

Se basant sur la relation qui existe entre l'oxydation aérobie des sulfures et la réduction du dioxyde de carbone en carbone organique (Fig. 5, p. 27), Wirsen et al. (1986), par dosage de l'activité de la ribulose diphosphate carboxylase, ont montré que la population des bactéries sulfoxydantes atteint 80% de la biomasse bactérienne totale.

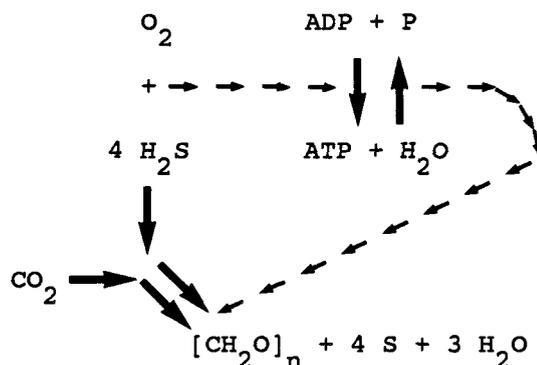


Figure 5 : Chimiosynthèse bactérienne (bactéries sulfoxydantes),
(Jannasch and Wirsen, 1979).

d. Les bactéries thermophiles.

L'eau de mer, à des profondeurs de 2500 m et à des pressions de 250 atm, peut rester à l'état liquide jusqu'à une température de 460°C (Chen, 1981). Nous avons vu que le fluide hydrothermal, lors de son émission dans l'eau de mer froide, pouvait atteindre 350°C. Aussi, pour démontrer la possibilité pour des organismes de se développer dans des conditions aussi extrêmes, Baross et al., (1982) ont effectué, sous diverses conditions, des cultures bactériennes à partir d'échantillons de fluide hydrothermal. Les résultats ont effectivement démontré que certaines bactéries avaient la capacité de se développer à une température de 100°C et sous une pression d'une atmosphère, avec des

temps de génération variant de 37 à 65 min. Ces bactéries produisent du méthane, de l'oxyde de carbone et de l'hydrogène. **Baross et Deming (1983)** ont répété l'expérience dans des conditions qui se rapprochent de celles existant au niveau des sources hydrothermales. Un échantillon d'eau prélevé à 2650 m de profondeur et dont la température mesurée était de 306°C a été préincubé à une température de 100°C. Après dilution, l'échantillon est incubé à différentes températures (150°C, 200°C, 250°C, 300°C) sous 265 atm et les temps de doublement bactérien ont été déterminés par microscopie à épifluorescence après coloration spécifique du DNA. Ils sont de 8 h à 150°C, 1,5 h à 200°C et 40 min à 250°C. A cette dernière température, l'expérience a été confirmée par un doublement du taux de protéines.

Ces résultats ont été mis en doute par **White (1984)** et **Trent et al. (1984)**. En effet, les auteurs n'ont pu répéter ces expériences. Il n'en reste pas moins qu'il existe bien des bactéries thermophiles dans le milieu hydrothermal.

3.3. Macrofaune associée.

a. Description des peuplements.

La plaine océanique, qui représente la majeure partie des terres immergées, est aussi appelée communément désert océanique. En effet, la vie y est rare et ceci est sans doute dû moins aux températures qui règnent à ces grandes profondeurs (2°C à 2500-3500 m) et aux pressions qui y sont associées, qu'à l'absence quasi totale de nourriture disponible. Or, l'approche d'un site hydrothermal (Fig. 7, p. 30) permet de mettre en évidence des peuplements animaux remarquables par leur biomasse. Ainsi, le vers géant Pogonophore *Riftia pachyptila* (Jones, 1981 a, b ; Fig. 7, p. 31) ou la moule géante *Bathymodiolus thermophilus* (Grassle, 1985 ; Kenk et Wilson, 1985) donnent des biomasses de l'ordre de 10 kg par m² (Hessler et Smithey, 1983). A des profondeurs équivalentes, dans le désert océanique, on obtient des valeurs de biomasse qui varient de 0.1 à 10 g par m².

La zonation animale au niveau des sites d'hydrothermalisme est dépendante de plusieurs paramètres tels que la température, le flux du fluide ainsi que sa composition.

Les premiers indices de l'approche d'un site actif sont fournis par la présence d'une espèce de crustacé galathéide appartenant au genre *Munidopsis*, que l'on trouve couramment dans l'océan profond (Laubier et Desbruyères, 1984). Dans cette zone, la température est de 2°C. On distingue ensuite plusieurs ceintures de peuplement, jusqu'à la bouche d'émission de la cheminée hydrothermale :

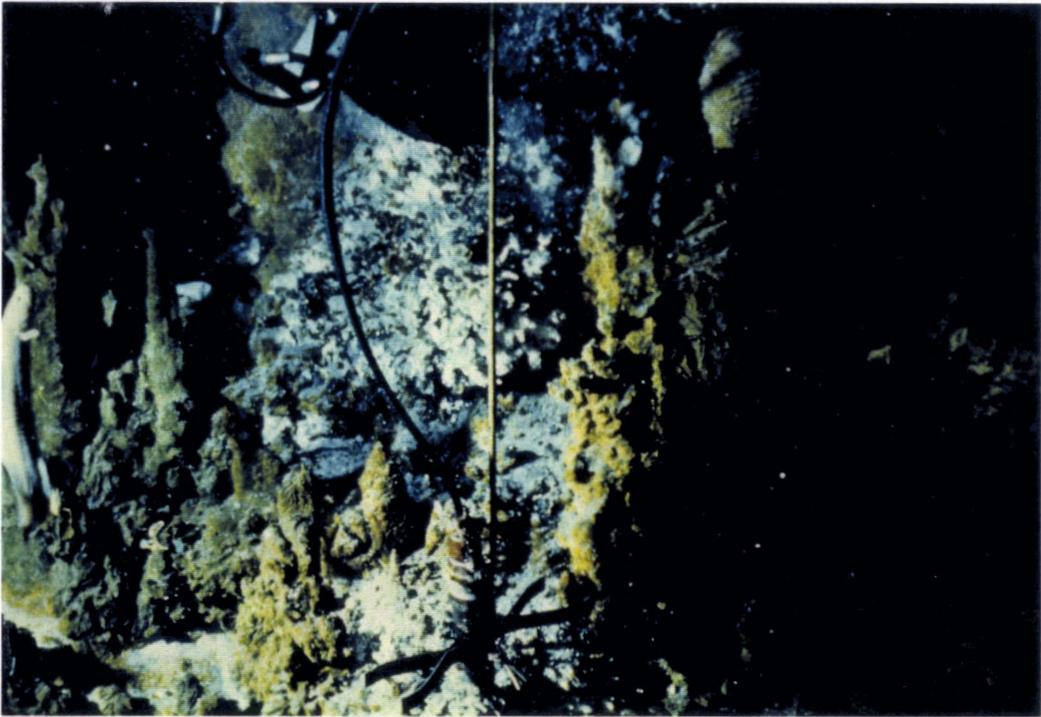


Figure 6 : Vue d'un site hydrothermal (cliché IFREMER).



Figure 7 : Buisson formé par les tubes du ver Vestimentifère géant
Riftia pachyptila (cliché IFREMER).

La Ceinture à Serpulidae.

Cette ceinture, que l'on trouve plus particulièrement à 13° N, mesure une dizaine de mètres de largeur et la température qui y règne est équivalente à celle du désert océanique (2°C), sauf au niveau de crevasses où peut sourdre une eau légèrement atténuée (+ 1°C). On y trouve des Annélides Polychètes (Serpulidae) qui sécrètent des tubes calcaires. On a pu mettre en évidence des densités de plusieurs centaines d'individus par m².

La ceinture à *Bathymodiolus thermophilus*.

Ce mollusque appartenant à la famille des moules marque la limite externe de la zone où la température s'élève progressivement de plusieurs degrés. Il possède une coquille dont la longueur peut atteindre 16 cm.

La ceinture à *Riftia pachyptila* et à *Calyptogena magnifica*.

Cette zone est étonnante en raison de son foisonnement de vie. La température y varie de 8 à 12°C. *Calyptogena magnifica* (Boss et Turner, 1980) est un grand Bivalve patelliforme blanc aux tissus gorgés d'hémoglobine et dont la coquille peut atteindre 30 cm. *Riftia* est un Vestimentifère géant qui vit dans des tubes blancs de nature chitineuse (Gaill et Hunt, 1986) qui peuvent atteindre une longueur de 1,5 m pour un diamètre de 4 à 5 cm (Jones, 1981 a, b). Cet animal forme de véritables buissons. Un autre Vestimentifère de plus petite taille, *Tevnia jerichonana* (Jones, 1985), se développe aussi dans cette zone.

La ceinture centrale à *Alvinella pompejana* (Desbruyères et Laubier, 1980).

Alvinella pompejana est un Annélide Polychète que l'on trouve lorsque la température de l'eau dépasse une trentaine de degrés. Cette espèce peut former des colonies massives sur les fumeurs (Fig. 8, p.34).

Au cours de nos travaux, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux Vestimentifères *Riftia pachyptila* et *Tevnia jerichonana*, et aux Annélides Polychètes *Alvinella pompejana* et *Paralvinella* (Desbruyères et Laubier, 1982 b ; Desbruyères et al., 1985 ; Tunicliffe et al., 1985).

b. *Riftia pachyptila* et *Tevnia jerichonana*.

Nous l'avons vu précédemment, ces deux Vestimentifères se développent dans une zone où la température varie de 8 à 12°C.

Riftia pachyptila vit dans des tubes blancs d'allure parcheminée de nature chitineuse, d'où émerge en contraste un panache formé de lamelles branchiales rouge vif qui dépasse d'une quinzaine de centimètres de l'extrémité du tube. *Tevnia jerichonana* possède également un tube de nature chitineuse (Gaill et al., 1989). *Riftia pachyptila* a été particulièrement étudié en raison de son apparence spectaculaire et de son mode de nutrition original. En effet, de même que les vers Pogonophores (Ivanov, 1963), *Riftia* est dépourvu de tube digestif.

Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant le mode d'ingestion des nutriments essentiels à la croissance de ces animaux (Childress, 1984) :

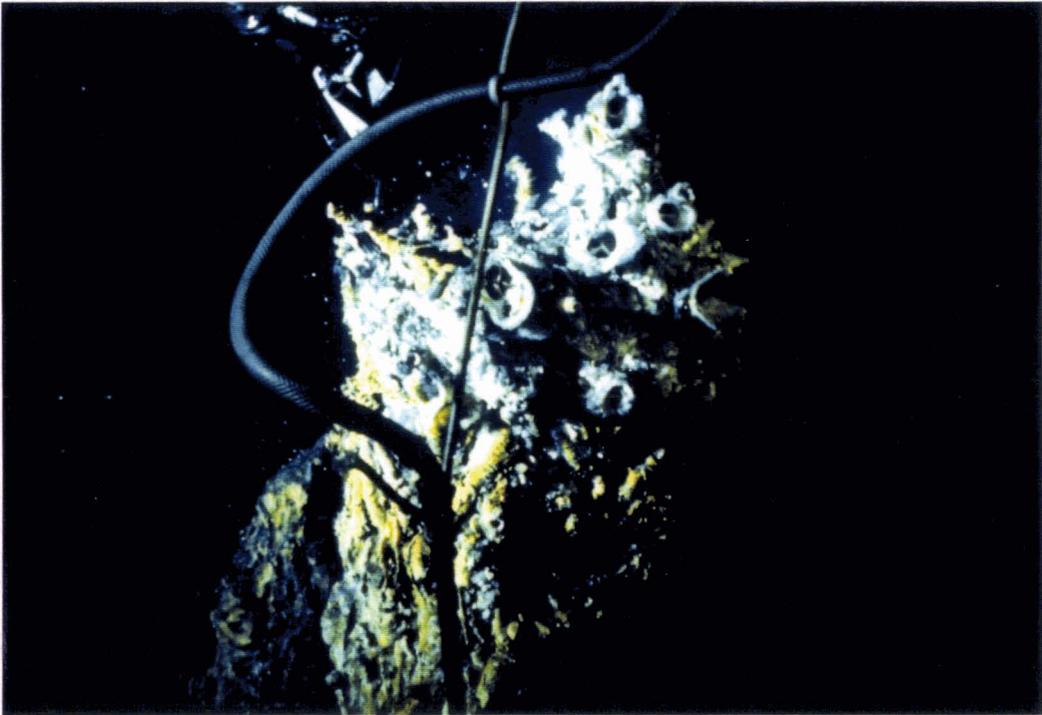


Figure 8 : Colonie du ver de Pompéi *Alvinella pompejana* à la surface d'une cheminée hydrothermale (cliché IFREMER).

- Ingestion de carbone particulaire, de bactéries, par des cellules épithéliales, puis digestion intracellulaire et enfin distribution des éléments nutritifs dans l'organisme.

- Incorporation directe de matière organique dissoute, produite par l'importante population bactérienne du milieu.

- Incorporation de matériel inorganique provenant des sources, puis oxydation par des bactéries chimioautotrophes. L'énergie ainsi produite permet la synthèse, à partir de CO₂, de molécules organiques qui seront ensuite utilisées par le ver.

Divers éléments vont dans le sens de cette dernière hypothèse. En effet, on a pu mettre en évidence au niveau du trophosome (organe très vascularisé qui remplit la cavité du tronc de *Riftia*) des populations bactériennes très importantes (Cavanaugh, 1981) et des activités significatives du cycle de Calvin (Felbeck, 1981). De plus, l'identité du rapport ¹³C/¹²C entre le trophosome et les muscles de l'animal va dans le sens d'une symbiose animal-bactéries (Rau, 1981).

c. Alvinella pompejana et Paralvinella.

Alvinella pompejana est un Annélide Polychète qui se développe dans des tubes de nature organo-minérale (Gaill et Hunt, 1986 ; Gaill, 1988), à la surface même des cheminées hydrothermales d'où s'échappe un fluide qui peut atteindre une température de 350°C. Ce ver est aussi appelé "ver de Pompéi" en raison du flux incessant de particules minérales émises par les cheminées et qui se déposent sur les tubes.

Des mesures directes ont montré qu'à l'intérieur des tubes, la température s'échelonnait de 20 à 40°C (Desbruyères et al., 1982 a).

Il semblerait que la présence de cet organisme soit étroitement liée à l'activité hydrothermale, mais il n'est pas certain que seul le paramètre température joue un rôle dans la zonation de l'animal. Il est plus vraisemblable que c'est l'ensemble des conditions physico-chimiques du milieu qui influence cette zonation.

Alvinella pompejana est pourvu d'un tube protecteur qui lui permettrait de supporter sur de courtes périodes des variations importantes de température.

Paralvinella est également un Annélide Polychète de la famille des Alvinellidés, mais son apparence est plus archaïque que celle d'*Alvinella pompejana*. Ce ver se développe en général à des températures moins élevées que *Alvinella pompejana*. Il sécrète un mucus visqueux qui lui permet de se protéger du flux incessant de particules métalliques émises par les cheminées hydrothermales (Juniper et al., 1986). La qualité de ce mucus varie en fonction de son âge. Il est translucide lorsqu'il est fraîchement sécrété, jaune quand il est chargé en soufre et gris lorsqu'il est chargé d'autres particules minérales.

Quel que soit l'âge de ce mucus, il contient du soufre ; ce qui a amené Juniper et al. (1986), à supposer que ce mucus interviendrait dans un phénomène de détoxification vis à vis du soufre. Il est intéressant de noter que, contrairement à *Alvinella pompejana*, il ne présente aucune bactérie épibionte.

II. LES POLYSACCHARIDES DE BACTERIES MARINES

1. Introduction.

Il semble aujourd'hui bien établi qu'il existe des bactéries possédant la capacité de survivre et de se développer en eau de mer (McLeod, 1965). Les bactéries marines peuvent se développer dans trois biotopes différents : en eau libre, sur des surfaces inanimées ou sur des organismes vivants.

La colonisation de ces deux derniers biotopes nécessite, de la part de la bactérie, la production de molécules qui vont lui permettre de se fixer. Les molécules permettant ces phénomènes d'adhésion sont en majorité des polysaccharides acides extracellulaires (Corpe, 1970, 1973 ; Gessey et al., 1977). Ces molécules forment ce que l'on appelle un "glycocalix" qui est constitué par un réseau macromoléculaire de fibres de nature polysaccharidique s'allongeant à partir de la surface bactérienne. Cependant, d'autres molécules appartenant à la capsule, aux pilis, fimbriae ou aux flagelles ne sont pas à négliger (Kjelleberg, 1984). La formation d'un "glycocalix" représente la capacité d'adaptation de la bactérie à son milieu. D'autre part, le "glycocalix" peut aussi servir de réservoir alimentaire, en effet, les fibres polysaccharidiques chargées négativement ont la capacité de fixer des ions et des molécules nutritives qui seront gardés en réserve.

2. Polysaccharides et mécanisme d'adhésion des bactéries marines.

2.1. Généralités.

La colonisation d'une surface par des bactéries marines se fait en trois étapes. On a, dans un premier temps, une adhésion réversible, puis une adhésion irréversible qui permet enfin la formation de microcolonies (Fletcher, 1980). L'adhésion réversible est caractérisée par l'observation en microscopie optique de mouvements browniens. Les bactéries peuvent être éliminées par simple lavage à l'eau. Ce premier stade n'est pas obligatoire pour qu'apparaisse l'adhésion irréversible. Après fixation, les cellules se développent et forment des microcolonies souvent enrobées dans une matrice de nature polysaccharidique (Jones et al., 1969 ; Fletcher et Floodgate, 1973 ; Gessey et al., 1977)

2.2 Mécanisme.

Le phénomène d'adhésion bactérienne peut être défini en terme d'énergie nécessaire à la formation du lien entre le microorganisme et la surface colonisée (Rutter, 1984).

a. Adhésion non spécifique.

L'adhésion microbienne non spécifique fait intervenir les macromolécules de la surface du microorganisme qui vont interagir avec une surface donnée ou bien avec des macromolécules présentes sur cette surface.

Ce phénomène met en jeu de nombreux types de liaisons : pont hydrogène et liaison hydrophobe (Marshall et Cruickshank, 1973), liaison de coordination avec des cations (Maroudas, 1975).

Il est évident que le nombre et la force de ces interactions varient considérablement d'un système à l'autre.

b. Adhésion spécifique.

Il a été bien démontré que les bactéries possèdent à leur surface, et principalement dans leurs pili, des récepteurs appelés adhésines, qui sont des lectines endogènes, et qui ont la capacité de se lier de manière spécifique à des molécules glucidiques réceptrices se trouvant dans les membranes de leurs cellules cibles (Jones, 1977 ; Ofek et al., 1978 ; Sharon, 1987 Sharon et Lis, 1989).

Ofek et al., 1977 ont, les premiers, montré que l'adhésion de *Escherichia coli* à des cellules épithéliales s'effectue par l'intermédiaire de lectines à α -mannose présents à la surface de ces dernières. Ceci a été mis en évidence à l'aide de molécules inhibitrices de l'adhésion, telles le mannose, le méthyl α -D-mannopyranoside, le mannane de la Levure ou encore la lectine Concanavalline A. Ces résultats permettent d'expliquer la capacité que possède *Escherichia coli* à s'attacher et à coloniser les tissus muqueux humains dont les cellules possèdent des récepteurs à mannose.

De même, des études concernant la fixation de *Vibrio cholerae* (souche P) (Freter et Jones, 1976) à des membranes de cellules de la bordure en brosse de l'intestin de lapin, ont permis de montrer que la

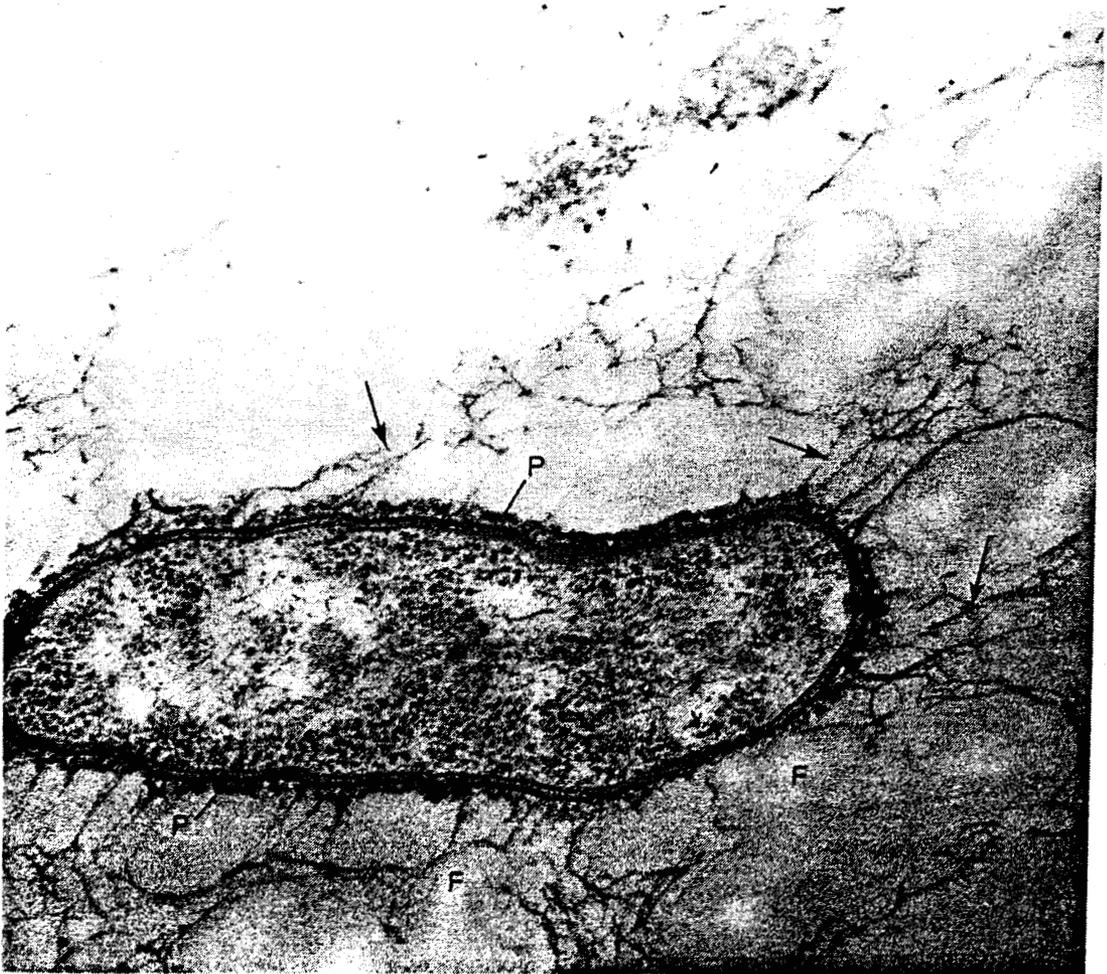


Figure 9 : Observation par microscopie électronique d'un *Pseudomonas* marin fixé à un filtre millipore (F), après coloration au rouge de ruthénium (Fletcher, 1980). Le polymère extracellulaire (P), émet des prolongements (flèches) qui permettent la liaison au filtre.

fixation est inhibée par la présence de D-mannose. Ce monosaccharide est compétiteur de la liaison de la bactérie à des glycoprotéines membranaires de surface.

2.3. Mise en évidence des polysaccharides intervenant dans l'adhésion.

Les données concernant les molécules d'adhésion des bactéries dans le milieu marin sont parcellaires et concernent essentiellement des macromolécules de nature glucidique (Sutherland, 1980, 1983), caractérisées pour l'essentiel par microscopie électronique.

a. Mise en évidence par microscopie électronique.

La caractérisation des polymères glucidiques peut se faire soit en utilisant leur caractère polyanionique par l'utilisation de colorants de type rouge de ruthénium (Pate et Ordal, 1967) (Fig. 9, p. 41) ou bleu alcyan (Behnke, 1968), soit en tirant partie de la présence dans leur structure de groupements vic-glycol sensibles à l'acide périodique : méthode P.A.T.Ag à l'acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (Thiéry, 1967) ; méthode au méthénamine d'argent (Dhir et Boatman, 1972).

b. Mise en évidence par analyse chimique.

Une caractérisation plus poussée des polysaccharides demande la production et la purification de ceux-ci. Sutherland (1980) a examiné la composition de plusieurs polysaccharides de bactéries marines après hydrolyse et chromatographie sur papier. Trois monosaccharides sont trouvés très fréquemment : le D-glucose, le D-mannose et le D-galactose.

Christensen et al., 1985 ont étudié un *Pseudomonas* marin ayant la capacité de se fixer à des surfaces hydrophobes. Cette souche bactérienne cultivée en fermenteur élabore au cours de sa croissance deux types de polysaccharides. Le premier, dénommé polysaccharide A (Tableau II, p. 43) est produit uniquement durant la phase exponentielle de croissance. Cet exopolymère constitué de galactose, de glucose, d'acides glucuronique et galacturonique donne des solutions visqueuses à des concentrations de 1 %. A des concentrations plus importantes, il gélifie. Une liquéfaction est obtenue pour des températures de 70-80°C avec retour à l'état de gel lorsque la température diminue. Enfin, ce polymère précipite en présence de cations multivalents (Cu^{2+} , Al^{3+} et Fe^{3+}) ou de sels d'ammonium quaternaire comme le cétrimide. Le second (polysaccharide B) est produit à la fin de la phase exponentielle et lors de la phase stationnaire. Il est constitué de N-acétylglucosamine, d'acide 2-céto-3-déoxy-octulosonique (KDO) et d'un 6-déoxyhexose non identifié. Il renferme également des groupements O-acétyle. Ce polymère ne donne pas de solutions visqueuses et possède des propriétés de solubilité particulières : il est soluble dans le phénol à 90 %, dans l'éthanol et le méthanol à 80 %.

Les résultats de la composition de ces deux polysaccharides ont permis aux auteurs de leur attribuer un rôle physiologique :

Tableau II : Rapports molaires en monosaccharides et en constituants de nature non glucidique de quelques polysaccharides isolés de bactéries marines.

| Souches bactériennes | P | Constituants | | | | | | | | | | | Auteurs | |
|--|------------|--------------|-----|------|-------|-------|------|-------|-----|--------|----|------|-------------------------|----------------------------|
| | | Man | Glc | Gal | GlcUA | GalUA | Rham | 6-d-h | KDO | GlcNAc | Ac | Pyr | | |
| <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> | A | - | 1 | 0,81 | 0,42 | 0,32 | - | - | - | - | - | - | - | Christensen et al.,1985 |
| NCMB2021 | B | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | | |
| <i>Pseudomonas</i> <i>atlantica</i> | | 1 | | | | 1 | - | - | - | - | - | 0,2 | Corpe,1970 | |
| Bactérie de la zone intertidale | PS 3a35 | 0,06 | 1 | 0,75 | - | - | 0,11 | - | - | - | - | 0,05 | Boyle and Reade,1983 | |
| | PS 3a24 | 0.06 | 1 | 1,43 | - | - | - | - | - | - | - | - | | |

P : Polysaccharide, Man : mannose, Glc : glucose, Gal : galactose,
GlcUA : acide glucuronique, GalUA : acide galacturonique, Rham : rhamnose,
6d-h : 6-déoxy-hexose, KDO : acide 2-céto-3-désoxy-octulosonique, GlcNAc :
N-acétyle-glucosamine, Ac : acétate, Pyr : pyruvate.

Le polysaccharide A interviendrait dans l'adhésion bactérienne, en maintenant entre les cellules une matrice hydratée et mécaniquement stable. De plus, sa capacité de fixation des cations en ferait une molécule de protection envers les cations métalliques toxiques.

Le polysaccharide B, par la présence de monosaccharides plus hydrophobes (6-déoxyhexose) et de nombreux groupements acétyle serait responsable de l'adhésion de la bactérie à des surfaces hydrophobes.

Une autre espèce de *Pseudomonas*, *Pseudomonas atlantica* produit également un exopolysaccharide acide qui lui permet de s'attacher fermement à des surfaces telles que le verre, le plastique ou le métal (Corpe, 1970). Le Tableau II (p. 43) résume sa composition : il contient trois monosaccharides neutres, le glucose, le galactose et le mannose, en rapport équimolaire avec de l'acide galacturonique. De plus, l'acide pyruvique a été identifié comme constituant non glucidique de ce polysaccharide. Uhlinger et White en 1983 ont pu mettre en évidence une différence dans la composition en monosaccharides du polymère glucidique en fonction de la croissance de la bactérie : augmentation de l'acide galacturonique et du glucose au dépend du galactose. D'autre part, la colonisation de surfaces imprégnées par le polysaccharide excrété par *Pseudomonas atlantica*, par des organismes tels des algues filamenteuses, se fait plus rapidement que lorsque les surfaces sont vierges.

3. Propriétés de quelques exopolysaccharides de bactéries marines.

Nous ne possédons, à l'heure actuelle, que peu de données bibliographiques sur les propriétés d'exopolysaccharides de bactéries marines. Un seul travail intéressant relate les propriétés rhéologiques d'un polymère en les comparant à celle de la gomme xanthane (Boyle et Reade, 1983). De même, des propriétés pharmacologiques ont été décrites

pour deux polysaccharides excrétés par des bactéries marines (Okutani, 1974, 1976, 1977).

3.1 Propriétés rhéologiques.

Boyle et Reade (1983) ont étudié des bactéries marines isolées de la zone intertidale pour leur capacité à produire des exopolysaccharides possédant des propriétés rhéologiques intéressantes.

La zone intertidale est un milieu dont on peut penser à priori qu'il est capable de sélectionner des bactéries excrétrices de polysaccharides ayant un rôle protecteur et des propriétés adhésives. En effet, les bactéries qui se développent dans cette zone ont à supporter, à la fois, la force des vagues et l'exposition intermittante à l'air.

Deux polysaccharides, PS 3a24 et PS 3a35 présentant des propriétés intéressantes et comparables à celles du xanthane, ont été isolés. Ils possèdent tous deux une viscosité spécifique importante, équivalente à celle du xanthane pour le PS 3a35 et supérieure à ce polysaccharide témoin pour le PS 3a24. Leur stabilité vis à vis du pH est bonne, le PS 3a24 conserve une viscosité stable de pH=2 à pH=9, alors que le PS 3a35 est stable de pH = 3,5 à pH = 11. La viscosité du PS 3a35 est stable sur une plage de température importante (5-95°C) alors que la viscosité du PS 3a24 diminue au fur et à mesure que la température augmente.

L'addition de sels (NaCl, CaCl₂, MgSO₄) à 1 % dans les solutions de polysaccharide ne modifie pas les paramètres rhéologiques tels la viscosité en fonction de la température et la viscosité en fonction du pH. D'autre part, ils possèdent des propriétés gélifiantes en milieu basique et en présence de sels.

Le **Tableau II (p. 43)** rassemble leurs rapports molaires en monosaccharides et en constituants non glucidiques. Tous deux contiennent du mannose (en petite quantité), du glucose et du galactose, mais le PS 3a35 possède en plus du rhamnose, ainsi que de l'acide pyruvique.

Les propriétés rhéologiques de ces deux polysaccharides en font, selon les auteurs, des hydrocolloïdes qui pourraient être utilisés comme substitut du xanthane.

3.2 Propriétés antitumorales.

Ces propriétés ont essentiellement été étudiées par **Okutani (1974, 1976, 1977)**.

La souche N° 11-15, appartenant au genre *Vibrio*, isolée du milieu marin, produit un exopolymère visqueux à raison de 1 à 2 g par litre de culture. Ce polysaccharide est précipitable par l'acétone et est soluble dans l'eau (**Okutani, 1974, 1976**). L'activité antitumorale de ce polysaccharide a été étudiée sur des souris de 20 g avec deux types de tumeurs :

Le type ascite (sarcome 180) est injecté par voie intrapéritonéale et le type solide (Sarcome Nakahara, Fukuoda) est injecté par voie sous-cutanée.

Un lot de souris est traité par des injections de polysaccharide chaque jour pendant 5 jours. Le développement des tumeurs est comparé à celui de souris non traitées par le polysaccharide. Le polysaccharide est injecté soit par voie intrapéritonéale, soit par voie sous cutanée.

Par voie intrapéritonéale, une injection de 0,1 mg de polysaccharide par kg d'animal chaque jour pendant 5 jours induit une inhibition de 60% du développement des ascites. Ce pourcentage est de 84 % pour des doses de 1 mg par kg d'animal chaque jour pendant 5 jours.

I. ETUDE DES CONSTITUANTS DES TUBES ET MUCUS DE VERS VESTIMENTIFERES ET ANNELIDES DU MILIEU HYDROTHERMAL PROFOND.

1. Composition centésimale.

1.1. Introduction.

Les communautés animales qui se développent au niveau des sources hydrothermales d'eau profonde évoluent dans un environnement très hostile, riche en métaux lourds, hydrogène sulfuré et ont à supporter de rapides variations de température, ainsi qu'une pression qui atteint 260 atm.

Nous avons étudié la composition chimique des tubes et mucus excrétés par quatre vers marins caractéristiques du milieu hydrothermal profond. *Alvinella pompejana* et *Paraalvinella sp.* sont deux Annélides Polychètes, mais si *Alvinella pompejana* excrète un tube protecteur, *Paraalvinella* excrète une structure de type mucus. *Riftia pachyptila* et *Tevnia jerichonana* sont deux vestimentifères qui se développent dans des tubes rigides de nature chitineuse.

1.2. Article 1

**CHEMICAL COMPOSITION OF MUCINS FROM DEEP SEA HYDROTHERMAL
VENT TUBICULOUS ANNELID WORMS**

TRAVAUX PERSONNELS

CHEMICAL COMPOSITION OF MUCINS FROM DEEP SEA HYDROTHERMAL VENT TUBICULOUS ANNELID WORMS

FRANCK TALMONT* and BERNARD FOURNET†‡

*IFREMER, Centre de Brest, BP70, 29267, France; and †Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique, No. 111), Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France (Tel: 2043 4883)

(Received 17 January 1990)

Abstract—1. Proteins, carbohydrates and mineral compositions have been determined on mucins from tubicolous annelid worms from deep sea hydrothermal vents.

2. The vestimentiferans are characterized by a high proportion of both proteins (35%) and carbohydrates (40–50%). Uronic acids were shown to be present for the first time.

3. This kind of sugar certainly contributes, together with chitin, to the tube structuration.

4. *Riftia pachyptila* possesses more neutral sugars and hexuronic acids and less minerals than *Tevnia jerochonana*.

5. The two Alvinellidae have a high proportion of inorganic material and their carbohydrate content are equal in quantity. *Alvinella pompejana* is characterized by the presence (more than 50%) of fucose and methylated monosaccharides, and by a high percentage of proteins (30%).

6. The organic part of *Paraalvinella* sp. which represents 10% of the total, contains sugars (60%) and proteins (40%).

INTRODUCTION

Alvinella pompejana, *Paraalvinella* sp. *Riftia pachyptila* and *Tevnia jerochonana* are four marine Annelida species found strictly beside deep sea hydrothermal vents (Desbruyères and Laubier, 1980, 1982a; Desbruyères *et al.*, 1985; Jones, 1981a, 1985). Hydrothermal vent animal populations have mostly been studied from an ecological point of view. Vent worms live in a very hostile environment and have to support rapid temperature variations, high pressures up to 260 atm and are surrounded by a highly concentrated effluent from the vents containing hydrogen sulfide, mineral and metal salts (Somero *et al.*, 1983). *Alvinella pompejana*, like other species of Alvinellidae possesses a structured tube in which it lives. This tube, built out of organo-mineral material (Vovelle and Gaill, 1986) is made from a proteoglycan matrix and the tube walls are concentrically multilayered (Gaill and Hunt, 1986).

They are generally 10 cm in length, 1.5 cm in diameter and 1 mm in thickness (Gaill and Hunt, 1986) *Alvinella pompejana* lives in tubes secreted at the surface of smokers whose temperature can reach 350°C while the surrounding water is 2°C. Desbruyère *et al.* (1982b) have shown that the

temperature in the inner tube varies from 20 to 40°C. The *Paraalvinella* sp. that we studied does not possess a tube but secretes a mucus; only *Paraalvinella hessleri* has a tube (Desbruyères, pers. commun). *Paraalvinella* sp. living at lower temperatures can be found among *Alvinella* populations or among vestimentiferans as *Riftia pachyptila* or *Tevnia jerochonana* which develop at ca 15°C temperatures (Desbruyères and Laubier, 1980, 1982b).

As for Pogonophora, the order in which they were first classified, *Riftia pachyptila* (Vestimentifera) (Jones 1981a) lives in a tube containing chitin (Gaill and Hunt, 1986). *Riftia*'s tubes are white, flexible, extremely sturdy, essentially cylindrical (Jones, 1981a, b) and parchment like. They are up to 1.5 m in length and 38 mm in diameter. The tube of *Tevnia* is smaller than *Riftia*'s (Jones, 1985), more sturdy and also contains chitin (Gaill *et al.*, 1989).

The four worms we studied have external structures that protect their bodies from the environment. Most of the information we have regarding tubes and mucus are bitty and deal with mineral composition, ultrastructure aspect and amino acid composition. No or very little information is available on carbohydrate or total protein content.

Our purpose was therefore to characterize, in a chemical way, tubes and mucus of the studied animals and to compare our results with those obtained with worms living in more usual conditions.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Tubes and mucus were collected from vent faunal samples obtained by the submersible Nautilie during the hydronaute cruise (13°N) in November 1987. They were preserved at

‡Author to whom correspondence should be addressed.

Abbreviations used—HCl, hydrochloric acid; GLC, gas-liquid chromatography; MeOH/HCl, methanol/hydrochloric acid; HPLC, high performance liquid chromatography; PTH, phenylisothiocyanate; TFAA, trifluoroacetic acid; Man, mannose; Glc, glucose; Gal, galactose; Xyl, xylose; Fuc, fucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GlcUA, glucuronic acid.

Table 1. High performance liquid chromatography gradient used for reversed phase chromatography of PTH amino acids

| Time (min) | A (%) | B (%) |
|------------|-------|-------|
| 0 | 100 | 0 |
| 14 | 65 | 35 |
| 24 | 60 | 40 |
| 29 | 0 | 100 |
| 32 | 0 | 100 |
| 34 | 100 | 0 |
| 60 | 100 | 0 |

A, Sodium acetate 0.1 M in water with 0.64 ml of trimethylamine, 6% of acetonitrile, pH = 6.4. B, Acetonitrile:water, 60:40.

-80°C on board and then stored at -20°C. For studies, tubes were washed with water and subsequently desiccated and then ground. Samples from *Paraalvinella* sp. were taken by removing mucus which was shed from the worms.

Centesimal composition

The total neutral carbohydrate content was determined by using the orcinol-sulfuric acid method reported by Tillmans and Philippi (1929), modified by Rimington (1931).

Hexuronic acids were determined with the carbazol-sulfuric acid method described by Dische (1947).

Hexosamines were estimated from acid hydrolysis (HCl 4N, 24 hr at 100°C) by the Elson-Morgan method (1933).

Soluble protein content was obtained by sonication followed by centrifugation. Protein content of the supernatant was estimated by the Lowry protein assay with bovine serum albumin as standard (Lowry *et al.*, 1951).

Mineral content was determined gravimetrically after calcination at 550°C for 24 hr.

Molar carbohydrate composition

The molar composition of monosaccharides was determined by gas-liquid chromatography (GLC) of per-O-trimethylsilylated methyl glycosides obtained after methanolysis (MeOH/HCl; 0.5 N; 80°C; 24 hr), *N*-reacetylation of hexosamines and trimethylsilylation according to Kamerling *et al.* (1975) modified by Montreuil *et al.* (1986) and of polyol acetates obtained after acid hydrolysis using several reagents and times of hydrolysis (TFAA 4 N, HCl 2 N, HCl 4 N; 2, 4, 6, 8 and 16 hr), reduction and peracetylation.

Amino acids composition

The amino acid composition of samples was determined by using a Pico-Tag work station associated with a Spectra Physics model 8100 automatic pump system, and Knauer "variable wavelength monitor" detector set at 269 nm and a Spectra Physics model 4290 integrator. Samples (equivalent to 25 µg of proteins) were hydrolyzed by boiling in 6 N HCl for 20 hr at 105°C in the work station. Precolumn derivatization of amino acids with phenylisothiocyanate was performed according to Bidlinmeyer *et al.* (1984). High performance liquid chromatography separation of modified amino acids was performed on an octadecylsilyl bonded column (4,6 × 250 cm; 5 µm, chromatem Touzart et

Matignon) at 40°C with a constant flow of 1 ml/min. The modified amino acids were eluted using the following gradient (Table 1): solvent A: sodium acetate 0.1 M in water with 0.64 ml of trimethylamine and 6% of acetonitrile, pH = 6.4; and solvent B: 60% of acetonitrile in water.

RESULTS

The results of the centesimal composition, for each sample are shown in Table 2. Determinations were carried out after desiccation and grinding. The grinding step was necessary in order to obtain a good recovery yield.

Mineral content

We observed that the organic fraction does not represent the sole constituent of the samples neither in the tubes nor in the mucus, each sample has a mineral part. Ash does not contribute solely to the mineral fraction of the *Alvinella*'s tube and of *Paraalvinella*'s mucus. These two samples contain a chloroform extractable material which is probably native sulfur. Mucus from *Paraalvinella* is characterized by high contents of this material (45%) whereas *Alvinella*'s tube content is lower (5%). Juniper *et al.* (1986) reported the presence of sulfur in *Paraalvinella* (15.5–66.7%) in the same way Gaill and Hunt (1986) found 12–25% of this material in *Alvinella pompejana*. Tubes from vestimentiferans have no chloroform extractable material. Elemental sulfur may have two origins: excretion of sulfur ingested (Desbruyères *et al.*, 1983; Juniper *et al.*, 1986) or production from epibiotic bacteria (Alayse-Danet *et al.*, 1985). These differences in sulfur measures can be due to the hydrothermal environment which is distinct for each animal population. This chloroform extractable material which gives yellow crystals after elimination of chloroform is volatilized at mineralization temperature (550°C), so the mineral content estimation for *Alvinella*'s tube and for mucus from *Paraalvinella* must be increased by the native sulfur level. In this case, the total mineral fraction for *Paraalvinella*'s mucus and *Alvinella*'s tube reaches 72 and 45%, respectively. On the contrary, *Riftia*'s tube contains a low quantity of mineral material (2.8% for external *Riftia*'s tube, 7.7% for internal *Riftia*'s tube). The same value is obtained by Gaill and Hunt (1986) for the *Riftia*'s entire tube (3%).

Proteins and amino acids

In Table 2, we give the total protein content of samples using the Lowry technique. Tubes from vestimentiferans and from *Alvinella pompejana* are characterized by a high protein content (30–40%) and the amino acid determinations confirm the colorimetric Lowry assay. We have compared our results of amino acid determinations with those

Table 2. Centesimal analysis of tubes from *Alvinella pompejana*, *Tevnia jerichonana*, *Riftia pachyptila* and of mucus from *Paraalvinella* sp.

| | Neutral sugars | Hexuronic acids | Hexosamines | Total carbohydrates | Proteins | | Ashes | Chloroformic extract | Total |
|----------------------------|----------------|-----------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|-------|----------------------|-------|
| | | | | | Lowry assay | Amino acids | | | |
| <i>Paraalvinella</i> sp. | 4.5 | 0.7 | 0.3 | 5.5 | 4.1 | 4.3 | 27 | 45 | 81.6 |
| <i>Alvinella pompejana</i> | 3.5 | 1.4 | 0.3 | 5.2 | 30.5 | n.d. | 40 | 5 | 80 |
| <i>Riftia pachyptila</i> | 12 | 7 | 34.5 | 53.5 | 36 | 31.7 | 5 | - | 94.5 |
| <i>Tevnia jerichonana</i> | 3.3 | 2.5 | 32 | 37.8 | 33 | 22.7 | 20 | - | 90.8 |

Table 3. *Tevnia jерichonana*, *Riftia pachyptila*, *Alvinella pompejana* tubes and *Paraalvinella* mucus amino acid compositions expressed as the number of individual residues per 1000 total residues

| Amino acid | <i>Tevnia jерichonana</i> | | <i>Riftia pachyptila</i> | | <i>Paraalvinella</i> sp. | | | <i>Alvinella pompejana</i> | | |
|---------------|---------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|------|------|----------------------------|-----|-----|
| | (a) | (b) | (a) | (b) | (a) | (c)* | (c)† | (c)‡ | (a) | (b) |
| Aspartic acid | 118 | 126 | 122 | 111 | 9 | 156 | 169 | - | 8 | 67 |
| Threonine | 48 | 31 | 51 | 49 | 88 | 47 | - | - | 51 | 39 |
| Serine | 78 | 37 | 70 | 75 | 62 | 41 | 35 | - | 121 | 250 |
| Glutamic acid | 75 | 86 | 90 | 73 | 24 | 107 | 102 | - | 26 | 53 |
| Proline | 66 | 48 | 69 | 58 | 92 | 45 | - | - | 47 | 14 |
| Glycine | 120 | 139 | 105 | 144 | 130 | 124 | 144 | 303 | 213 | 206 |
| Alanine | 62 | 49 | 87 | 78 | 101 | 76 | 120 | 503 | 160 | 118 |
| Cysteine | 11 | 54 | 31 | 98 | - | 22 | 39 | - | 3 | tr |
| Valine | 71 | 71 | 85 | 72 | 93 | 72 | 110 | 144 | 120 | 63 |
| Methionine | 12 | - | 15 | 2 | 29 | 6 | - | - | 16 | 15 |
| Isoleucine | 76 | 23 | 47 | 32 | 78 | 44 | 60 | - | 57 | 21 |
| Leucine | 51 | 40 | 43 | 39 | 112 | 57 | 75 | - | 70 | 27 |
| Tyrosine | 22 | 90 | 27 | 53 | 11 | 41 | 63 | - | 24 | 47 |
| Phenylalanine | 49 | 44 | 38 | - | 69 | 39 | - | - | 48 | 29 |
| Lysine | 37 | tr | 69 | 62 | 79 | 53 | - | - | 13 | 17 |
| Histidine | 29 | 46 | 14 | 24 | tr | 25 | 36 | 50 | 5 | 16 |
| Arginine | 76 | 115 | 37 | 59 | 23 | 44 | 47 | - | 18 | 20 |

(a) Our results.

(b) Gaill and Hunt (1986).

(c)* Mucin newly secreted; (c)† and (c)‡ old mucins (Gaill, pers. commun).

obtained by Gaill and Hunt (1986). *Tevnia* and *Riftia*'s tubes are characterized by a high concentration of aspartic acid and glycine (Table 3), but in addition we observed the presence of phenylalanine in *Riftia* and methionine in *Tevnia*. Differences were found for several amino acids (cysteine, methionine). Moreover amino acid determinations carried out on crude fractions of *Alvinella*'s tube and on mucus from *Paraalvinella* show large differences compared to the results published by these authors particularly for aspartic acid and serine. Mucus from *Paraalvinella* has a low protein content (4%) with regard to total composition (Table 2), but if we refer to the organic fraction, it represents 40%. The difference in amino acid content by comparison with results from Gaill and Hunt (1986) could be due to the heterogeneity of this fraction, especially because of the presence of high concentrations of mineral material which can be seen on the old mucus mineralized. The same conclusion was given by Defretin (1971) for the amino acid composition of polychaete annelid tubes.

Colorimetric carbohydrate determinations

Each sample contains three classes of carbohydrates: neutral sugars, hexuronic acids, and hexosamines (Table 2). The two vestimentiferans have high carbohydrate contents (53.5% for *Riftia* and 37.8% for *Tevnia*) and a particularly high concentration of hexosamines (64 and 85% with respect to total carbohydrate material of *Riftia* and *Tevnia*). Mucus from *Paraalvinella* has a low carbohydrate content (5.5%) which nevertheless represents 60% of the organic fraction. Carbohydrate of the tubes from *Alvinella pompejana* are characterized by the presence of hexuronic acids (26% of the total carbohydrate fraction). By histochemical determination (Blue Alcyan reaction), Vovelle and Gaill (1986) have determined sulfated mucosubstances in *Alvinella*'s tubes. But the observed stain can also be due to the presence of hexuronic acids in the carbohydrate material. Our results concerning the neutral carbohydrate composition of *Alvinella*'s and *Riftia*'s tubes, show large differences with those published by Gaill

and Hunt (1986) (7.5 and 3% of neutral carbohydrate for *Alvinella* and *Riftia*, respectively). We can attribute these differences to the presence of minerals which interfere in the colorimetric assay. Nevertheless, our carbohydrate centesimal compositions are in accordance with results obtained after acid hydrolysis (especially after trifluoroacetic acid hydrolysis) and gas-liquid chromatography determination of released monosaccharides.

Identification and centesimal determination of monosaccharides

In order to identify and to estimate the monosaccharides present in samples, several techniques were used to free them: methanolysis and analysis of methyl glycosides under the per-*O*-trimethylsilylated form, hydrolysis with several acids (HCl, TFAA) at several concentrations and analysis of monosaccharides under polyol acetates. Generally, methanolysis is a mild technique which cannot quantitatively split all the glycosidic linkages, especially the uronosidyl and osaminidyl ones, so it is essential to compare the results obtained with this technique with those obtained by acid hydrolysis. In fact, our results on *Riftia* and *Tevnia* show that it is important to perform hydrolysis kinetic experiments in order to identify and estimate all the monosaccharides. Finally, with these techniques (hydrolysis and analysis of monosaccharides under polyol acetate forms), it is not possible to identify uronic acids.

In *Riftia*'s tubes (Table 4), we observed a high concentration of *N*-acetylglucosamine (30.7% by using HCl 4 N, 8 hr, 100°C). However, three monosaccharides: fucose, galactose and *N*-acetylgalactosamine were estimated to have contributions of ca 5%. In addition, under milder hydrolysis conditions (HCl 2 N during 16 hr) we released 3% of xylose. This pentose is very labile and is destroyed by hydrolysis with HCl 4 N after 2 hr. Mannose and glucose were present in lower amounts (less than 1%). As expected, methanolysis allowed us to identify all monosaccharides, especially glucuronic acid with a low rate of release (1.9%) in comparison with the colorimetric assay (7%).

Table 4. Centesimal composition of monosaccharides released from the tubes of *Riftia pachyptila* and *Tevnia jerichonana* by several acid hydrolysis at different times (determined as polyol acetates) and by methanolysis (determined as trimethylsilyl glycosides)

| Samples | Acids | Monosaccharides | | | | | | | | Total neutral sugar | Total osamines | |
|---------------------------|-----------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|---------------------|----------------|-------|
| | | Man | Glc | Gal | Xyl | Fuc | GlcNAc | GalNAc | GlcUA | | | |
| <i>Riftia pachyptila</i> | TFAA 4 N | 0.48 (16)* | 0.58 (16) | 4.55 (2)† | 0.67 (4)† | 4.55 (2)† | 16.3 (16) | 4.50 (16) | | | 10.83 | 20.8 |
| | HCl 2 N | 0.49 (16) | 0.36 (16) | 4.00 (4)† | 2.75 (16) | 4.7 (4)† | 8.0 (4)† | 2.35 (6)† | | | 12.30 | 10.35 |
| | HCl 4 N | 0.25 (8)† | 0.64 (16) | 3.76 (16) | 0.65 (2)† | 4.55 (8)† | 30.7 (8)† | 4.40 (2)† | | | 9.85 | 35.1 |
| | MeOH/HCl 0.5 N, 24 hr | 0.12 | 0.10 | 3.02 | 0.50 | 2.61 | 1.59 | 1.62 | 1.90 | | 6.35 | 3.2 |
| <i>Tevnia jerichonana</i> | TFAA 4 N | 0.17 (16) | 0.33 (16) | 0.62 (2)† | 0.03 (2)† | 1.22 (8)† | 15.0 (16) | 1.0 (4)† | | | 3.37 | 16.0 |
| | HCl 2 N | 0.16 (16) | 0.50 (16) | 0.70 | - | 2.30 (16) | 5.40 (4)† | 0.60 (16) | | | 3.66 | 6.0 |
| | HCl 4 N | 0.32 (8)† | 0.53 (8)† | 0.87 (16) | - | 1.10 (16) | 31.7 (8)† | 0.94 (8)† | | | 2.82 | 32.64 |
| | MeOH/HCl 0.5 N, 24 hr | 0.11 | 0.14 | 0.65 | 0.12 | 0.80 | 2.44 | 0.46 | 0.46 | | 1.82 | 2.9 |

*Numbers in parentheses correspond to the duration of hydrolysis.

†A similar value is obtained after a prolonged time of hydrolysis.

‡Total destruction of the sugar after this time.

As for *Riftia*, *Tevnia*'s tubes were characterized by the presence of an important quantity of *N*-acetylglucosamine which represents practically all of the carbohydrate material. Eventually, we observed that fucose contributes more than half (2%) of the neutral monosaccharides (3.6%). The two vestimentiferans possess a high concentration of *N*-acetylglucosamine corresponding to chitin as reported by Gaill and Hunt (1986) and Gaill *et al.* (1989). The centesimal compositions of the other monosaccharides are rather different.

Table 5 gives the results of the monosaccharide identification of *Paraalvinella*'s and *Alvinella pompejana*'s tubes. In both cases, the presence of high concentrations of minerals which interfere in the trimethylsilylation step do not allow us to estimate the centesimal composition of monosaccharides freed by methanolysis. Nevertheless, with this technique, it is possible to identify all the monosaccharides. In this way, we have identified, in the two samples, five major neutral monosaccharides: xylose, fucose, galactose, mannose and glucose and two minor ones: rhamnose and ribose; two *N*-acetylosamine: *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine and one uronic acid: glucuronic acid. By acid hydrolysis of the two samples (Table 6) we did not observe the presence of rhamnose and ribose. It is worth noticing that acid hydrolysis of the *Paraalvinella* sp. mucus does not quantitatively release the neutral monosaccharides (3.18% with HCl 4 N, 4 hr, 100°C) in comparison with the results obtained by colorimetric determination (4.5%). On the contrary, we observed a good recovery for *N*-acetylosamines (0.30% obtained with HCl and TFAA). The main monosaccharide freed from this sample was fucose which represented 40% of neutral monosaccharides.

However, for *Alvinella*'s tube we also observed a difference in the centesimal composition of neutral sugar obtained by the colorimetric method (3.5%) and by chromatographic techniques after acid hydrolysis (0.81 and 0.92% with TFAA and HCl, respectively). These differences can be due to the presence of high concentrations of minerals and the non-estimation in gas-liquid chromatography determination of three neutral monosaccharides which have chromatographic mobilities close to fucose (X1, X2, X3 compounds, Fig. 1). In this connection, components with high chromatographic mobilities (X4, X5, X6 compounds) have been visualized by paper chromatography of monosaccharides freed from *Mixicola* tubes by Defretin *et al.*, 1949; Defretin, 1971). This author suggests that these monosaccharides are methyl pentoses or/and bis-oxyhexoses.

As for *Paraalvinella*'s mucus, the centesimal composition of osamines from *Alvinella*'s tubes obtained by the Elson-Morgan assay and by chromatographic determination (after hydrochloric acid hydrolysis) are in good accordance (0.2% in both cases). At last, the two acids (TFAA, HCl) release quite the same quantities of each neutral monosaccharide. We also observed the destruction of xylose by hydrochloric acid and the identification of two major monosaccharides: glucose and fucose which represented 60 and 27% of the total neutral monosaccharides respectively.

Table 5. Identification of monosaccharides liberated from the tube of *Alvinella pompejana* and from *Paraalvinella*'s mucus by methanolysis and comparison with the carbohydrate composition of several tubicolous annelid worm mucins obtained after acid hydrolysis

| | <i>Alvinella pompejana</i> * | <i>Paraalvinella</i> sp.* | <i>Myxicola infundibulum</i> † | <i>Hyalinoecia tubicola</i> ‡ | <i>Sabella pavonina</i> † | <i>Spirographis spallanzani</i> ‡ | <i>Pectinaria koreni</i> † | <i>Lanice conchilega</i> † |
|-----------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Mannose | + | + | + | - | + | + | - | - |
| Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Galactose | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Arabinose | - | - | + | - | + | + | + | + |
| Ribose | + | + | + | - | - | - | + | - |
| Xylose | + | + | - | - | + | + | - | - |
| Fucose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Rhamnose | + | + | + | - | + | + | - | - |
| Levulose | - | - | + | - | - | - | + | + |
| Glucuronic acid | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Osamines | +§ | +§ | + | +¶ | - | + | - | - |

*Our data.

†Defretin R. (1971).

‡Defretin *et al.* (1949), Defretin (1971), Pautard and Zola (1967).

§*N*-Acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine; ||, glucosamine; ¶ glucosamine and *N*-acetylglucosamine.

Table 6. Centesimal composition of monosaccharides released from *Paraalvinella*'s mucus and from *Alvinella pompejana*'s tube by acid hydrolysis (determined as polyol acetates)

| | Acid | Monosaccharides | | | | | | GalN | Total neutral sugars | Total hexosamines |
|----------------------------|----------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|----------------------|-------------------|
| | | Man | Glc | Gal | Xyl | Fuc | GlcN | | | |
| <i>Paraalvinella</i> sp. | TFAA 4 N, 4 hr | 0.17 | 1.09 | 0.30 | 0.19 | 1.36 | 0.20 | 0.07 | 3.11 | 0.27 |
| | HCl 4 N, 4 hr | 0.25 | 1.11 | 0.31 | - | 1.51 | 0.26 | 0.09 | 3.18 | 0.35 |
| <i>Alvinella pompejana</i> | TFAA 4 N, 4 hr | 0.07 | 0.38 | 0.06 | 0.05 | 0.25 | 0.06 | 0.03 | 0.81 | 0.09 |
| | HCl 4 N, 4 hr | 0.05 | 0.56 | 0.06 | - | 0.25 | 0.13 | 0.07 | 0.92 | 0.20 |

DISCUSSION

The aim of our work was to clarify the biochemical nature of the tubes from *Riftia pachytila*, *Tevnia jerichonana*, *Alvinella pompejana* and the mucus of *Paraalvinella* sp.

The tubes of vestimentiferans were characterized by both a high concentration of *N*-acetylglucosamine and protein material which were equivalent in quantities and made up to 70% of *Riftia*'s and *Tevnia*'s tubes. The estimation of supplementary amino acids in their tubes do not modify conclusions obtained by

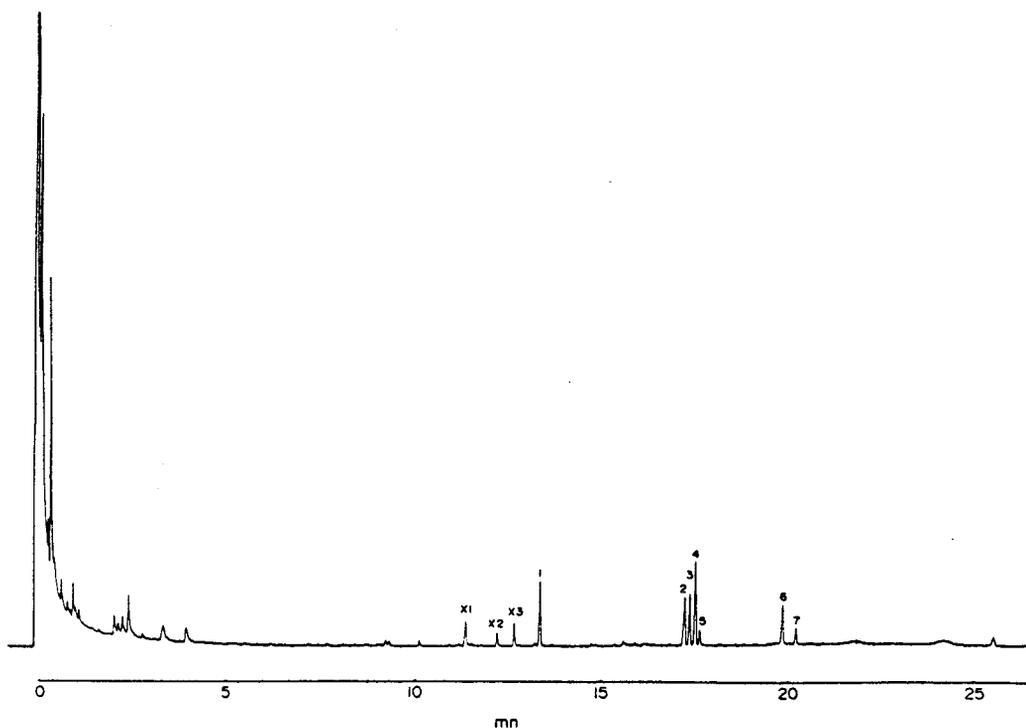


Fig. 1. Gas-liquid chromatography (capillary column OV 101, oven temperature programmed from 110 to 240°C at 3°C/min) of alditol acetates obtained after acid hydrolysis, reduction and peracetylation from the tube of *Alvinella pompejana* X1, X2, X3: unidentified monosaccharides; 1: fucitol, 2: meso inositol (internal standard), 3: mannitol, 4: glucitol, 5: galactitol, 6: glucosaminitol, 7: galactosaminitol.

Gaill and Hunt (1986): the two vestimentiferans are close to pogonophorans on the basis of amino acid composition. The high proportion of *N*-acetylglucosamine determined by colorimetric and chromatographic methods has to be attributed to the chitinous material already reported by Gaill and Hunt (1986) for *Riftia pachyptila*'s tubes and by Gaill *et al.* (1989) for *Tevnia jerichonana*. The presence of chitin has also been reported for tubes of pogonophorans and particularly for three species of *Siboglinum* and for *Zenkevitchiana longissima* (Brunet and Carlisle, 1958). Foucart *et al.* (1965) have determined 33% of chitin for one species of *Siboglinum*. The comparison of our results on the *N*-acetylglucosamine determination of *Riftia*'s tubes (30% by colorimetric and chromatographic techniques) with those obtained by Gaill and Hunt (1986) on the chitin determination (20% by gravimetric method after potassic hydrolysis) indicates that all *N*-acetylglucosamine residues do not only come from chitin. We identified neutral sugars (12%) in the tube of *Riftia*, but in a higher proportion than was reported by Gaill and Hunt (1986) (3.2%). Moreover, we also characterized a neutral sugar in *Tevnia*'s tubes and for the first time, glucuronic acid, in the tubes of these vestimentiferans.

Glucuronic acids in vestimentiferans could be due to the presence of proteoglycan which together with chitin are responsible for the tube's structuration. No data reports the presence of other carbohydrates than glucosamine in the tubes of pogonophorans. Unfortunately, we have insufficient data to compare vestimentiferans compositionally with pogonophoran species from non-deep sea hydrothermal sites, so we cannot link up carbohydrate composition and animal classification.

For *Alvinella pompejana*, we noticed, as have other authors (Vovelle and Gaill, 1986) the organo-mineral nature of tubes. We can point out the high amount of proteins and the paucity of the three classes of monosaccharides: neutrals, hexosamines and uronic acids. Actually, we do not know if either this carbohydrate moiety is covalently bound to the proteins forming glycoproteins or if it constitutes a free polysaccharide. The tube of *Alvinella* is not easy to study because of the difficulty to separate the constituents. However, we can observe that the carbohydrate moiety possesses a large amount of "hydrophobic sugars": fucose and X1, X2, X3 compounds which are probably methylated sugars according to their chromatographic mobilities. This result, in addition with the positive amino-acid hydrophobic index determined by Gaill and Hunt (1986) suggests non-aqueous stabilizing interactions in the tube.

Mucus from *Paraalvinella* is contaminated by the hydrothermal environment as we can observe with the presence of sulfur and minerals and the variation in percentage of the organic fraction as demonstrated by Juniper *et al.* (1986). We also noticed, for the organic part of mucus (10%) the high proportion of carbohydrate and particularly neutral sugars. More than 50% of this organic fraction was constituted by carbohydrate explaining the slimy property of this mucus which protects the annelid. Finally, the carbohydrate composition of the two hydrothermal polychaetes does not present major differences with

the carbohydrate moiety of tubiculous annelid worms living in more common environments (Table 5).

Acknowledgements—This investigation was supported by a grant (to F.T.) from the Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer (IFREMER, Centre de Brest), the Conseil Régional de Bretagne, and by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche No. 111, Directeur J. Montreuil).

The Authors thank Colette Brassard for skilful technical assistance in amino acid determinations and Jean Guezennec for supplying the samples.

REFERENCES

- Alayse-Danet A. M., Gaill F. and Desbruyères D. (1985) Preliminary studies *in situ* on the relationship between the Pompeii worm (Polychaeta, Ampharetidae) and its epibiotic bacteria. In Proceedings of XIXth European Marine Biology Symposium (Edited by Gibbs P. A.), pp. 167-172. University Press, Cambridge.
- Bidlinmeyer B. A., Cohen S. A. and Tarvin T. L. (1984) Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *J. Chromat.* **336**, 93-104.
- Brunet P. C. P. and Carlisle D. B. (1958) Chitin in Pogonophora. *Nature, Lond.* **182**, 1889.
- Defretin R., Biserte G. and Montreuil J. (1949) Caractérisation des constituants d'une mucoprotéine dans les tubes des polychètes Onuphis et Spirographis. *C. r. Séanc. Soc. Biol.* **143**, 1208-1210.
- Defretin R. (1971) The tubes of polychaete annelids. In *Comprehensive Biochemistry* (Edited by Florkin M. and Stotz E. H.), Vol. 26C, pp. 713-745. Elsevier, Amsterdam.
- Desbruyères D. and Laubier L. (1980) *Alvinella pompejana* gen. sp. nov., Ampharetidae aberrant des sources hydrothermales de la ride East-Pacifique. *Oceanol. Acta.* **3**, 267-274.
- Desbruyères D. and Laubier L. (1982a) *Paraalvinella graslei*, new genus, new species of Alvinellidae (Polychaeta: Ampharetidae) from the Galapagos rift geothermal vents. *Proc. Biol. Soc. Wash.* **93**, 484-494.
- Desbruyères D., Crassous P., Grassle J., Kripounoff A., Reys D., Rio M. and Van Praet M. (1982b) Données écologiques sur un nouveau site d'hydrothermalisme actif de la ride Pacifique Oriental. *C. r. Acad. Sc. Paris.* **298** (série III), 489-494.
- Desbruyères D., Gaill F., Laubier L., Prieur D. and Rau G. H. (1983) Unusual nutrition of the "Pompeii worm" *Alvinella pompejana* (polychaetous annelid) from a hydrothermal vent environment: SEM, TEM, ¹³C and ¹⁵N evidence. *Mar. Biol.* **75**, 201-205.
- Desbruyères D., Gaill F., Laubier L. and Fouquet Y. (1985) Polychaetous annelids from hydrothermal vent ecosystems: an ecological overview. *Biol. Soc. Bull. Wash.* **6**, 103-116.
- Dische Z. (1947) A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. biol. Chem.* **167**, 189-198.
- Elson L. A. and Morgan W. T. J. (1933) Colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.* **27**, 1824-1828.
- Foucart M. F., Bricteux-Grégoire S. and Jeuniaux C. (1965) Composition chimique d'un tube d'un Pogonophore (*Siboglinum* sp.) et des formations squelettiques de deux Pterobranches. *Sarsia* **20**, 35-41.
- Gaill F. and Hunt S. (1986) Tubes of deep sea hydrothermal vent worms *Riftia pachyptila* (Vestimentifera) and *Alvinella pompejana* (Annelida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **34**, 267-274.
- Gaill F. (1988) L'*Alvinella pompejana* des sources hydrothermales est-elle un organisme thermophile? *Oceanis* **14**, 595-601.

- Gaill F., Chanzy H. and Vuong R. (1989) Structural organisation and localisation of the β chitin secreted by deep sea hydrothermal vent worms. *Biol. Cell.* **66**, 8a.
- Jones M. L. (1981a) *Riftia pachyptila* Jones: observation on the Vestimentiferan worm from the Galapagos rift. *Science* **213**, 333-336.
- Jones M. L. (1981b) *Riftia pachyptila*, new genus, new species, the Vestimentiferan worm from the Galapagos rift geothermal vents Pogonophora. *Proc. Biol. Soc. Wash.* **93**, 1295-1313.
- Jones M. L. (1985) The Vestimentiferan, new genus, six new species and other taxa from hydrothermal vents and elsewhere. *Bull. Biol. Soc. Wash.* **6**, 117-158.
- Juniper S. K., Thomson J. A. J. and Calvert S. E. (1986) Accumulation of minerals and trace elements in biogenic mucus at hydrothermal vents. *Deep Sea Res.* **33**, 339-347.
- Kamerling J. P., Gerwig G. J., Vliegenthart J. F. G. and Clamp J. R. (1975) Characterization by gas liquid chromatography-mass spectrometry and proton magnetic resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochem. J.* **151**, 491-495.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265-273.
- Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G. and Strecker G. (1986) Glycoproteins. In *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach* (Edited by Chaplin M. F. and Kennedy J. F.), pp. 143-204. IRL Press, Oxford, WA.
- Pautard F. G. E. and Zola H. (1967) Studies of onuphic acid. Part II: the phosphorus and the monosaccharide components. *Carbohydr. Res.* **3**, 271-282.
- Rimington C. (1931) The carbohydrate complex of serum proteins. II: improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of ox blood. *Biochem. J.* **25**, 1062-1071.
- Somero G. N., Siebenaller J. F. and Hockachka P. W. (1983) Biochemical and physiological adaptations of deep-sea animals. In *The Sea* (Edited by Rowe G. T.), Vol. 8, pp. 261-330. John Wiley & Sons, NY.
- Tillmans J. and Philippi K. (1929) Über den Gehalt der wichtigsten Protein der Nahrungsmittel an Kohlehydrate and über ein Kolorimetrisches verfahren zur quantitativen Bestimmung von stickstoffreiem Zucker in Elweiss. *Biochem. Z.* **215**, 36-60.
- Vovelle J. and Gaill F. (1986) Données morphologiques et microanalytiques sur l'élaboration du tube organominéral d'*Alvinella pompejana*, Polychaete des sources hydrothermales, et leurs implications phylogénétiques. *Zool. Script.* **15**, 33-43.

1.3. Conclusion.

Les deux Vestimentifères excrètent des tubes dont les constituants glucidiques et protéiques sont en proportions égales. Ces tubes sont très peu contaminés par le milieu hydrothermal. La composition en glucides ne se limite pas à la présence de glucosamine (sous forme de chitine). On peut, en effet, observer la présence de concentrations importantes en oses neutres et acides. Cette dernière classe d'oses contribue sans doute, avec la chitine, aux propriétés de résistance mécanique des tubes.

Les tubes des deux Annélides Polychètes sont fortement contaminés par les émanations des cheminées hydrothermales. La fraction organique du mucus de *Paraalvinella* sp. ne représente que 10 % du total. Cette fraction est composée de 60 % de glucides et de 40 % de protéines. Le tube d'*Alvinella pompejana* est de nature organominérale. La fraction organique, qui représente 37,7 %, du tube est principalement constituée par des protéines. Des études similaires concernant les compositions en glucides de tubes d'Annélides Polychètes de milieux "plus classiques" (*Myxicola*, *Sabella*, *Spirographis*) ont été menées, dès 1949 (Defretin et al., 1949) par Defretin (1951, 1971). Cet auteur a fait les observations suivantes (Tableau II^{*}, p. 58) :

- Les tubes contiennent des proportions importantes de glucides : 30 % pour *Myxicola*, 15 % pour *Sabella* et *Spirographis*.

- Les tubes possèdent des compositions glucidiques équivalentes pour leurs fractions non dialysables, solubles et insolubles.

- La quantité d'acides uroniques est très élevée pour le tube de *Myxicola*.

Tableau II* : Composition en sucre des fractions non-dialysables solubles et insolubles provenant des tubes des Annélides Polychètes Myxicola, Sabella, et Spirographis (Defretin, 1971), (en g pour 100 g de produit sec).

| Espèces | Fraction soluble | | | | | | Fraction insoluble | | | | | |
|----------------------|--------------------|---------------------|----------------|--|---------------------------------------|--|--------------------|---------------------|----------------|--|---------------------------------------|--|
| | Glucides totaux | Acides uroniques | ose- amines | Glucides totaux/ acides uroniques | Glucides totaux/ ose- amines | acides uroniques/ ose- amines | Glucides totaux | acides uroniques | ose- amines | Glucides totaux/ acides uroniques | Glucides totaux/ ose- amines | Acides uroniques/ ose- amines |
| <u>Myxicola</u> | | | | | | | | | | | | |
| Tube entier | 16.47 | 11.7 | 3.56 | 1.40 | 4.62 | 3.28 | 14.72 | 9.1 | 3 | 1.61 | 4.90 | 3.03 |
| <u>Sabella</u> | | | | | | | | | | | | |
| Tube entier | - | - | - | - | - | - | 6.84 | 3.05 | 2.1 | 2.24 | 3.26 | 1.45 |
| Partie supérieure | 6.92 | 3.05 | 2 | 2.26 | 3.46 | 1.53 | 7.02 | 3.20 | 2 | 2.20 | 3.51 | 1.60 |
| <u>Spirographis</u> | | | | | | | | | | | | |
| Tube entier | 11.45 | - | 3.12 | - | 3.67 | - | 5.15 | 3.37 | 1.30 | 1.82 | 3.90 | 2.60 |
| Partie supérieure | 10.80 | 4.2 | 2.55 | 2.57 | 4.20 | 1.64 | 8.29 | 5.60 | 3.85 | 1.48 | 2.15 | 1.47 |

- Il n'y a pas de différence de composition entre le tube entier et la partie supérieure du tube de *Myxicola*.

- Pour les trois espèces la proportion de galactose est très élevée.

- Des monosaccharides inconnus qui migrent plus vite que le fucose ont été visualisés par chromatographie sur papier (Figure 9*, p. 60 ; Defretin, 1951, 1971). L'auteur, en fonction de leurs migrations chromatographiques, a supposé que ces monosaccharides étaient des méthylpentoses ou des bis-déoxyhexoses.

Les résultats de Defretin (1951, 1971) sont à mettre en rapport avec ceux concernant la fraction glucidique, mineure, d'*Alvinella pompejana* qui contient pour une part importante des monosaccharides qui n'ont pas été identifiés et que nous nous proposons d'étudier dans le chapitre suivant.

2. Isolement et caractérisation de monosaccharides méthylés extraits du tube d'*Alvinella pompejana*.

2.1. Introduction.

L'analyse du tube d'*Alvinella pompejana* a permis de mettre en évidence la présence de 3 monosaccharides inconnus que nous avons nommés X_1 , X_2 , X_3 (Talmont and Fournet, 1990). Ces monosaccharides ont des temps de rétention (analyse en CPG sous forme d'acétates d'alditols) inférieurs à celui du fucose. Nous avons poursuivi les travaux, en isolant (à partir du tube entier) et en caractérisant ces monosaccharides.

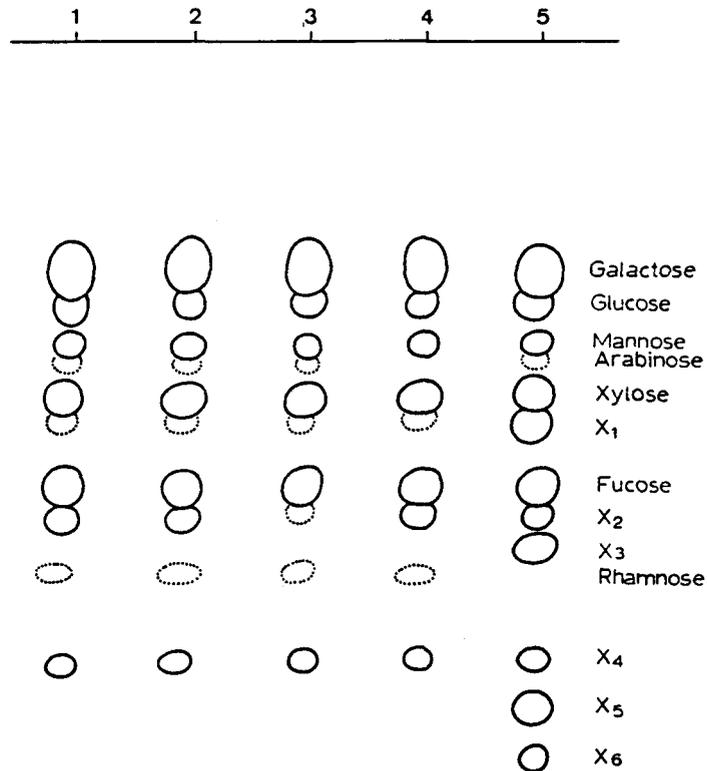


Figure 9* : Chromatographie de partage sur papier des monosaccharides de la fraction glucidique neutre des tubes de *Sabella*, *Spirographis* et *Myxicola* (Defretin, 1971).

1- Tube entier de *Sabella*.

2- Partie supérieure du tube de *Sabella*.

3- Tube entier de *Spirographis*.

4- Tube raclé de *Spirographis*.

5- Tube entier de *Myxicola*.

Solvent : n-butanol - acide acétique - eau (4-1-5)

(Partridge et Westall, 1948).

Révéléteur : acide oxalique-aniline (Partridge, 1959).

X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ : monosaccharides inconnus.

2.2. Article 2

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF METHYLATED SUGARS FROM
THE TUBE OF THE HYDROTHERMAL VENT TUBICULOUS ANNELID WORM
ALVINELLA POMPEJANA

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF METHYLATED SUGARS FROM THE TUBE OF
THE HYDROTHERMAL VENT TUBICULOUS ANNELID WORM *ALVINELLA POMPEJANA*

Franck TALMONT¹ and Bernard FOURNET^{2*}

1-IFREMER, Centre de Brest, B.P.70, 29267 Plouzané, France.

2-Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique, N°111), Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

* Author to whom correspondence should be adressed.

Abbreviations : TFA : trifluoroacetic acid, GLC : gas-liquid chromatography, GLC-MS : gas-liquid chromatography-mass spectrometry, MeOH/HCl : methanol chloride.

Keywords : Hydrothermal vents; Methylated monosaccharides; (*Alvinella pompejana*)

ABSTRACT

The tube of *Alvinella pompejana* contains in its carbohydrate fraction, three methylated monosaccharides : 2-mono-O-methyl-L-fucose, 3-mono-O-methyl-L-fucose and 2,4-di-O-methyl-L-fucose. The present work appears to be the first report of the occurrence of 2-mono-O-methyl-L-fucose and 3-mono-O-methyl-L-fucose in the animal kingdom. Moreover, it is the first time that 2,4-di-O-methyl-L-fucose is found in nature.

1. INTRODUCTION

Alvinella pompejana [1], the Pompeii worm, is a polychaetous annelid found strictly around deep sea hydrothermal vents, at a depth of 2600 m. It lives in very exceptional conditions (high temperatures, high pressures, metal rich water), in tubes directly secreted on the white smokers whose temperature can reach 250°C, while the surrounding water is 2°C. The tube is built out of organomineral material where minerals reach 45 % of the total [2]. The carbohydrate part of the tube is made, in a large amount, of unknown sugars which are probably methylated sugars according to their chromatographic mobilities. This kind of sugar is rare in nature. We report, here, the isolation and the characterization of three neutral methylated sugars from the tube of *Alvinella pompejana*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Biological material*

Tubes from *Alvinella pompejana* were collected at 2600 m depth by the submersible *Cyana* in April 1984 during the Biocyarise cruise (12°48'N, 103°56'W). Tubes were preserved in formol. They were rinsed and air dried before experiments.

2.2. *Monosaccharide determinations*

Monosaccharide determinations were carried out after methanolysis (MeOH/HCl 0.5 N, 24 h, 80°C) by gas-liquid chromatography of pertrimethyl-silylated methylglycosides [3,4] and after hydrolysis (TFA 4 N, 4 h, 100°C), reduction with potassium borohydride, peracetylation (pyridine/acetic anhydride, v/v) and gas-liquid chromatography of alditol acetates.

2.3. *GLC analysis*

GLC was done with a Girdel serie 300 or Spectra-Physics model 7100 gas chromatographs fitted with a flamme-ionisation detector. A capillary column (0.3 mm inner diameter x 25 m) fused silica OV 101 was used with the following temperature programs : (a) alditol acetates, 110°C-240°C at 3°C/min ; (b) pertrimethylsilylated methyl and butyl-glycosides, 120°C-240°C at 2°C/min ; (c) permethylated sugars, 110°C-180°C at 2°C/min. Nitrogen was the carrier gas at 0.5 atm.

2.4. Methylated monosaccharides isolation

Tubes were reduced into powder, treated with chloroform (10 ml), and sonicated (three times). After centrifugation (10000 g, 5 min), the dry pellet was treated with TFA 2 N, 2 h at 100°C. After cooling, the hydrolysate was centrifuged for 15 min at 10000 g. The hydrolysate was evaporated under pressure with methanol to remove the acid. The extract was dissolved in distilled water and passed through a column of Dowex 50x8 resin (200-400 mesh, H⁺ form, 20x2 cm) coupled with a column of Dowex 1x8 resin (200-400 mesh, CH₃COO⁻ form, 20x2 cm) and the eluate was freeze dried. Preparative paper chromatography was carried out on Whatman N°3 paper with n-butanol/acetic acid/water (4/1/5) as solvent [5]. Sugars were visualized with anilin oxalate [6].

2.5. Dealkylation of methylated sugars [7,8]

The experiments were performed on acetylated sugars in order to increase their solubilities in the reaction medium. The dry sugar (1 mg) is dissolved in 0.5 ml of pyridine and 0.5 ml of acetic anhydride during 24 h at room temperature. After elimination of the solvents under a stream of nitrogen, the acetylated sugar is dissolved in 0.5 ml of dichloromethane, and boron tribromide (50 µl) is added. After remaining 2 min at room temperature, the mixture is evaporated to dryness. The product is deacetylated by treatment with sodium methoxide in methanol (15 min). After acidification with Dowex 50x8 (20-50 mesh, H⁺ form), water is added and the resin is removed by filtration. Evaporation of the filtrate gives the free sugar.

2.6. GC-MS analysis

Capillary GC-MS was carried out with a Riber-Mag R10-10 (Rueil Malmaison, France) mass spectrometer using a capillary column of silicone OV 101 (0.3 mm inner diameter x 30 m). For analysis of alditol acetates, pertrimethyl-silylated methyl and butyl-glycosides or permethylated sugars, a program of 100 to 240°C (3°C/min) was used. Compounds were characterized by electron impact and chemical ionization (ammonia) mass spectroscopy.

2.7. Methylation analysis

Permethylation of free sugars obtained by paper chromatography was carried out on methylglycosides (MeOH/HCl 0.5 N, 24 h, 80°C) in dimethylsulfoxide solution using sodium hydroxyde and methyl iodide as reagents [9]. To a solution of the methylglycoside (1 mg) in dimethylsulfoxide (0.5 ml), was added finely powdered NaOH (5 mg) and methyl iodide (0.5 ml). The mixture was sonicated for 1 h. The reaction was stopped by addition of water (10 ml) and crystals of sodium thiosulfate were added to decolorize the solution. The fully methylated sugar was extracted with chloroform (3x1 ml). The chloroform extract was washed 10 times with 20 ml of water dried with anhydrous sodium sulfate and finally evaporated under a stream of nitrogen.

2.8. Absolute configuration of sugars

A solution of the demethylated methylglycoside in (-)-2-butanol and a catalytic amount of trifluoroacetic acid was kept at 80°C overnight and then concentrated [10]. The resulting butylglycoside is pertrimethylsilylated [11] and analysed by gas liquid chromatography.

3. RESULTS

Since the tube of *Alvinella pompejana* contains sulfur [2,12], it has been removed with chloroform. 2 g of tubes, reduced into powder, were treated with chloroform. After extraction of sulfur, we obtained 1.9 g of tubes which was hydrolysed with TFA 2 N for 2 h at 100°C. After centrifugation of the solution the supernatant was reduced under vacuum and freeze dried. The hydrolysate was desionized on Dowex columns and the unknown sugars were isolated by preparative paper chromatography on Whatman N°3 paper in Partridge solvent [5] (Fig.1). We can observe 3 monosaccharides (X_1 , X_2 , X_3) which move faster than fucose. Their R_{fuc} values are : $R_{fuc} X_1 = 2.05$; $R_{fuc} X_2 = 1.6$; $R_{fuc} X_3 = 1.4$. The preparative paper chromatography yielded 3.5 mg of X_1 , 1.2 mg of X_2 and 2.7 mg of X_3 , from 28 mg of starting material. The three compounds were converted into alditol acetates for GLC and GLC-MS studies since alditol acetates have relatively simple fragmentation patterns [13,14,15]. Mass spectra of alditol acetates from each unknown sugar and their fragmentations (electron impact mode) schemes are given in Fig.2. GLC-MS of the alditol acetate derivative of X_1 sugar gave primary fragments at m/z 117, 131, 233 and 247 allowing to establish the sugar as a 2,4 di-O-methyl-6- deoxy-hexose. GLC-MS of the alditol acetate derivative of X_2 sugar gave major primary fragments at m/z 117 and 275 allowing to establish this alditol acetate as a 2-O-methyl-6-deoxy-hexitol. From the fragmentation scheme of the alditol acetate derivative of X_3 sugar, we observe two primary fragments m/z 203 and m/z 189. By elimination of acetic (mol. wt. = 60) and a subsequent loss of ketene (mol. wt. = 42) secondary fragments m/z 143 and m/z 101 arise from the primary fragment m/z 203.

In analogy, secondary fragments m/z 129 and m/z 87 arise from the primary fragment m/z 189. This mass spectrometric analysis thus allows the identification of the X_3 unknown sugar as a 3-O-methyl-6-deoxy-hexose. The mass spectrum in a chemical ionization mode confirm the mono-O-methyl-6-deoxy-hexose nature for X_2 and X_3 sugars ($M+NH_4^+ = 366$, under peracetylated form) and the di-O-methyl-6-deoxy-hexose nature for X_1 sugar ($M+NH_4^+ = 338$, under peracetylated form).

Demethylation of each sugar with boron tribromide, followed by methylglycosylation and trimethylsilylation allows to identify (by GLC-MS) each sugar as a methyl fucoside. These results were confirmed by the identification, by GLC-MS of the permethyl derivatives obtained after permethylation of each sugar. For all components, we identify the 2,3,4-tri-O-methyl fucoside. Absolute configuration of demethylated sugars have been determined by GLC and GLC-MS using a chiral alcohol. The three sugars, analysed as butyl-pertrimethylsilylated glycosides have the same retention time as L-fucose.

In conclusion, we have identified in the tube of *Alvinella pompejana*, the three unknown sugars as : X_1 : 2,4-di-O-methyl-L-fucose, X_2 : 2-mono-O-methyl-L-fucose, X_3 : 3-mono-O-methyl-L-fucose.

4. DISCUSSION

Naturally occurring methyl ether of sugars are relatively rare in nature. 3-O-methyl-fucose (digitalose) is known as a constituent of cardiac glycosides [16], as a free sugar from the brown seaweed *Desmaresta acateata* [17], in glycolipids from shellfishes [18,19,20] and from *Mycobacterium* [21]. The configuration of the sugar from the last three sources was not determined. The L configuration of 3-O-methyl-fucose was found as constituent of *Rhizobium* extracellular polysaccharides [22]. 2-O-methyl-fucose has been identified in *Desmaresta acateata* [17], in glycolipids from *Mycobacterium* [21,23]. L isomer of 2-O-methyl-fucose was found in lipopolysaccharides from photosynthesis prokaryotes [24]. The present work appears to be the first report of the occurrence of 2-O-methyl-L-fucose and 3-O-methyl-L-fucose in the animal kingdom. 3-O-methyl-fucose was found in glycolipids from *Corbicula sendai* [18], from oyster gills [19] and from *Hyriopsis schlegelii* [20] but the authors did not argue whether it was D or L-isomer. Moreover, it is the first time that 2,4 di-O-methyl-L-fucose is found in nature. The D configuration of this sugar was found in the antibiotic Labilomycin [25]. 2,4 di-O-methyl-fucose was found in glycolipid from *Mycobacterium avium* [26], but the anomeric configuration was not determined.

Unknown sugars, with high paper chromatographic mobilities, have already been reported in the tube of a non deep-sea polychete annelid *Myxicola infundibulum* [27]. But the nature of the sugars was not determined.

REFERENCES

- [1] Desbruyères, D., and Laubier, L. (1980) *Oceanol. Acta* 3, 267-274.
- [2] Talmont, F., and Fournet, B. (1990) *Comp. Biochem. Physiol.* 96B, 753-759.
- [3] Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, J.F.G., and Clamp, J.R. (1975) *Biochem. J.* 151, 491-495.
- [4] Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., and Strecker, G. (1986) in *Carbohydrate analysis : a practical approach* (Chaplin, M.F., and Kennedy, J.F., eds) pp. 143-204, I.R.L. Press, Oxford, Washington D.C.
- [5] Partridge, S.M., and Westall, R.G. (1948) *Biochem. J.* 42, 238-250.
- [6] Partridge, S.M. (1959) *Nature* 164, 443.
- [7] Bonner, T.G., Bourne E.J., and Mc Nally, S. (1960) *J. Chem. Soc.*, 2929-2934 .
- [8] Saier Jr, M.H., and Ballou, C.E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 992-1003.
- [9] Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) *Carbohydr. Res.* 131, 209-217.
- [10] Leontein, K., Lindberg, B., and Lonngren J. (1978) *Carbohydr. Res.* 62, 359-362.
- [11] Gerwig, J.G., Kamerling, J.P., and Vliegenthart, J.F.G. (1978) *Carbohydr. Res.* 62, 349-357.
- [12] Gaill, F., and Hunt, S. (1986) *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 34, 267-274.
- [13] Roppel, J., Mayer, H., and Weckesser, J. (1975) *Carbohydr. Res.* 40, 31-40
- [14] Lindberg, B. (1972) *Methods Enzymol.* 28, 178-195.

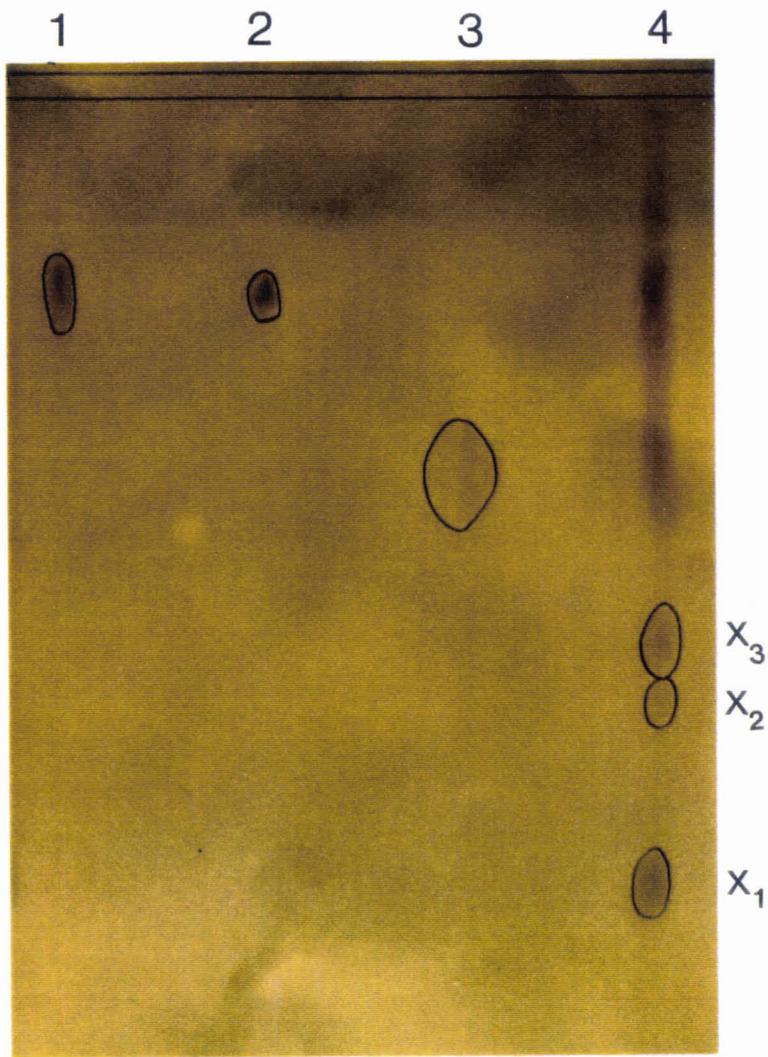
- [15] Lönngren, J., and Svensson, S. (1974) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 29, 41-106.
- [16] Kaufmann, H., Mühlradt, P., and Reichstein, T. (1967) *Helv. Chim. Acta* 50, 2287-2298.
- [17] Percival, E., and Young, M. (1974) *Carbohydr. Res.* 32, 195-201.
- [18] Itasaka, O. (1966) *J. Biochem.* 60, 435-438.
- [19] Hayashi, A., and Matsuura, F. (1976) *The International Symposium on Carbohydrate Chemistry*, Abstract p.85
- [20] Hori, T., Sugita, M., Ando, S., Kuwahara, M., Kumauchi, K., Sugie, E., and Itasaka, O. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10979-10985.
- [21] Gastambide-Odier, M., and Villé, C. (1970) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 679-693.
- [22] Kennedy, L.D. (1980) *Carbohydr. Res.* 87, 156-160.
- [23] Mc Lennan, A.P., and Randall, H.M. (1961) *Biochem. J.* 80, 309-317.
- [24] Weckesser, J., Drews, G., and Mayer, H. (1979) *Ann. Rev. Microbiol.* 33, 215-239.
- [25] Akita, E., Maeda, K., and Omezawa, H. (1964) *J. Antibiot.* 17, 37-38.
- [26] Mc Neil, M., Chatterjee, D., Wu Hunter, S., and Brennan, P.J. (1989) *Methods Enzymol.* 179, 215-242.
- [27] Defretin, R. (1971) in *Comprehensive Biochemistry* (Florkin, M., and Stotz, E.H. eds) pp. 713-745, Elsevier, Amsterdam.

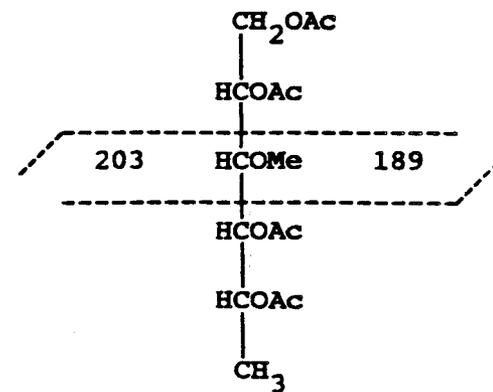
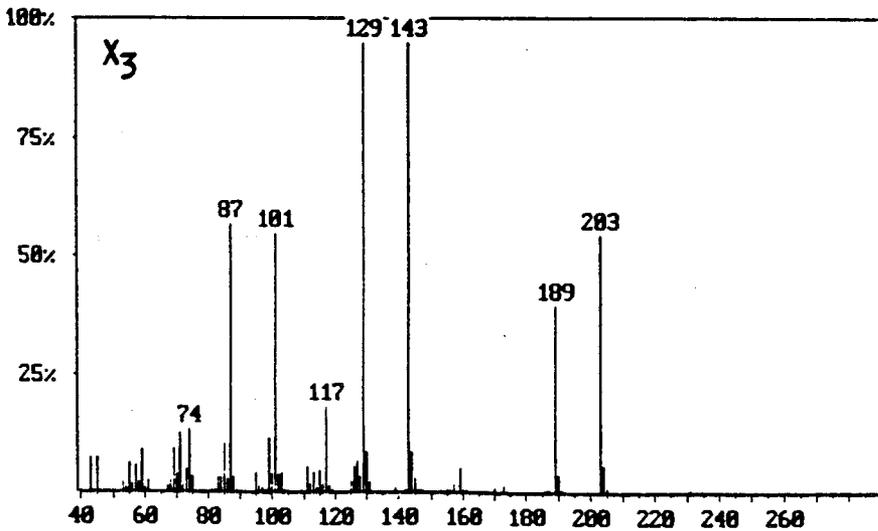
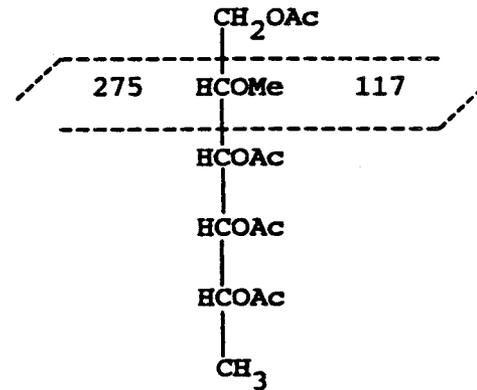
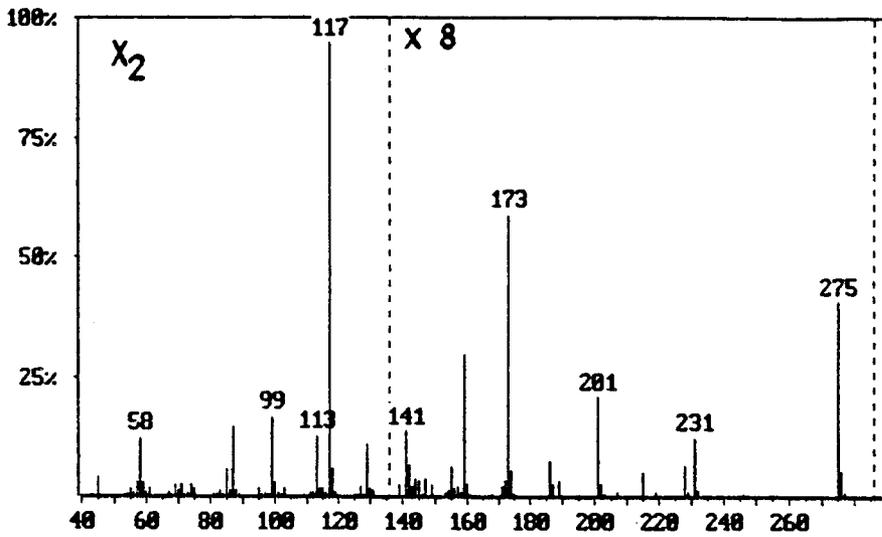
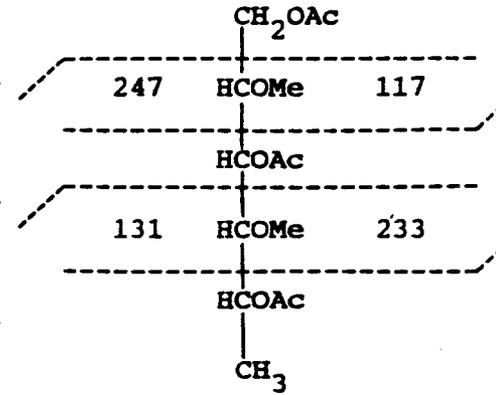
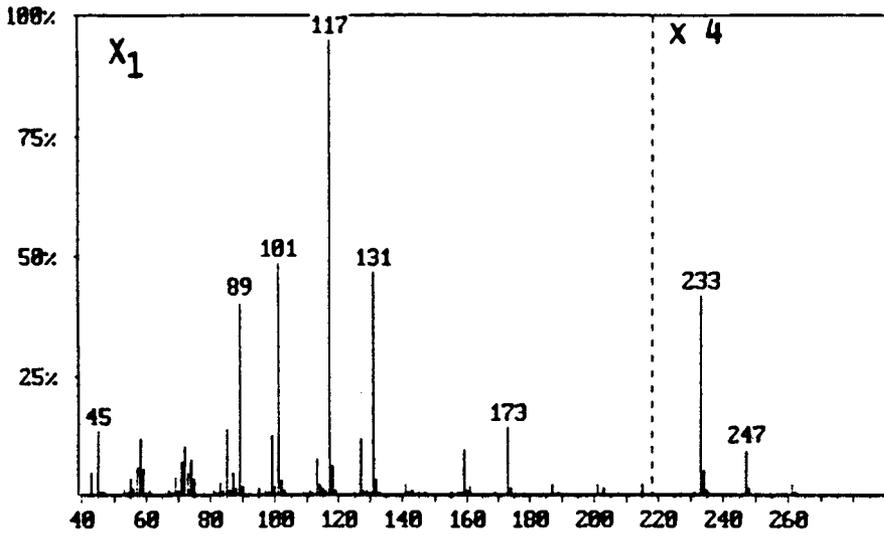
Aknowledgments- This work was supported by a grant (to F.T.) from the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) and the Conseil Régional de Bretagne, and by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche N°111, Directeur A. Verbert). We wish to thank Dr. Daniel Desbruyères (IFREMER Brest) for furnishing tubes.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1 : Paper chromatography in Partridge solvent [5], of monosaccharides obtained after acid hydrolysis of tubes . 1 : glucose, 2 : galactose, 3 : fucose, 4 : *Alvinella pompejana*'s tube hydrolysate (TFA, 2 N, 2 h), X₁ : 2,4-di-O-methyl-L-fucose, X₂ : 2-mono-O-methyl-L-fucose, X₃ : 3-mono-O-methyl-L-fucose.

Figure 2 : EI-mass spectra of alditol acetates from X₁, X₂, and X₃ sugars.





2.3. Conclusion : les sucres O-méthylés dans la nature.

Nous avons isolé, dans le tube d'*Alvinella pompejana*, 3 monosaccharides méthylés. Ce sont le 2-O-méthyl-L-fucose, le 3-O-méthyl-L-fucose et le 2,4-di-O-méthyl-L-fucose. Ces monosaccharides n'ont jamais été caractérisés dans le règne animal. Le 3-O-méthyl-fucose a bien été mis en évidence dans des glycolipides extraits : du crustacé *Corbicula sendai* (Itasaka, 1966), de branchies d'huitres (Hayashi et Matsuura, 1976), du bivalve *Hyriopsis schlegelii* (Hori et al., 1981), mais les configurations D ou L n'ont pas été déterminées. En ce qui concerne le 2,4-di-O-méthyl-L-fucose, ce monosaccharide n'a jamais été déterminé dans la nature. Par contre, l'isomère D de ce monosaccharide a été déterminé dans un antibiotique, la labilomycine (Akita, 1964). Enfin, du 2,4-di-O-méthyl-fucose a été mis en évidence dans un glycolipide extrait de *Mycobacterium avium* (Mc Neil et al., 1989), sans que la configuration du monosaccharide soit déterminée. Les monosaccharides méthylés sont caractéristiques des procaryotes photosynthétiques (Weckesser et al., 1977). Ces monosaccharides sont également présents dans les glycosides cardiaques (Reichstein and Weiss, 1962). Deux types de monosaccharides méthylés sont communs dans le règne végétal : ce sont le 3-O-méthyl-L-rhamnose et le 4-O-méthyl-D-acide glucuronique que l'on trouve dans la paroi végétale (Stephen, 1983). Des monosaccharides méthylés ont également été déterminés dans des polysaccharides extracellulaires de *Rhizobium* (Kennedy, 1979 ; Kenne and Lindberg, 1983), dans des glycolipides de mycobactéries, dans des polysaccharides d'algues, ainsi que dans certains antibiotiques. Nous avons rassemblé dans le Tableau III (p. 79) les différents types de monosaccharides O-méthylés présents dans la nature.

Tableau III : Type de monosaccharides O-méthylés présents dans la nature

Procaryotes photosynthétiques

| Sucres O-méthylés | Provenance | Référence |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Pentoses-O-méthylés | | |
| 2-O-méthyl-xylose | <i>Synechocystis</i> | Weckesser et al., 1979 |
| 3-O-méthyl-L-xylose | <i>Rhodopseudomonas viridis</i> | |
| 4-O-méthyl-D-xylose | <i>R. palustris</i> | |
| 3-O-méthyl-D-ribose | <i>Chromatium vinosum</i> | |
| 2,3,4-tri-O-méthyl-arabinose | <i>Synechococcus</i> | |
| Hexoses-O-méthylés | | |
| 2-O-méthyl-mannose | <i>Synechocystis</i> | |
| 3-O-méthyl-D-mannose | <i>Thiocapsa roseopersicina</i> | |
| = | <i>Rhodopseudomonas viridis</i> | |
| = | <i>Synechococcus</i> | |
| 4-O-méthyl-D-mannose | <i>Synechococcus</i> | |
| 6-O-méthyl-D-mannose | <i>Chlorogloeopsis</i> | |
| 2-O-méthyl-D-galactose | <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> | |
| 2,3-di-O-méthyl-D-galactose | <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> | |
| 6-désoxy-hexoses-O-méthylés | | |
| 2-O-méthyl-L-rhamnose | <i>Thiocapsa roseopersicina</i> | |
| = | <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> | |
| 2-O-méthyl-D-rhamnose | <i>Rhodospirillum tenue</i> | |
| 3-O-méthyl-L-rhamnose | <i>Rhodopseudomonas capsulata</i> | |
| = | <i>Anabaena</i> | |
| = | <i>Rhodospirillum rubrum</i> | |
| 3-O-méthyl-6-désoxy-D-talose | <i>Rhodopseudomonas palustris</i> | |
| 2-O-méthyl-L-fucose | <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> | |
| 2-O-méthyl-fucose | <i>Synechocystis</i> | |
| 2,3-di-O-méthyl-fucose | <i>Synechocystis</i> | |
| Hexosamines-O-méthylées | | |
| 6-O-méthyl-D-glucosamine | <i>Rhodopseudomonas palustris</i> | |
| Heptoses-O-méthylés | | |
| 6-O-méthyl-heptose | <i>Synechocystis</i> | |

Procaryotes non photosynthétiques

| Sucres O-méthylés | Provenance | Référence |
|------------------------------------|-------------------|-----------|
| Pentoses-O-méthylés | | |
| 3-O-méthyl-D-ribose | <i>Rhizobium</i> | a |
| 3-O-méthyl-D-xylose | <i>Mixococcus</i> | b |
| Hexoses-O-méthylés | | |
| 3-O-méthyl-D-glucose | <i>Rhizobium</i> | a |
| 4-O-méthyl-D-glucose | | b |
| 4-O-méthyl-D-galactose | | b |
| 6-O-méthyl-D-galactose | | a |
| 6-désoxy-hexoses-O-méthylés | | |
| 3-O-méthyl-L-fucose | | a |
| 2-O-méthyl-L-rhamnose | | a |
| 3-O-méthyl-L-rhamnose | | a |
| Heptoses-O-méthylés | | |
| 3-O-méthyl-heptose | | b |
| 3,6-di-O-méthyl-heptose | | b |
| Acides uroniques-O-méthylé | | |
| acide 4-O-méthyl-D-glucuronique | | b |

a Kennedy, 1980

b Kenne and Lindberg, 1983

Glycosides cardiaques

| Sucres O-méthylés | Provenance | Référence |
|--|---------------------------------|---------------------------------------|
| Hexoses-O-méthylés | | |
| 3-O-méthyl-glucose | <i>Streblus asper</i> | Reichstein and Weiss, 1962 |
| 2,3-di-O-méthyl-D-glucose | <i>Streblus asper</i> | |
| 6-désoxy-hexoses-O-méthylés | | |
| 6-désoxy-3-O-méthyl-altose | <i>Cerberiopsis candelabrum</i> | |
| 3-O-méthyl-D-quinovose | <i>Adenium honghel</i> | |
| 3-O-méthyl-L-quinovose | <i>Thevetia neriiifolia</i> | |
| | <i>Cerbera odollam</i> | |
| | <i>Thanghinia venenifera</i> | |
| | <i>Boviea volubilis</i> | |
| 3-O-méthyl-L-rhamnose | <i>Acokanthera friesiorum</i> | |
| | <i>Acokanthera schimperi</i> | |
| | <i>Antiaris toxicaria</i> | |
| | <i>Picea nigra</i> | |
| 2-O-méthyl-D-fucose | <i>Streblus asper</i> | |
| | <i>Taxus cuspidata</i> | |
| | <i>Prunus domestica</i> | |
| 3-O-méthyl-D-fucose | <i>Strophanthus eminii</i> | |
| | <i>Strophanthus sarmentosus</i> | |
| | <i>Nerium odorum</i> | |
| | <i>Nerium oleander</i> | |
| | <i>Carissa ovata</i> | |
| 2,3-di-O-méthyl-D-fucose | <i>Streblus asper</i> | |
| 6-désoxy-3-O-méthyl-L-talose | <i>Acokanthera venenata</i> | |
| 2,6-didésoxy-3-O-méthyl-D-ribo-hexose | <i>Strophanthus</i> | |
| | <i>Apocynum cannabinum</i> | |
| | <i>Pachycarpus schinzianus</i> | |
| | <i>Periploca graeca</i> | |
| | <i>Adenium</i> | |
| 2,6-didésoxy-3-O-méthyl-L-arabino-hexose | <i>Strophanthus divarucatus</i> | |
| | <i>Nerium oleander</i> | |
| | <i>Apocynum cannabinum</i> | |
| 2,6-didésoxy-3-O-méthyl-D-xylo-hexose | <i>Strophanthus</i> | |
| | <i>Nerium oleander</i> | |
| | <i>Cryptostegia grandiflora</i> | |
| 2,6-didésoxy-3-O-méthyl-D-lyxo-hexose | <i>Strophanthus</i> | |
| | <i>Nerium oleander</i> | |
| | <i>Nerium odorum</i> | |
| 2,6-didésoxy-3-O-méthyl-L-lyxo-hexose | <i>Strophanthus divaricatus</i> | |

Mycobactéries

| Sucres O-méthylés | Provenance | Référence |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------|
| Hexoses-O-méthylés | | |
| 3-O-méthyl-D-glucose | <i>Mycobacterium phlei</i> | a |
| 6-O-méthyl-D-glucose | <i>Mycobacterium phlei</i> | a |
| 3-O-méthyl-D-mannose | <i>Mycobacterium phlei</i> | b |
| 6-désoxy-hexoses-O-méthylés | | |
| 3-O-méthyl-L-rhamnose | <i>Mycobacterium marinum</i> | c |
| 3-O-méthyl-rhamnose | <i>Mycobacterium kansasii</i> | d |
| = | <i>Mycobacterium avium</i> | e |
| 2-O-méthyl-rhamnose | <i>Mycobacterium sp</i> | f |
| = | <i>Mycobacterium kansasii</i> | d |
| 2-O-méthyl-fucose | <i>Mycobacterium kansasii</i> | d |
| = | <i>Mycobacterium sp</i> | f |
| 3-O-méthyl-fucose | <i>Mycobacterium kansasii</i> | d |
| 2,4-di-O-méthyl-rhamnose | <i>Mycobacterium kansasii</i> | d |
| = | <i>Mycobacterium sp</i> | f |
| 2,3-di-O-méthyl-rhamnose | <i>Mycobacterium avium</i> | e |
| 3,4-di-O-méthyl-rhamnose | <i>Mycobacterium avium</i> | e |
| 3-O-méthyl-6-désoxy-talose | <i>Mycobacterium avium</i> | e |

a Saier and Ballou, 1968

b Gray and Ballou, 1971

c Villé and Gastambide-Odier, 1970

d Gastambide-Odier and Villé, 1970

e Mac Lennan, 1962

f Mac Lennan et al., 1961

Algues

| Sucres O-méthylés | Provenance | Référence |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------|
| Algues brunes | | |
| 2-O-méthyl-fucose | <i>Desmaresta acateata</i> | a |
| 3-O-méthyl-fucose | = | a |
| Algues rouges | | |
| 6-O-méthyl-D-galactose | <i>Porphyra umbilicalis</i> | b |
| 3-O-méthyl-L-rhamnose | = | b |
| 3-O-méthyl-D-galactose | <i>Batrachospermum</i> | b |
| acide 2-O-méthyl-D-glucuronique | <i>Porphyridium cruentum</i> | b |
| | = | b |
| 3-O-méthyl-xylose | = | b |
| 3-O-méthyl-galactose | = | b |
| 4-O-méthyl-galactose | = | b |
| 2,4 di-O-méthyl-galactose | <i>Porphyridium aerugineum</i> | b |
| 2-O-méthyl-D-galactose | <i>Aeodes ulvoida</i> | b |
| 4-O-méthyl-L-galactose | = | |
| Algues vertes | | |
| 3-O-méthyl-D-xylose | <i>Emiliana huxleyi</i> | c |
| 6-O-méthyl-D-mannose | = | c |
| 6-O-méthyl-L-mannose | = | c |
| 2,3 di-O-méthyl-L-rhamnose | = | c |

a Percival and Young, 1974

b Painter, 1983

c Fichtinger-Schepman, 1979

Plantes

| Sucres O-méthylés | Provenance | Référence |
|---------------------------------|--|---------------------------|
| 3-O-méthyl-L-rhamnose | <i>Araucaria</i> <i>Picea nigra</i> <i>Encephelartos latefrons</i> <i>Welwitschia mirabilis</i> | Stephen, 1983 |
| acide 4-O-méthyl-D-glucuronique | <i>Acacia</i> <i>Prunus</i> <i>Spondia</i> <i>Boswellia</i> | |
| 2-O-méthyl-fucose | <i>Sycamore</i> | Bacic et al., 1988 |
| 2-O-méthyl-xylose | = | |

Antibiotiques

| Sucres O-méthylés | Provenance | Référence |
|--------------------------|---------------|-----------|
| 2-O-méthyl-L-rhamnose | Scopamycine A | a |
| | Aranciamycine | b |
| 2,4-di-O-méthyl-D-fucose | Labilomycine | c |

a **Mc Alpine et al., 1971**

b **Keller-Schierlein and Müller, 1970**

c **Akita et al., 1964**

Animaux

| Sucres O-méthylés | Provenance | Référence |
|---|---|-------------|
| 3-O-méthylfucose | <i>Corbicula sendai</i> <i>Ostera gigas</i> <i>Hyriopsis schlegelii</i> | a b c |
| 3-O-méthyl-N-acetyl-galactosamine | <i>Ostera gigas</i> <i>Hyriopsis schlegelii</i> | b d |
| 4-O-méthylgalactose | <i>Corbicula sendai</i> | e |
| acide 4-O-méthyl-glucuronique | <i>Hyriopsis schlegelii</i> | d |
| 3-O-méthylxylose | <i>Hyriopsis schlegelii</i> | c |
| acide 8-O-méthyl-N-glycolylneuraminique | <i>Asterina pectinifera</i> | f |

a **Itasaka, 1966**

b **Hayashi et Matsuura, 1978**

c **Hori et al., 1981**

d **Hori et al., 1983**

e **Itasaka et al., 1983**

f **Sugita, 1979**

II. ETUDE D'UN POLYSACCHARIDE EXCRETE PAR UNE BACTERIE ISOLEE DU MILIEU HYDROTHERMAL PROFOND

A. INTRODUCTION

L'étude que nous avons menée s'inscrit dans le cadre du programme IFREMER Brest de biotechnologie marine appliquée à l'environnement hydrothermal profond. Les caractéristiques physico-chimiques de ce milieu permettent d'envisager qu'il puisse exister des molécules nouvelles possédant des propriétés intéressantes.

Deux axes de recherche sont actuellement développés : le premier concerne la mise en culture de bactéries thermophiles afin de produire des enzymes thermostables ; le second concerne la production et l'étude biochimique d'exopolysaccharides excrétés par des bactéries hydrothermales. Les polymères seront étudiés pour leurs propriétés rhéologiques (gélifiantes, filantes, épaississantes).

B. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique.

La campagne océanographique "Hydronaute" qui s'est déroulée au cours du mois de novembre 1987 au large du Mexique (13°N), à l'aide du sous-marin *Nautille*, a permis à l'équipe du Dr. D. Prieur (CNRS Roscoff) de constituer une collection d'environ 2000 souches bactériennes provenant du milieu hydrothermal profond. Les souches bactériennes ont été isolées à partir des échantillons suivants :

- Fragments de cheminées
- Surfaces immergées (tubes de titane et ardoises)
- Echantillons d'eau (fumeur noir et blanc)
- Alvinella pompejana*
- Alvinella caudata*
- Paraalvinella sp.*
- Bathymodiolus*
- Cyanagrea*
- Tevnia*
- Riftia*

2. Cultures des bactéries (P. Vincent, CNRS, Roscoff).

Au moment où nous avons commencé notre étude, 236 souches avaient été étudiées pour leur capacité à produire des exopolysaccharides. Trois tests rapides et simples ont été utilisés pour mettre en évidence cette production :

- Culture des bactéries sur boîte de Pétri et sélection des souches présentant un aspect mucoïde.

- Culture des bactéries en milieu liquide et sélection des souches qui provoquent une augmentation de la viscosité.

- Observation en microscopie optique d'un étalement bactérien après coloration spécifique des exopolysaccharides (Allison et Sutherland, 1984).

Si la souche étudiée répond positivement au moins à l'un de ces trois tests, elle est retenue pour des expérimentations de production d'exopolymères en milieu liquide.

Tableau IV : Composition des milieux de culture utilisés pour l'isolement de la souche 1545 (Oppenheimer and Zobell, 1952) et pour la production de l'exopolysaccharide (Okutani, 1982).

Milieu 2216 E (Oppenheimer et Zobell, 1952)

| | |
|--------------------|--------|
| Eau de mer filtrée | 750 ml |
| Eau distillée | 250 ml |
| Peptone | 4 g |
| FePO ₄ | 0,01 g |
| Extrait de levure | 1 g |
| Bacto-agar (Difco) | 15 g |

Milieu de Okutani (1982)

| | |
|--------------------|--------|
| Eau de mer filtrée | 800 ml |
| Eau distillée | 200 ml |
| Saccharose | 30 g |
| Peptone | 5 g |
| Extrait de levure | 1 g |
| Bacto-agar (Difco) | 15 g |

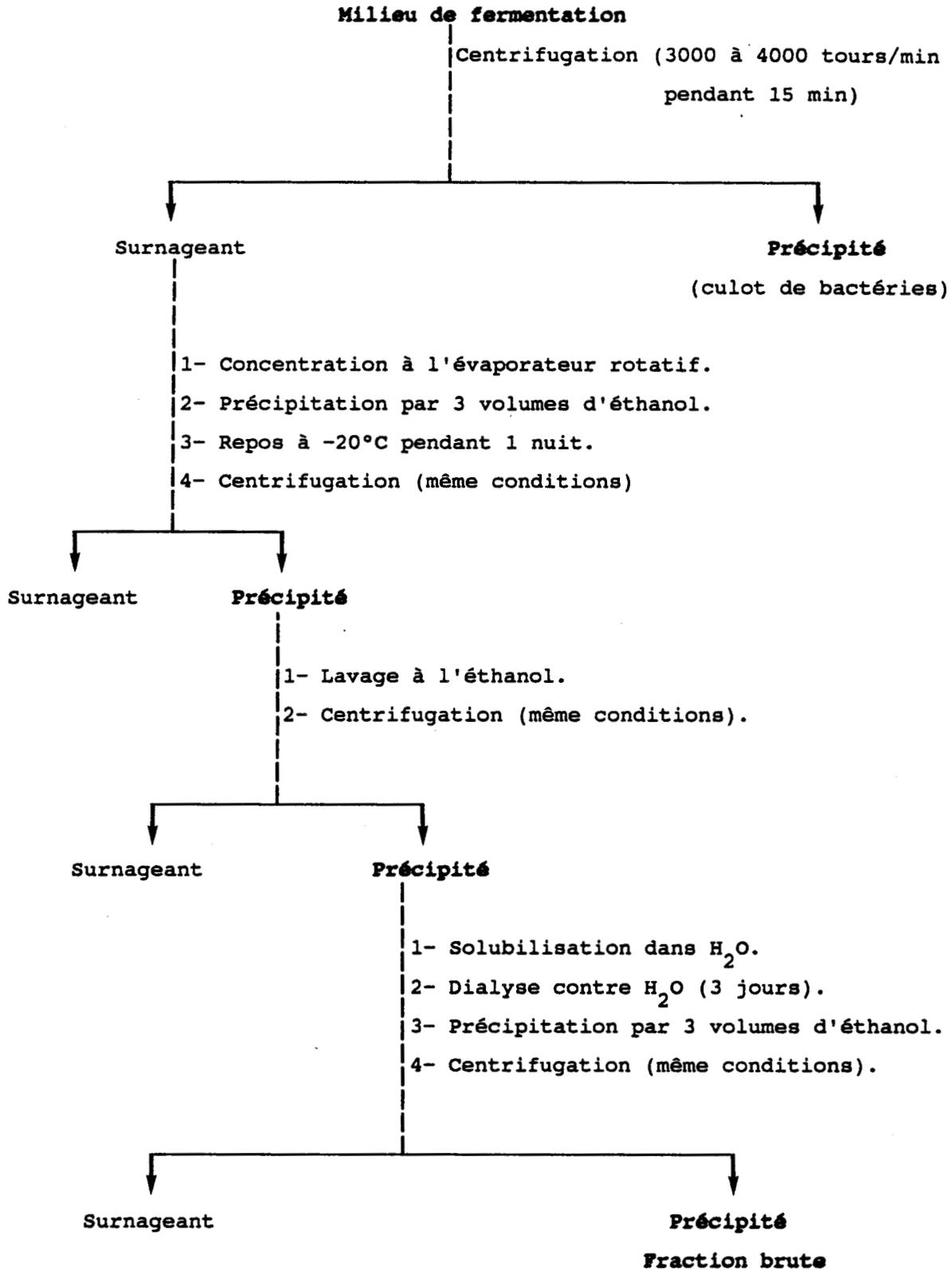


Figure 10 : Protocole d'isolement du polysaccharide.

tampon d'équilibrage de la colonne. Le débit est maintenu à 12 ml/h à l'aide d'une pompe péristaltique (LKB, Bromma, Suède) et l'élution est suivie par analyse colorimétrique de chaque fraction à l'aide du réactif au phénol sulfurique (Dubois, 1956).

4.2. Chromatographie de gel filtration.

La fraction polysaccharidique majoritaire, obtenue après chromatographie d'échange d'ions, est chromatographiée (15 mg dans 6 ml de tampon Acétate d'ammonium 50 mM) sur une colonne de Sepharose 4B (110x2,5 cm) équilibrée et éluée dans le même tampon. Le débit (15 ml/h) est maintenu constant à l'aide d'une pompe péristaltique et l'élution est suivie par détection en lumière ultraviolette (LKB, Bromma, Suède) à 206 nm et par réfractométrie (Knauer).

5. Caractérisation du polysaccharide.

5.1. Electrophorèse en gel d'agarose.

L'homogénéité du polysaccharide a été étudiée par électrophorèse en gel d'agarose suivant le protocole expérimental de Carney (1986) que nous avons modifié. Les gels d'agarose ont été préparés avec 0,5 % d'agarose (IBF, France) dans un tampon Tris-acétate/sulfate de sodium ; 40 mM/1 mM à pH = 6,6. Le gel d'agarose a été coulé sur un support en polyester (10x6,5 cm) pour donner une épaisseur de gel de 0,5 cm. Des échantillons de 5 à 80 µg de polysaccharide, dissous dans 10 µl d'un tampon composé de 70% du tampon précédent et de 30% de glycérol, sont déposés dans les puits à l'aide d'une seringue Hamilton. L'électrophorèse a été menée sous un voltage constant de 500 volts

(0,5 mA/cm) pendant 5 heures, à température ambiante, en utilisant le tampon de préparation du gel dilué 4 fois.

Après électrophorèse, le gel d'agarose est immergé dans une solution colorante (200 mg de bleu de toluidine dans 100 ml d'acide acétique 100 mM) pendant 20 min. La décoloration est obtenue à l'aide d'une solution à 3 % d'acide acétique.

5.2. Détermination du poids moléculaire.

Le poids moléculaire du polysaccharide a été estimé par chromatographie de gel filtration sur une colonne de Sepharose 4B comme décrit précédemment. La colonne est calibrée à l'aide d'échantillons de Dextrans (Sigma, Saint Louis : $20-5 \times 10^6$, 2×10^6 , 5×10^5 , 2×10^5 , 10^5 Daltons) et de lactose.

5.3. Analyse par spectroscopie Infra-Rouge.*

Le polysaccharide (1 mg) dissous dans 1 ml d'eau distillée est lyophilisé, puis finement mélangé avec 100 mg de KBr. Le mélange est ensuite comprimé et la pastille obtenue est examinée à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer double faisceau contre une pastille de KBr pur. L'analyse est effectuée de 400 à 4000 cm^{-1} .

* Les analyses de Spectroscopie Infra-Rouge et du Pouvoir Optique Rotatoire ont été effectuées respectivement dans le Laboratoire de Chimie Macromoléculaire (UST-Lille) du Professeur C. Loucheux et dans le Laboratoire de Chimie Organique (Faculté de Pharmacie de Lille) du Professeur A. Marcincal. Nous les en remercions vivement.

5.4. Pouvoir optique rotatoire.*

Le pouvoir optique rotatoire du polysaccharide a été déterminé à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241, à 20°C, à l'aide de la raie D du sodium, selon la formule :

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{lc}$$

α : déviation polarimétrique
 C : concentration en g/cm³
 l : longueur de la cuve en dm

5.5. Dosages colorimétriques.

a. Recherche des protéines selon la méthode de Lowry et al. (1951).

Réactifs :

- * Solution A : Na₂CO₃ à 2 % dans NaOH 0,1 N.
- * Solution B : sulfate de cuivre, 5 H₂O, 0,5 % dans le tartrate de sodium et de potassium, 1 %.
- * Solution C : 50 ml de solution A + 1 ml de solution B.
- * Réactif de Folin-Ciocalteu (Merck).

Dosage :

A 1 ml de la solution polysaccharidique (1 mg) sont ajoutés 5 ml de solution C ; le mélange est agité puis laissé au repos pendant 10 min. Ensuite, 0,5 ml du réactif Folin-Ciocalteu, préalablement dilué au demi,

sont additionnés. Ce dosage est également réalisé sur des solutions témoins de sérum albumine bovine (Sigma) à différentes concentrations.

b. Dosage des oses neutres selon la méthode à l'orcinol sulfurique de Tillmans et Philippi (1929) modifiée par Rimington (1931).

Les acides uroniques réagissant également avec le réactif à l'orcinol-sulfurique, une correction doit être effectuée. La correction est réalisée après le dosage des acides uroniques par la méthode au carbazol-sulfurique (p. 94), en appliquant l'équation à deux inconnues ci-dessous (Montreuil et Spik, 1963). Les dosages sont effectués sur des séries de 3 tubes contenant chacun :

1. 1 ml d'eau distillée
2. 1 ml de solution titrée contenant 200 μ g d'hexoses neutres
3. 1 ml de solution titrée contenant 200 μ g d'acides uroniques
4. 1 ml des solutions à doser

La teneur en oses totaux des solutions inconnues (mg/ml) est donnée par la formule suivante :

$$\frac{4\alpha c - \beta b}{200} : 1000$$
$$\frac{4ac - db}{200 \quad 200}$$

- α : absorbance de 1 ml de la solution à doser avec l'orcinol-sulfurique.
 c : absorbance de 50 μ g d'acide uronique avec le carbazol-sulfurique.
 β : absorbance de 1 ml de la solution à doser avec le carbazol-sulfurique.
 b : absorbance de 200 μ g d'acide uronique avec l'orcinol-sulfurique.
 a : absorbance de 200 μ g d'oses avec l'orcinol-sulfurique.
 d : absorbance de 200 μ g d'oses avec le carbazol-sulfurique.

Réactifs :

* Solution d'orcinol.

Dissoudre 1,5 g d'orcinol dans une solution aqueuse d'acide sulfurique pur à 30 % (V/V) et compléter à 100 ml. La solution d'orcinol doit être conservée à 0°C dans des flacons en verre pyrex. Généralement, elle laisse déposer des cristaux que l'on redissout au bain-marie.

*Solution à 60 ml d'acide sulfurique concentré qsp 100 ml d'eau distillée.

* Solution d'oses pour "témoin interne" :

- solution-mère contenant 200 mg d'oses totaux pour 100 ml d'eau distillée.

- solution-mère contenant 200 mg d'acide glucuronique pour 100 ml d'eau distillée.

Dosage :

Dans des tubes de verre sont introduits 0,1 ml de la solution à doser renfermant au maximum 400 µg d'oses totaux, 0,2 ml de la solution d'orcinol et 1,5 ml de la solution d'acide sulfurique à 60 %. Les tubes sont agités au vortex puis maintenus 20 min exactement dans un bain-marie à 80°C. Les tubes sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 45 min. L'absorbance de chacune des solutions est déterminée à 510 nm.

c. Dosage des acides uroniques.

- Méthode de Dische (1947).

Les oses neutres réagissant également avec le réactif utilisé dans cette méthode de dosage des acides uronique, une correction est donc nécessaire (Montreuil et Spik, 1963).

Réactifs :

* acide sulfurique concentré

* solution de carbazol : (Prolabo) 0,1 g.

Ethanol absolu qsp 100 ml.

La solution est conservée à 0°C et renouvelée tous les mois.

* solutions d'acide glucuronique à 50 mg/100ml et de glucose à 200 mg/100 ml.

Les déterminations sont effectuées sur des séries de 3 tubes contenant chacun :

1. 1 ml d'eau distillée
2. 1 ml de solution titrée contenant 200µg d'hexoses neutres
3. 1 ml de solution titrée contenant 50µg d'acides uroniques
4. 1 ml des solutions à doser

La teneur en acides uroniques totaux des solutions inconnues (mg/ml) est donnée par la formule suivante :

$$\frac{\beta a - \alpha d}{50} : 1000$$

$$\frac{ac - db}{200}$$

$$50 \quad 200$$

$\alpha, \beta, a, b, c, d$: voir page précédente.

Dosage :

Dans les tubes de verre, on introduit 0,1 ml de solution à doser, contenant au maximum 50 à 100 µg d'acide glucuronique et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont refroidis dans un bain d'eau glacée. L'acide sulfurique est ajouté lentement et régulièrement le long des parois du tube. Les tubes sont agités au vortex et maintenus ensuite pendant 20 min très exactement dans un bain-marie bouillant. Les tubes

sont ensuite refroidis très rapidement et 0,02 ml de la solution alcoolique de carbazol sont alors ajoutés. Le mélange est soigneusement agité. Une coloration pourpre se développe qui augmente d'intensité à l'obscurité. Après un séjour de 3 h à l'obscurité, la mesure des absorbances est effectuée à 530 nm.

- Méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973).

Réactifs :

* solution de méta-hydroxy-diphényle (MHDP) à 0,15 % dans NaOH 0,5 % dans de l'eau.

La solution est conservée à 0°C, à l'obscurité et renouvelée tous les mois.

* solution de tétraborate de sodium 0,0125 M dans de l'acide sulfurique concentré.

Dosage :

A 0,2 ml d'échantillon contenant entre 0,5 et 20 µg d'acides uroniques, on ajoute 1,2 ml de solution de tétraborate. Les tubes sont agités et réfrigérés dans de la glace. Ils sont ensuite laissés 5 min au bain-marie bouillant. Après refroidissement dans un bain de glace, on ajoute 20 µl de la solution de MHDP. Les tubes sont agités. Une coloration rose se développe et au bout de 5 min, la lecture peut se faire à 520 nm.

d. Dosage des osamines par la méthode modifiée d'Elson et Morgan (1933).

Les osamines sont au préalable libérées par hydrolyse chlorhydrique (HCl 4N, 4h, 100°C), des échantillons témoins de N-acétylglucosamine subissent le même traitement. L'hydrolysate est ensuite séché dans un

excicateur en présence de soude.

Réactifs :

* Solution alcaline d'acétyl-acétone:

- acétyl-acétone 2 ml,
- solution de carbonate de sodium anhydre 1,25 N qsp 50 ml (à préparer extemporanément). Le carbonate de sodium est desséché au préalable à l'étuve à 100°C.

* Réactif d'Ehrlich :

- para-diméthylamino-benzaldéhyde (10,6 g) dans 30 ml d'acide chlorhydrique.

* solutions titrées de N-acétylglucosamine.

Dosage :

Dans des tubes en verre sont introduits successivement, 0,1 ml de la solution à doser renfermant au maximum 100 µg de glucosamine, 0,1 ml de la solution d'acétyl-acétone et 0,2 ml d'eau distillée. Les tubes sont agités, bouchés hermétiquement et placés dans un bain-marie bouillant pendant 10 min. Ils sont ensuite refroidis et additionnés de 0,5 ml d'éthanol absolu. Après agitation, les tubes sont placés à nouveau dans un bain-marie réglé à 75°C pendant 5 min. On verse alors lentement 0,5 ml d'éthanol absolu dans chacun des tubes qui sont ensuite maintenus 30 min à 75°C. Après refroidissement, on ajoute de nouveau 0,5 ml d'éthanol absolu. Après agitation, les tubes sont laissés à l'obscurité 30 min. Les mesures d'absorbance sont effectuées à 520 nm. La coloration est stable pendant 24 h à l'obscurité.

5.6. Recherche des lipides.

Les lipides sont extraits par la méthode de Folch (1957). A partir de 100 mg d'échantillon, une première extraction est effectuée par 2 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (2/1). Après centrifugation à 3000 g pendant 10 min, le surnageant est prélevé. Sur le culot, une nouvelle extraction est réalisée par 2 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (1/1). Après centrifugation dans les mêmes conditions, une troisième extraction par 2 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (1/2) est effectuée sur le culot. Les différentes phases organiques sont réunies et évaporées sous courant d'azote et le résidu sec est pesé.

5.7. Recherche chromatographique des substituants de type acétate, pyruvate et succinate et des acides uroniques.

a. Chromatographie sur colonne d'exclusion d'ions.

La présence dans de nombreux polysaccharides de substituants non glucidiques, tels que le pyruvate, le succinate et l'acétate, nous a incités à les rechercher à l'aide d'une technique chromatographique d'exclusion d'ions (Pecina et al., 1984). Cette technique permet aussi d'identifier les hexoses neutres et les acides uroniques ainsi que leurs lactones.

1 mg d'échantillon est hydrolysé par 0,5 ml d'acide trifluoroacétique 4 N pendant 4 h à 100°C. 10 µl d'hydrolysats sont chromatographiés à 65°C sur colonne d'exclusion d'ions Aminex HPX-87H (forme H⁺, 300x7,8 mm Biorad, Sweden), montée sur une pompe Shimadzu LC-5A. Les constituants sont élués par de l'acide sulfurique 0,008 N à

un débit de 0,6 ml/min et détectés à l'aide d'un réfractomètre Spectra Physics model 6040.



b. Chromatographie en phase gazeuse des acides organiques.

Le polysaccharide est hydrolysé par de l'acide trifluoroacétique 2 N pendant 2 h à 100°C en présence d'acide adipique utilisé comme standard interne. Après évaporation en excicateur sous vide en présence de soude, le résidu sec est repris par du méthanol chlorhydrique 0,5 N et la méthyl-estérification est pratiquée 2 heures à 80°C. Après évaporation, le résidu est repris par du méthanol. L'échantillon est injecté sur colonne remplie de Carbowax 20 M (0,3x200 cm). Les méthyl esters d'acide organique sont élués à l'aide d'un gradient de température de 50 à 220°C à raison de 4°C/min sous un débit de gaz vecteur (He) de 15 ml/h.

5.8 Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.

a. Identification et dosage des monosaccharides sous forme de méthylglycosides triméthylsilylés.

Les monosaccharides sont identifiés et dosés sous forme de méthylglycosides N-acétylés et O-triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling et al. (1975) modifiée par Montreuil et al. (1986). Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides à l'aide du méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80°C pendant 24 h. Après refroidissement du méthanolysat, le pH est amené à 6-7 à l'aide de carbonate d'argent (Prolabo). Les sucres aminés éventuellement présents dans le

méthanolysat sont N-acétylés par l'anhydride acétique (50 μ l) pendant une nuit à température du laboratoire et à l'obscurité. Après élimination par centrifugation du chlorure d'argent formé et du carbonate d'argent en excès, le surnageant est délipidé par l'heptane.

La phase méthanolique est enfin évaporée à siccité sous azote. Les méthylglycosides sont triméthylsilylés dans la pyridine (50 μ l), à l'aide de bis-silyltrifluoroacétamide (Pierce) (50 μ l), à température ambiante pendant 2 h.

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont identifiés par CPG dans les conditions suivantes : appareil de chromatographie modèle Girdel-300 muni d'un détecteur à ionisation de flamme, d'une colonne capillaire imprégnée de silicone OV101 (25 m x 0,2 mm DI), température de 120 à 240°C à raison de 2°C/min, pression de gaz vecteur (hélium) 0,4 atm, les températures du détecteur et de l'injecteur sont réglées à 240°C.

b. Identification et dosage des monosaccharides sous forme d'acétates d'alditols.

*** Hydrolyse trifluoroacétique.**

Les monosaccharides sont libérés par hydrolyse à l'aide d'acide trifluoroacétique 4 N, 4 h à 100°C en présence de mésoinositol utilisé comme témoin interne. L'acide est éliminé en excicateur sous vide en présence de soude. Le produit hydrolysé est repris par 1 ml d'une solution d'ammoniaque 0,1 M et les monosaccharides sont réduits une nuit par 2 mg de borohydrure de potassium à température ambiante. La réduction est arrêtée par addition de Dowex 50x8 (20-50 mesh, forme H⁺) ou d'acide acétique dans le cas de la présence d'hexosamines dans l'échantillon à doser. Après filtration de la résine Dowex 50x8, la

solution est évaporée à l'évaporateur rotatif et l'acide borique est éliminé en présence de méthanol sous forme de méthyl-borates après plusieurs codistillations. La fraction réduite est peracétylée une nuit à température ambiante (pyridine/anhydride acétique, v/v, 300 μ l).

Après évaporation des agents d'acétylation, les polyolacétates sont repris par du méthanol et analysés en chromatographie en phase gazeuse dans les mêmes conditions que l'analyse des méthylglycosides triméthylsilylés, à l'exception du gradient de température qui s'effectue de 120 à 240°C à raison de 3°C/min.

*** Hydrolyse sulfurique (Saeman et al., 1954).**

1 mg de polysaccharide est dissous dans H_2SO_4 72 % en poids, 5 min à température ambiante. La solution est ensuite amenée à normalité puis portée à 100°C pendant 6 h. L'hydrolysate sulfurique est neutralisé par du carbonate de baryum et le précipité de sulfate de baryum abondamment lavé à l'eau est éliminé par centrifugation. Le surnageant et les eaux de rinçage sont purifiés sur un couple de résines échangeuses de cations (Dowex 50x2, 200-400 mesh, forme H^+) et d'anions (Dowex 1x2, 200-400 mesh, forme $HCOO^-$). L'éluat neutre est lyophilisé, puis analysé en chromatographie en phase gazeuse sous forme d'acétates d'alditols.

*** Identification et dosage des acides uroniques après réduction de la fonction acide carboxylique en fonction alcool (Dutton, et al.1986).**

Les acides uroniques présents dans le polysaccharide sont méthylestérifiés à l'aide du réactif méthanol chlorhydrique. Les méthylesters sont ensuite réduits en alcool à l'aide d'un borohydrure alcalin.

1 mg de polysaccharide est traité par 0,5 ml de méthanol/HCl 0,5 N, 24 h à 80°C. Après élimination du réactif sous azote, le résidu est repris par 1 ml de méthanol anhydre et les esters méthyliques d'acide uronique sont réduits à l'aide de 2 mg de borohydrure de potassium, à température ambiante pendant 1 nuit. La réduction est arrêtée par addition de Dowex 50x8, (20-50 mesh, forme H⁺). Après filtration de la Dowex, les sels de borate sont éliminés par plusieurs codistillations au méthanol. Le polysaccharide réduit et partiellement dépolymérisé est analysé après hydrolyse totale (ATFA, 4 N, 4 h, 100°C) ou méthanolyse (MeOH/HCl, 0,5 N, 24 h, 80°C). Les monosaccharides ou les méthylglycosides ainsi obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse selon les protocoles décrits plus haut.

6. Analyse structurale du polysaccharide.

6.1. Méthylation.

Les difficultés que nous avons rencontrées pour solvater le polysaccharide dans le DMSO, durant la méthylation, nous ont incité à effectuer préalablement une peracétylation.

10 mg de polysaccharide sont dissous dans 5 ml de formamide (Merck) et peracétylés à l'aide de 4 ml du mélange pyridine-anhydride acétique (v/v) pendant 20 h à température ambiante. Le polysaccharide peracétylé est ensuite dialysé contre de l'eau distillée, puis lyophilisé. Enfin, le polysaccharide peracétylé est méthylé à l'aide de la méthode de Paz-Parente et al., 1984.

2 mg de polysaccharide peracétylé sont dissous dans 0,5 ml de DMSO dans un tube en verre et placé dans un bain ultrasonique pendant une heure. On ajoute 0,5 ml de base (lithium méthylsulfinyl carbanion) à la

solution de polysaccharide que l'on place à nouveau au bain ultrasonique pendant 2 h. Après congélation, 0,5 ml d'iodure de méthyle (Merck) sont additionnés et l'alkylation se déroule pendant 2 h au bain ultrasonique puis pendant une nuit à température ambiante. Toutes ces opérations s'effectuent sous atmosphère d'argon.

La méthylation est arrêtée par addition de 10 ml d'eau. Quelques cristaux de thiosulfate de sodium sont ajoutés pour décolorer la solution. Le polysaccharide perméthylé est extrait par 4 fois 0,5 ml de chloroforme. Les phases organiques sont réunies et lavées abondamment à l'eau, puis sont séchées par du sulfate de sodium anhydre, évaporées sous courant d'azote et lyophilisées.

Le polysaccharide perméthylé est méthanolysé pendant 24 h à 80°C à l'aide de 0,5 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N. Après évaporation sous courant d'azote, les méthylglycosides partiellement méthylés sont acétylés par le mélange pyridine-anhydride acétique (v/v) pendant une nuit à température ambiante. L'identification des éthers méthyliques est effectuée par couplage CPG-SM selon la méthode décrite par **Fournet et al.**, 1981 (Voir chapitre 6.6.).

6.2. Réduction des acides uroniques par le carbodiimide.

La réduction des acides uroniques est réalisée selon la méthode de **Taylor et Conrad (1972)**. Le dérivé N-cycloheximyl-N'-β-(N-méthylmorpholino-éthyl)-carbodiimide-p-toluène sulfonate se condense à la fonction carboxylique de l'acide uronique pour donner le dérivé A. En milieu acide, le dérivé se transforme en un chlorure d'acide B qui se réarrange en une lactone C ou ester intramoléculaire qui est ensuite réduit en un sucre neutre D (**Fig. 11, p. 104**).

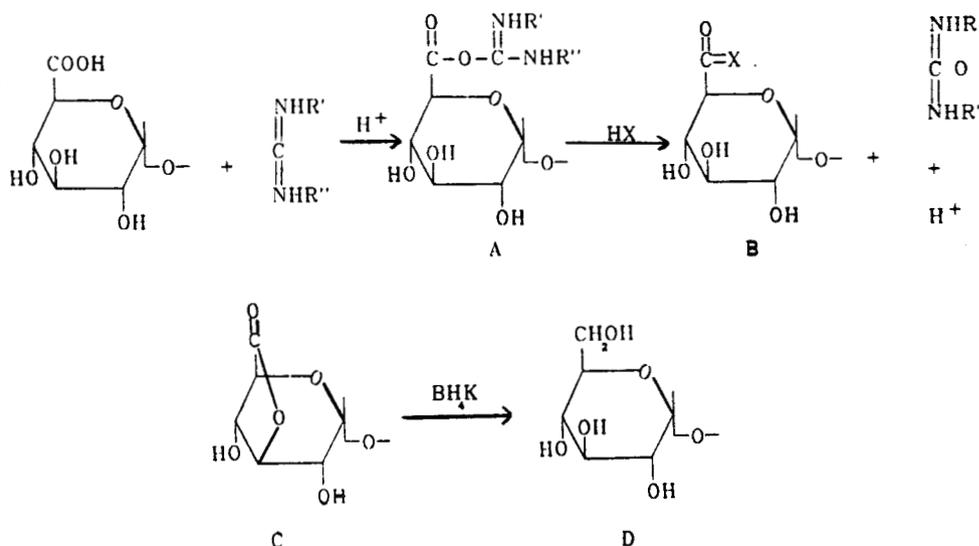


Figure 11 : Mécanisme de la réduction au carbodiimide selon Taylor et Conrad (1972).

20 mg de polysaccharide sont dissous dans 10 ml d'eau distillée, sous agitation magnétique. L'addition de 10 mg de carbodiimide par petites quantités à la solution de polysaccharide permet la formation de la lactone. Le pH est maintenu à 4,75 par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N pendant 1 h. Une solution de borohydrure de potassium 2 N est alors ajoutée goutte à goutte et le pH est maintenu à 7 par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N durant 1 h. Quelques gouttes d'octanol sont ajoutées pour éviter la formation de mousses. Le mélange est ensuite dialysé contre de l'eau distillée pendant 3 jours, puis lyophilisé. Nous avons effectué 2 cycles de réduction. Le polysaccharide réduit est analysé après méthanolyse et hydrolyse et par méthanolyse après perméthylation.

6.3 Réduction du polysaccharide perméthylé par le borohydrure de lithium.

1 mg de polysaccharide perméthylé est repris par 1 ml de tétrahydrofurane contenant du borohydrure de lithium (Aldrich). La réduction des acides uroniques est effectuée 2 h à 80°C. Après refroidissement, la solution est diluée par 3 volumes d'eau distillée et la réduction est arrêtée par addition de Dowex 50x8 (20-50 mesh, forme H⁺), jusqu'à pH = 6. Après élimination de la résine, la solution est évaporée sous vide et les borates sont éliminés par codistillation au méthanol. Les fonctions alcool apparues par réduction des acides uroniques sont acétylées. Le polysaccharide perméthylé est ensuite méthanolysé et acétylé. Les méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés sont analysés par couplage CPG-SM.

6.4. Dégradation du polysaccharide par le lithium dans l'éthylène diamine.

Le lithium dissous dans l'éthylène diamine est un agent réducteur puissant qui permet la dégradation spécifique des acides uroniques. Cette méthode, qui s'applique au polysaccharide natif, permet donc d'obtenir des oligosaccharides. Il est à noter qu'un monosaccharide ou qu'une chaîne oligosaccharidique, lié en position 3 d'un acide uronique n'est pas éliminé. (Mort and Bauer, 1982 ; Lau et al., 1987).

a. Méthode.

25 mg de polysaccharide sont lyophilisés de façon à éliminer toute trace d'eau. 2 ml d'éthylène diamine anhydre sont ensuite ajoutés

au produit sous atmosphère d'argon. Après dissolution de l'échantillon, un fragment de lithium métallique (2,5 mm) est ajouté au milieu réactionnel. La solution devient progressivement bleu profond et cette coloration est maintenue 6 h par addition de lithium métallique. La réaction est arrêtée par addition d'eau dans le mélange préalablement congelé. Lorsque la solution est devenue limpide, l'éthylène diamine et l'eau sont éliminés par plusieurs codistillations en présence de toluène jusqu'à l'obtention d'un résidu blanc. Ce résidu (hydroxyde de lithium et matériel glucidique) préalablement refroidi dans un bain de glace, est repris par 5 ml d'eau, puis amené à pH = 4,5 avec de l'acide acétique. Cette solution est dessalée sur une colonne de Dowex 50x12 (forme H⁺). L'éluat donnant une réponse positive en phénol sulfurique est lyophilisé.

**b. Séparation des oligosaccharides résistants à la dégradation
au lithium.**

Les oligosaccharides résistants à la dégradation au lithium sont purifiés par chromatographie de gel filtration sur colonne de gel TSK HW40. Les oligosaccharides élués sont détectés à l'aide d'un détecteur réfractométrique (Spectra-Physics 8430) et un détecteur UV (LKB 2138) à 206 nm. Les fractions obtenues ont été analysées par chromatographie sur couche mince de silice (solvent butanol-acide acétique-eau ; 2-1-1,5) et selon les techniques classiques de détermination de structure des enchaînements glucidiques.

c. Etude structurale des oligosaccharides.

Les oligosaccharides obtenus après gel filtration sont réduits à l'aide de borohydrure de potassium (5 mg de BH_4K dans 1 ml d'ammoniaque 0,1 N). Cette manipulation permet, après méthanolyse, de déterminer l'extrémité terminale réductrice de l'oligosaccharide. L'oligosaccharide-alditol obtenu après réduction, est analysé par couplage CPG-SM sous forme perméthylée et sous forme perméthylée puis réduite par le borohydrure de lithium (Voir chapitre 6.3.).

L'oligosaccharide-alditol perméthylé, dont les fonctions acides ont été réduites, est également analysé après méthanolyse. Les éthers méthyliques partiellement méthylés et acétylés sont caractérisés par couplage CPG-SM.

6.5. Hydrolyse partielle.

a. Hydrolyse.

100 mg de polysaccharide sont homogénéisés à température ambiante dans 75 ml d'ATFA 2 N, puis la solution est hydrolysée pendant 2 h à 100°C. Ce temps d'hydrolyse a été choisi après avoir effectué une cinétique d'hydrolyse (temps 0, 30 min, 1 h, 1 h30, 2 h, 2 h30, 3 h, 3 h30, 4 h, 4 h30, 5 h, 5 h30, 6 h). L'hydrolysate est ensuite évaporé sous vide à siccité, puis l'acide est éliminé par plusieurs codistillations au méthanol. L'hydrolysate partiel total, natif ou perméthylé, a été étudié par spectrométrie de masse en mode FAB négatif ou positif, respectivement. Il a été également étudié par spectrométrie de masse en tandem et par couplage SFC-FID et SFC-MS.

b. Chromatographie d'échange d'ions.

L'hydrolysate partiel est déposé sur une colonne de Dowex 1x8 (200-400 mesh, forme acétate, 20x2 cm), puis élué par un gradient d'acide acétique (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, et 100 %). Chaque fraction est évaporée sous vide, puis lyophilisée. La détermination de structure des oligosaccharides a été effectuée selon le protocole décrit plus haut (**Voir chapitre 6.4.c**).

6.6. Spectrométrie de masse.

a. Couplage CPG-SM.

Les analyses sont effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Girdel 300 à colonne capillaire de silicone OV 101 (0,3 mmx25 m), gaz vecteur à pression d'Hélium 0,5 atm, couplé à un spectromètre de masse Riber Mag 10-10 (Rueil-Malmaison, France).

- Analyse en mode impact électronique : énergie d'ionisation 70 eV.

- Analyse en mode ionisation chimique : à pression d'ammoniac.

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés : température du four programmée de 100 à 180°C à 3°C/min, puis de 180 à 240°C à 6°C/min ; température de l'injecteur et du détecteur : 240°C.

- Oligosaccharides alkylés : température du four programmée de 200 à 280°C à 5°C, isotherme à 280°C pendant 20 min ; température du détecteur et de l'injecteur : 280°C.

b. Spectrométrie de masse en mode d'ionisation FAB.

L'analyse en FAB-MS a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse 4 secteurs Kratos Concept II HH à haute résolution (Kratos, Manchester, U.K.), équipé d'un système de données DS90 (DG : DG 30). L'appareil opère avec un potentiel d'accélération de 8 keV. Le canon à atomes rapides est utilisé avec du Xénon comme gaz de bombardement dans les conditions suivantes : 7 kV-1 mA. Les masses sont balayées de $m/z = 2000$ à 100 à raison de 10 secondes par décade avec une résolution de masse égale à $1/2000$. La calibration de l'appareil est réalisée à l'aide des ions clusters $(CsI)_n Cs^+$ et $(CsI)_n I^-$ pour les modes d'ionisation positive et négative, respectivement. Les échantillons lyophilisés sont dissous dans de l'eau de manière à obtenir une concentration finale de $10 \mu g/\mu l$. $1 \mu l$ est déposé à l'aide d'une microseringue sur l'extrémité en cuivre de la canne d'introduction directe. Après séchage sous courant d'air chaud, $2 \mu l$ de matrice sont ajoutés. Enfin, la canne est introduite dans la source du spectromètre de masse.

Matrice FAB positive : glycérol/thioglycérol : $1/3$ à 1% d'acide acétique ou thioglycérol à $0,1 \%$ d'acétate de sodium dans le méthanol.

Matrice FAB négative : thioglycérol saturé en triéthylamine dilué à 50% par de l'eau ; la phase thioglycérol constitue la matrice.

c. Spectrométrie de masse en tandem.

Cette technique spectrométrique qui utilise deux spectromètres de masse couplés en série permet d'affiner l'analyse effectuée par FAB-MS. Dans ce type d'expérience, un ion moléculaire ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$), ou un fragment, est sélectionné au niveau du premier spectromètre de

masse (MS1) constitutif du MS-MS tandem (Fig. 12, p. 111), avec une résolution de masse égale à 1/1000. L'ion ainsi sélectionné est fragmenté dans une chambre de collision située entre les deux spectromètres de masse. Les produits de décomposition sont transmis au niveau du MS2. Finalement, les fragments sont analysés, avec une résolution de masse égale à 1/1000, au niveau du second spectromètre de masse. Ainsi, un mélange peut être analysé par sélection de ses constituants.

L'analyse par FAB-CID-MS-MS (fast atom bombardement-collision induced decomposition-mass spectrometry-mass spectrometry) a été effectuée à l'aide du spectromètre de masse Kratos Concept II HH. Cet instrument possède une configuration $E_1B_1-E_2B_2$. La collision s'effectue au niveau de la 3^e région de champ libre.

L'hélium est utilisé en tant que gaz de collision à une pression suffisante pour permettre de réduire le signal de l'ion parent à 1/3 de sa valeur. Le rapport B/E est maintenu constant dans le deuxième spectromètre de masse. Le spectre de masse est enregistré par balayage de m/z 1250 à 100 à raison de 10 s par décade avec une résolution de masse de 1/1000. La calibration de l'appareil se fait de la même manière que lors de l'analyse en FAB-MS.

6.7. Chromatographie en phase supercritique (SFC)

La chromatographie en phase supercritique est une méthode de choix pour l'étude de mélange d'oligosaccharides. C'est une méthode qui allie, à la fois, les avantages de la chromatographie en phase gazeuse et ceux de la chromatographie liquide. En effet, les propriétés de la phase mobile, lorsqu'elle est en phase supercritique, sont telles qu'elles se rapprochent de celles d'un gaz (viscosité faible), ainsi que de celles d'un liquide (pouvoir de solvatation élevé).

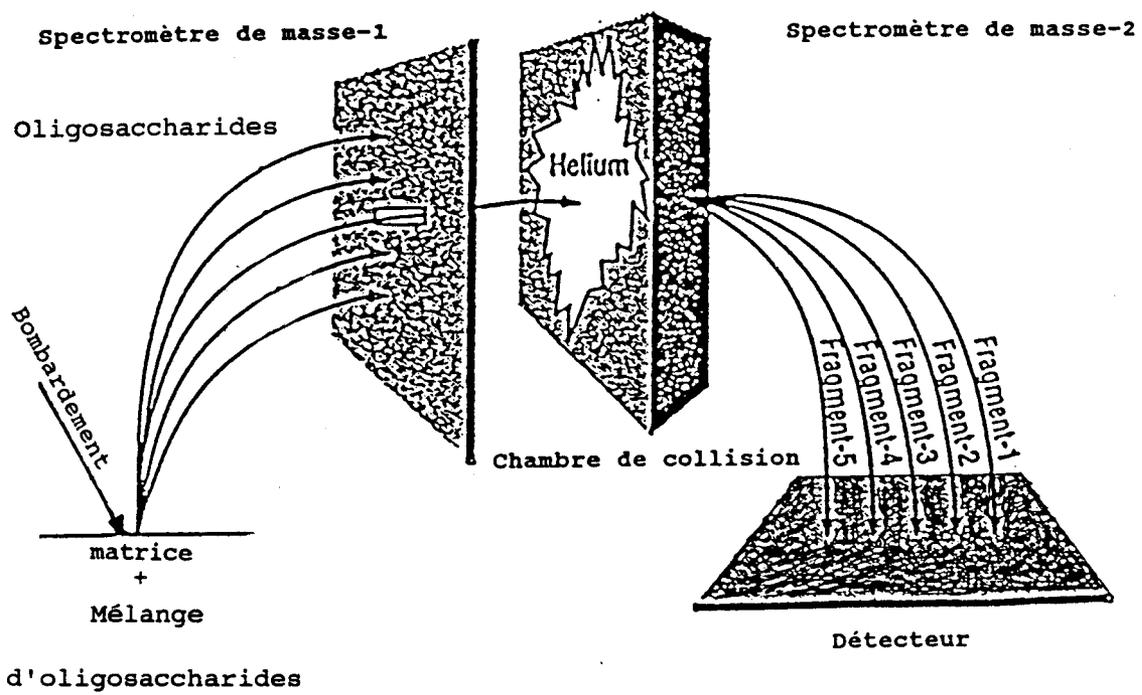


Figure 12 : Schéma d'un spectromètre de masse tandem (MS-MS).

C'est une technique qui constitue une avancée dans les méthodes de séparation de molécules de haut poids moléculaire ou/et thermolabiles.

a. SFC-FID.

La chromatographie en phase supercritique est effectuée à l'aide d'une pompe Brownlee seringue équipée d'une vanne d'injection Valco de 200 nl (modèle C 14W). L'appareil est doté d'un diviseur permettant l'injection du quart des volumes introduits. Les séparations d'oligosaccharides alkylés ont été réalisées sur une colonne capillaire de type DB5 (épaisseur du film 0,1 μm , 10mx50 μm DI, J&W Scientific, Folstom, CA) placée dans un four de chromatographie en phase gazeuse (Shimadzu GC14) dont la température est maintenue à 120°C. La phase mobile est constituée de dioxyde de carbone (SFC grade, Prodair, Lille, France). La pression de gaz est maintenue constante à l'aide d'un restricteur intégral. Le gradient de pression s'effectue de 150 à 410 atm à raison de 5 atm/min. Le détecteur, de type ionisation de flamme, est maintenu à une température de 350°C (Leroy et al., 1990).

b. SFC-CI-MS.

Le couplage entre le chromatographe en phase gazeuse (Carlo-Erba) et le spectromètre de masse (Kratos Concept II HH) est réalisé à l'aide d'une interface (Fig. 13, p. 113). La température du four est maintenue à 120°C. Les températures de l'interface GPG et du ré-entrant CPG sont respectivement de 120°C et de 350°C. La sonde du spectromètre de masse est maintenue à une température de 400°C. La température de la source est de 220°C. Le spectromètre de masse est utilisé avec un potentiel d'accélération de 4 keV et l'ammoniac est utilisé en tant que gaz d'ionisation.

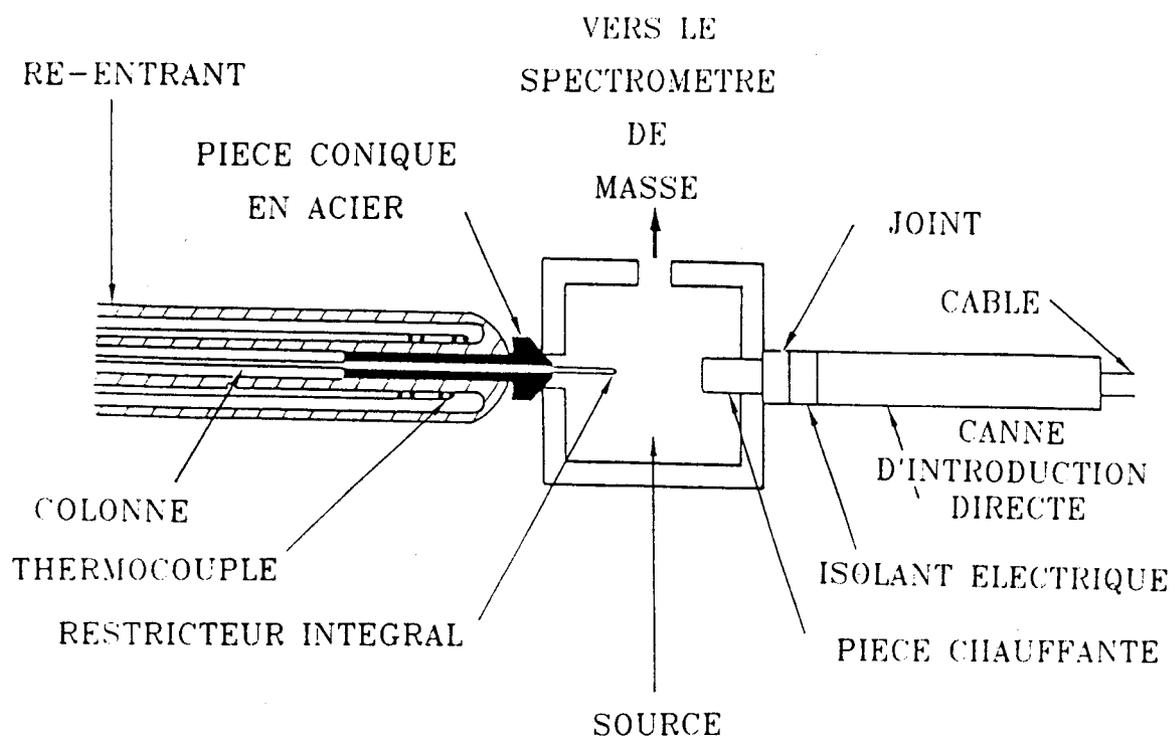


Figure 13 : Schéma de l'interface SFC-MS (Leroy et al., 1990).

C. RESULTATS

1. Culture des bactéries et isolement du polysaccharide.

Comme nous le montre la **Figure 14** (p. 115) qui illustre le temps de génération de la bactérie en fonction de la température (A), du pH (B) et de la concentration en chlorure de sodium (C), nous pouvons constater que la souche 1545 possède une température optimum de croissance de 30°C (temps de génération 40 min), température à laquelle se développe *Alvinella pompejana*, hôte de la bactérie étudiée. Elle possède également un pH optimum de croissance égal à 7 (temps de génération aux alentours de 40 min) et elle se développe favorablement pour des concentrations en chlorure de sodium équivalentes à celles rencontrées dans le milieu marin (30-40 g/l).

Cette souche bactérienne atteint son plateau de croissance au bout de 16 h et le maximum de production de polysaccharide est atteint au bout de 5 jours de culture. Ce maximum est de 10 g de polymères par litre de culture. Cette valeur est obtenue après centrifugation des bactéries et précipitation éthanolique. Ce précipité éthanolique est appelé fraction brute.

2. Etude de la fraction brute.

2.1 Dosages centésimaux.

Le **Tableau V** (p. 116) donne les pourcentages en glucides, et protéines de la fraction brute. Cette dernière, isolée après

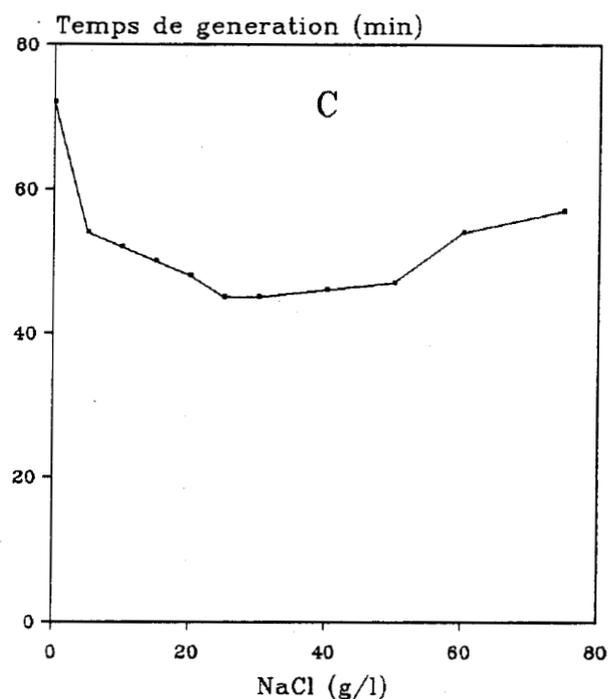
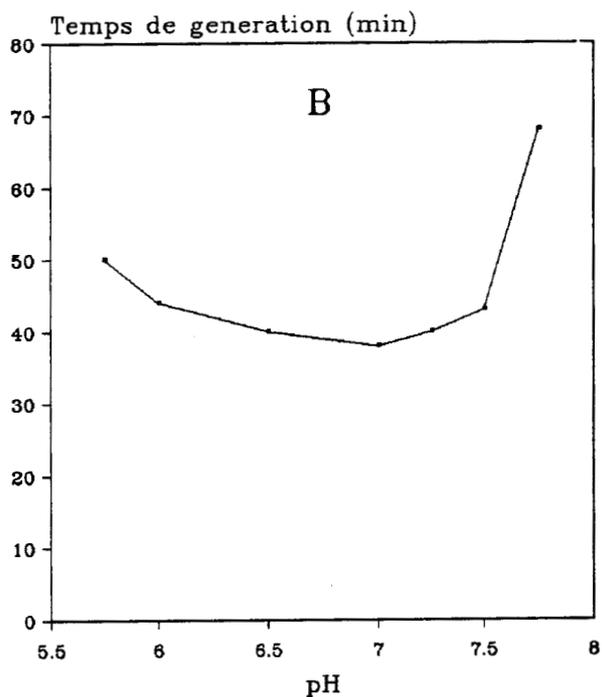
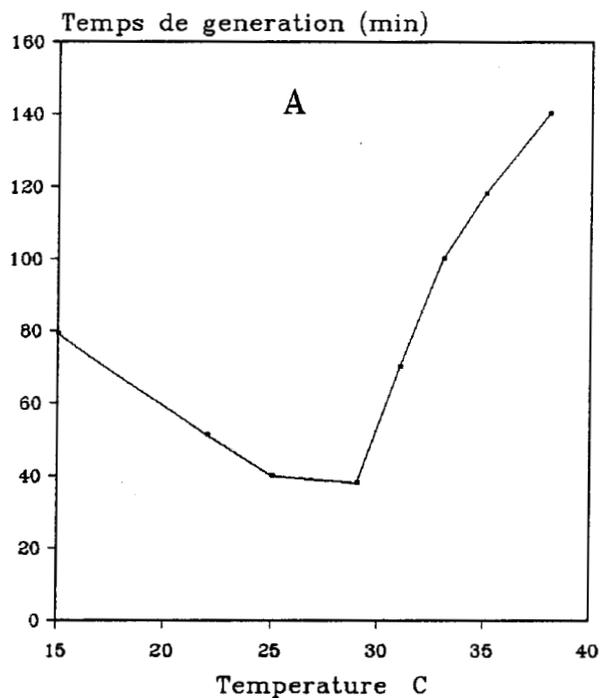


Figure 14 : Temps de génération (min), en phase exponentielle de croissance, de la souche bactérienne 1545, en fonction : de la température (A), du pH (B) et de la salinité (C).

Tableau V : Composition centésimale en glucides et protides, et rendement de purification de la fraction brute, des fractions obtenues après chromatographie d'échange d'ions et de la fraction 300mM purifiée sur Sepharose 4B (fraction pure).

| Fractions | Constituants % | | | | | Rendement de chromatographie % |
|-----------|----------------|---------------|----------|-----------|-------|--------------------------------|
| | Oses neutres | Ac. uroniques | Osamines | Proteines | Total | |
| Brute | 40,6-50,6 | 32,5 | 2,7 | 3 | 84-89 | - |
| Neutre | 80 | - | 1,5 | - | 81,5 | 1 |
| 100mM | 72 | 17,5 | - | - | 89,5 | 8 |
| 200mM | 50 | 18,8 | - | + | 68,8 | 10 |
| 300mM | 51 | 28,7 | - | - | 79,7 | 59 |
| 400mM | 63 | 32,7 | - | + | 95,7 | 7 |
| 500mM | 62 | 11,2 | 1,5 | - | 74,7 | 8 |
| 1M | 45 | 15 | - | - | 60 | 2 |
| Pure | 59 | 36 | - | - | 95 | - |

précipitation éthanolique, est de nature essentiellement glucidique (84-89 %) avec une légère contamination protéique (3 %). Nous pouvons également remarquer la haute teneur en acides uroniques de la fraction brute. D'autre part, nous n'avons identifié aucun constituant lipidique dans cette fraction.

2.2 Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse des méthylglycosides pertriméthylsilylés, obtenus après méthanolyse de la fraction brute et triméthylsilylation des méthylglycosides permet, d'identifier 9 monosaccharides :

- 4 monosaccharides neutres : le glucose, le galactose, le mannose, ainsi que le rhamnose.
- 2 monosaccharides acides, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique.
- du galactose possédant un résidu de pyruvate lié en position 4 et 6 du monosaccharide (identification Fig. 22, p. 134).
- 1 monosaccharide aminé, la glucosamine.

Le méthanol chlorhydrique (0,5 N, 80°C, 24 h) permet de libérer 30,7% de monosaccharides (Tableau VI, p. 118). Ce faible rendement de libération des monosaccharides est dû à la présence d'un taux important d'acides uroniques. En effet, la liaison uronosidyle est particulièrement stable, ce qui se manifeste par une libération de 6,5 % de ces monosaccharides acides par méthanolyse, alors qu'on en dose de 32,5 % à 39 % par colorimétrie. La quantité d'oses neutres libérés

Tableau VI : Compositions centésimales en monosaccharides de la fraction brute, des fractions obtenues après chromatographie d'échange d'ions et de la fraction pure, déterminées après méthanolyse (MeOH/HCl, 0,5 N, 24 h, 80°C) et analyse des monosaccharides sous forme de méthylglycosides triméthylsilylés.

| Fraction | Monosaccharides | | | | | | | | Total % |
|----------|-----------------|------|-----|-----|--------------------------------|-------|-------|--------------------|---------|
| | Rham | Glc | Gal | Man | GalX ₄ ⁶ | GlcUA | GalUA | GlcNH ₂ | |
| Brute | 0,25 | 13 | 5,3 | 1 | 4,3 | 4 | 2,5 | 0,35 | 30,7 |
| Neutre | - | 29 | - | 35 | - | 4 | - | 2 | 70 |
| 100mM | - | 3,5 | 1 | 8,5 | 0,5 | 0,35 | - | - | 13,8 |
| 200mM | - | 6,3 | 2,6 | 1,7 | 0,5 | 1,1 | 0,3 | - | 12,5 |
| 300mM | - | 15,3 | 7,8 | tr | 4 | 4,4 | 3 | - | 34,5 |
| 400mM | - | 6,5 | 3,2 | 0,5 | 1,6 | 2 | 0,7 | - | 14,5 |
| 500mM | 4 | 2 | 2,8 | 5,2 | 1,3 | 0,6 | tr | 4,8 | 20,7 |
| 1M | 0,8 | 2,2 | 1,1 | 1,1 | 0,1 | 0,5 | - | 1,1 | 6,9 |
| Pure | - | 12,1 | 5,9 | 0,2 | 3,8 | 4,1 | 2,7 | - | 28,8 |

(19,5 %), est également plus faible que celle dosée par colorimétrie (40,6 % - 50,6 %). Par hydrolyse et analyse des acétates d'alditols (**Tableau VII, p. 120**), la quantité d'oses neutres dosés est équivalente à celle déterminée après méthanolyse.

3. Purification du polysaccharide.

La présence de 3 % de protéines d'une part et la charge en acides uroniques du polymère d'autre part, nous ont incité à utiliser une résine échangeuse d'anions (DEAE) pour effectuer la purification de la fraction brute.

3.1 Chromatographie d'échange d'ions sur colonne de gel de DEAE Trisacryl.

La fraction brute après solubilisation dans le tampon d'élution (Tris/HCl, 50 mM, pH = 8,6) a été chromatographiée par application d'un gradient discontinu et croissant (100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 1 M) de NaCl dans le tampon. Chacune des fractions a été analysée pour sa composition centésimale en oses et en protéines (**Tableau V, p. 116**), ainsi que pour ses compositions centésimales en monosaccharides, après méthanolyse et triméthylsilylation (**Tableau VI, p. 118**) et après hydrolyse, réduction et peracétylation (**Tableau VII, p. 120**).

L'application d'une concentration en chlorure de sodium de 300 mM dans le tampon permet de récupérer une fraction majoritaire (59 %) exempte de protéines et d'osamines. Elle contient environ 1/3 d'acides uroniques pour 2/3 d'oses neutres. La méthanolyse permet de libérer 34,5 % de monosaccharides dont le rhamnose est absent. L'hydrolyse

Tableau VII : Compositions centésimales en monosaccharides de la fraction brute , des fractions obtenues après chromatographie d'échange d'ions et de la fraction pure, déterminées après hydrolyse (ATFA 4N, 4 h, 100°C), réduction et peracétylation.

| Fraction | Monosaccharides | | | | | Total% |
|----------|-----------------|------|------|-----|--------|--------|
| | Rham | Glc | Gal | Man | GlcNAC | |
| Brute | 1,4 | 6,3 | 10,7 | 2 | 0,8 | 20,5 |
| Neutre | - | 30 | 1,4 | 50 | tr | 81,4 |
| 100mM | - | 6,5 | 3 | 16 | - | 25,5 |
| 200mM | - | 9 | 7,5 | 3 | - | 19,5 |
| 300mM | - | 15 | 15 | tr | - | 30 |
| 400mM | - | 12,5 | 18 | 1 | - | 31,5 |
| 500mM | 9 | 2 | 6 | 6 | 2 | 25 |
| 1M | 1,5 | 4,5 | 4,5 | 3 | - | 13,5 |
| Pure | - | 16,7 | 15,2 | 1,1 | - | 33 |

(ATFA, 4 N, 4 h, 100°C) libère 30 % d'oses neutres où le galactose et le glucose sont en rapport équimoléculaire, avec des traces de mannose. Les protéines sont retrouvées dans les fractions éluées par 200 mM et 400 mM en NaCl. Ces deux dernières fractions ne semblent pas être fondamentalement différentes de la fraction majoritaire. En effet, une hydrolyse partielle effectuée par de l'ATFA 2 N, 2 h, à 100°C donne, par chromatographie de partage sur couche mince de silice, des profils oligosaccharidiques similaires à celui obtenu avec la fraction éluee par une concentration de 300 mM en NaCl, traitée de la même manière. Cependant, ces deux fractions 200 mM et 400 mM ont une charge en acide uronique différente et contiennent des protéines. On peut noter que la quantité d'acides uroniques de chaque fraction augmente en fonction de la concentration en NaCl jusqu'à la fraction 500 mM. Nous ne pouvons expliquer à ce stade de l'étude, le comportement chromatographique incohérent des fractions 500 mM et 1 M. Les osamines sont retrouvées dans trois fractions : la fraction neutre (constituée pour l'essentiel de glucose et de mannose) et les fractions 500 mM et 1M. On peut supposer que le rhamnose et la glucosamine proviennent de la paroi bactérienne. Le mannose observé dans la fraction neutre provient sans doute des mannanes présents dans l'extrait de levure du milieu de culture.

3.2 Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose 4B.

L'homogénéité de la fraction 300 mM, obtenue après chromatographie d'échange d'ions, a été étudiée par chromatographie de gel filtration. Cette fraction donne, sur colonne de Sepharose 4B, une fraction pure, incluse dans le gel, détectée par réfractométrie et par

dosage au phénol sulfurique (**Fig. 15, p. 123**). Nous pouvons remarquer, d'autre part, la présence à l'exclusion d'une fraction minime détectée en UV à 280 nm et une fraction au volume total qui correspond à l'élution de sels.

Nous pouvons observer sur la même figure le comportement chromatographique de la fraction brute sur cette dernière colonne. Cette fraction est totalement exclue du gel, les protéines étant coéluées avec le composant glucidique. Ce comportement chromatographique de la fraction brute est sans doute dû à des interactions polysaccharide acide-protéine ou polysaccharide-polysaccharide qui augmentent la taille des édifices moléculaires. L'élution de la fraction polysaccharidique 300 mM de la colonne de gel filtration sous la forme d'un pic étalé, indique que le polymère est constitué d'une large gamme de masses moléculaires.

Pour les études suivantes, la fraction polysaccharidique pure correspond au pic d'allure gaussienne obtenu après gel filtration.

4. Caractérisation du polysaccharide purifié.

4.1. Electrophorèse en gel d'agarose.

L'homogénéité de la fraction pure a été étudiée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,5 % (**Figure 16, p. 124**). La différence de comportement électrophorétique entre la fraction brute, qui traîne dans le gel, et la fraction pure qui donne une bande homogène va dans le sens de la pureté de cette dernière. D'autre part, nous pouvons observer que le seuil de détection du polysaccharide, par coloration au bleu alcyan, est de 5 µg.

Densité optique

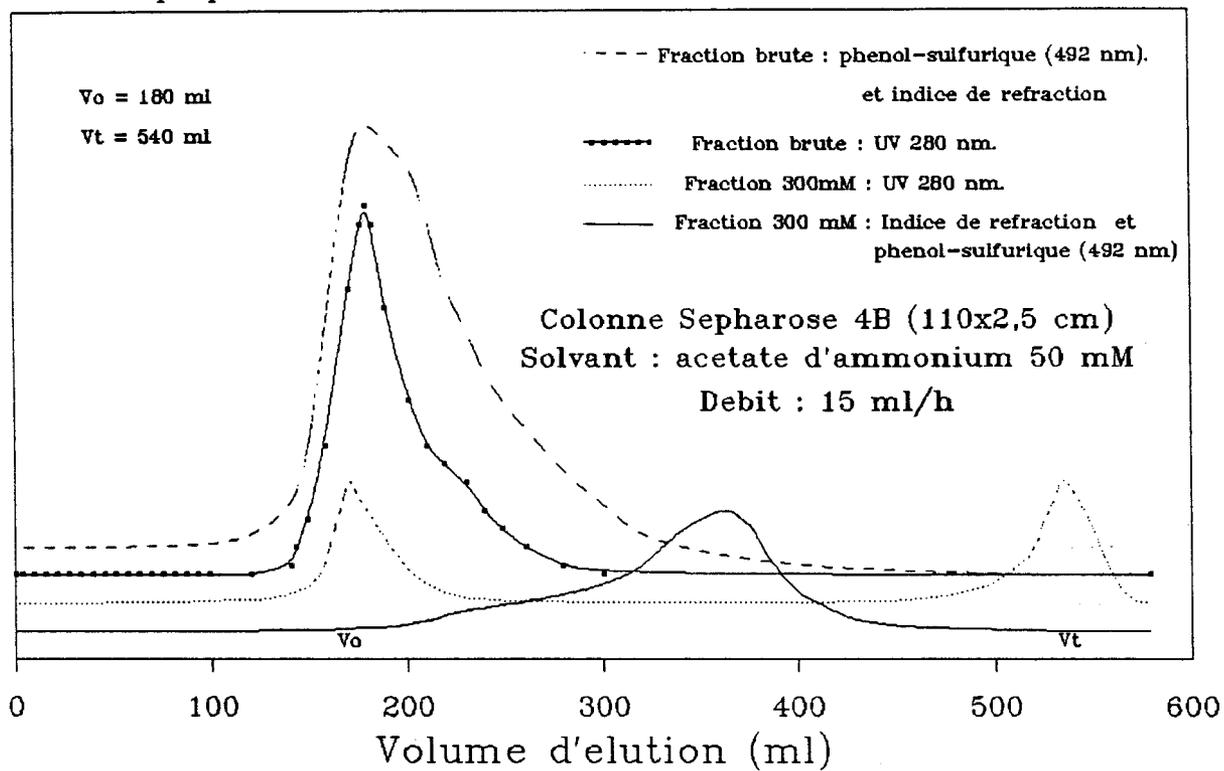


Figure 15 : Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose 4B de la fraction brute et de la fraction 300 mM.

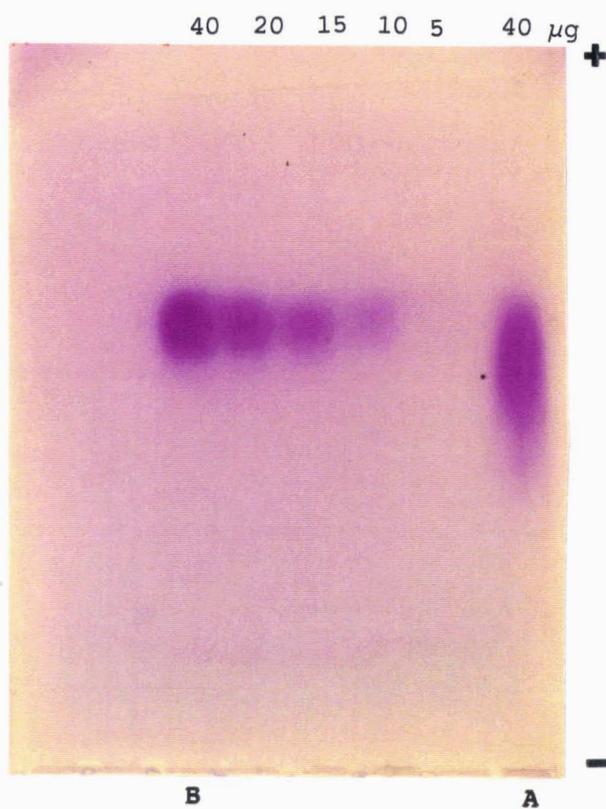


Figure 16 : Electrophorèse en gel d'agarose à 0,5 % de la fraction brute (**A** : 40 µg) et de la fraction purifiée (**B** : 5, 10, 15, 20, 40 µg).

4.2. Détermination du poids moléculaire.

Le poids moléculaire apparent de la fraction pure a été déterminé par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose 4B, après avoir étalonné la colonne avec des témoins de dextran de différents poids moléculaires. Le report du volume d'élution du polysaccharide, correspondant au sommet du pic chromatographique, permet de déterminer une masse moléculaire apparente de 1100 kDa pour notre hydrocolloïde (Fig. 17, p. 126).

4.3. Analyse par spectroscopie Infra-Rouge

L'analyse du spectre d'absorption Infra-Rouge du polysaccharide pur permet de révéler 4 bandes caractéristiques de fonctions chimiques (Fig. 18, p. 127). Les bandes centrées à 1400-1450 cm^{-1} et à 1600-1650 cm^{-1} sont caractéristiques des formes ionisées des fonctions carboxyliques ; ce sont des bandes de vibration de valence ou d'élongation asymétrique (stretching) de la fonction carbonyle C=O. Les deux bandes centrées à 1735 cm^{-1} et à 1250 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations du carbonyle C=O et de la liaison C-O-C, d'un ester COOR. Cette dernière analyse ne permet pas d'attribuer cette bande d'absorption à un ester vrai ou à une lactone.

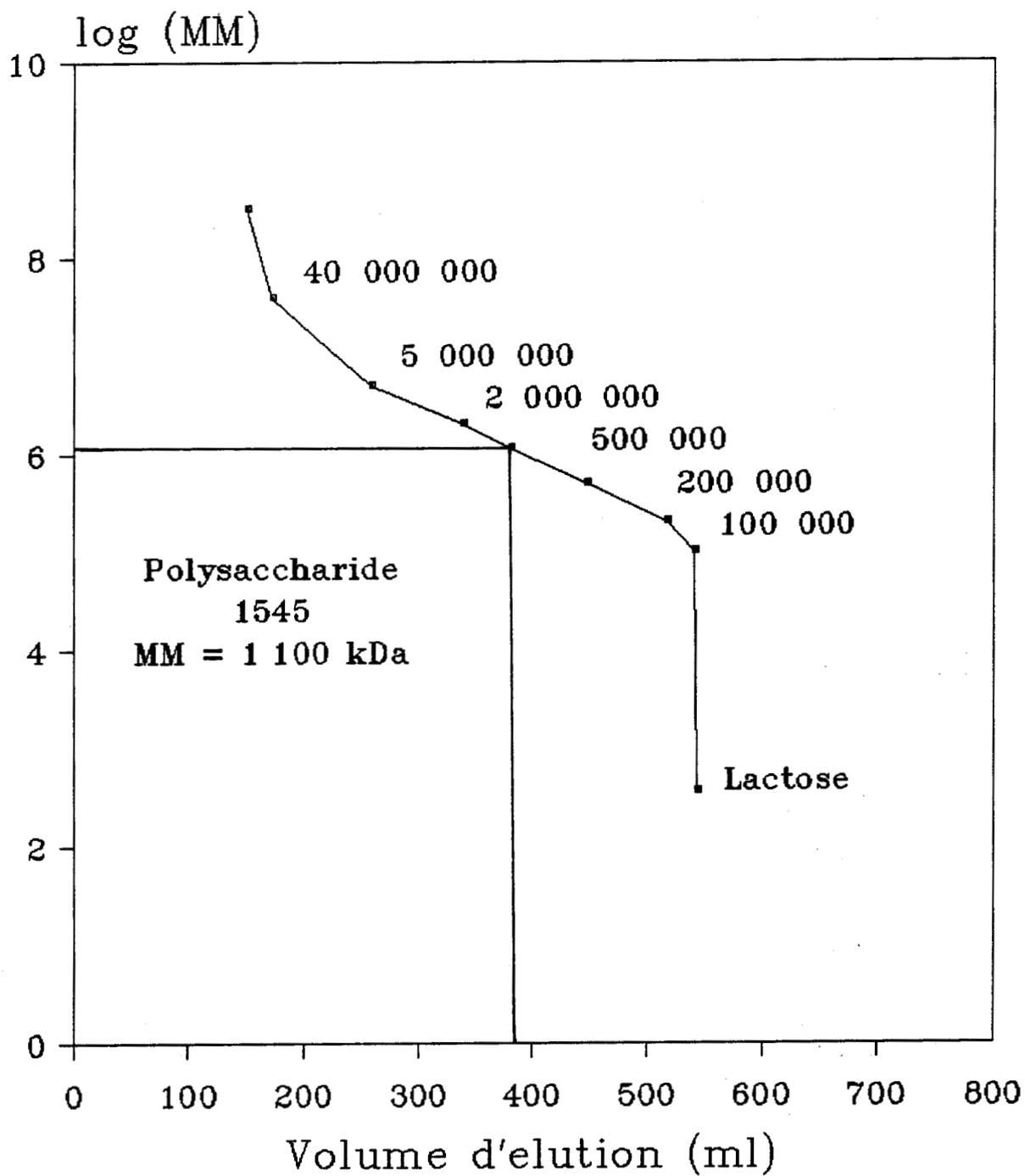


Figure 17 : Estimation du poids moléculaire du polysaccharide 1545 par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Sépharose 4B.

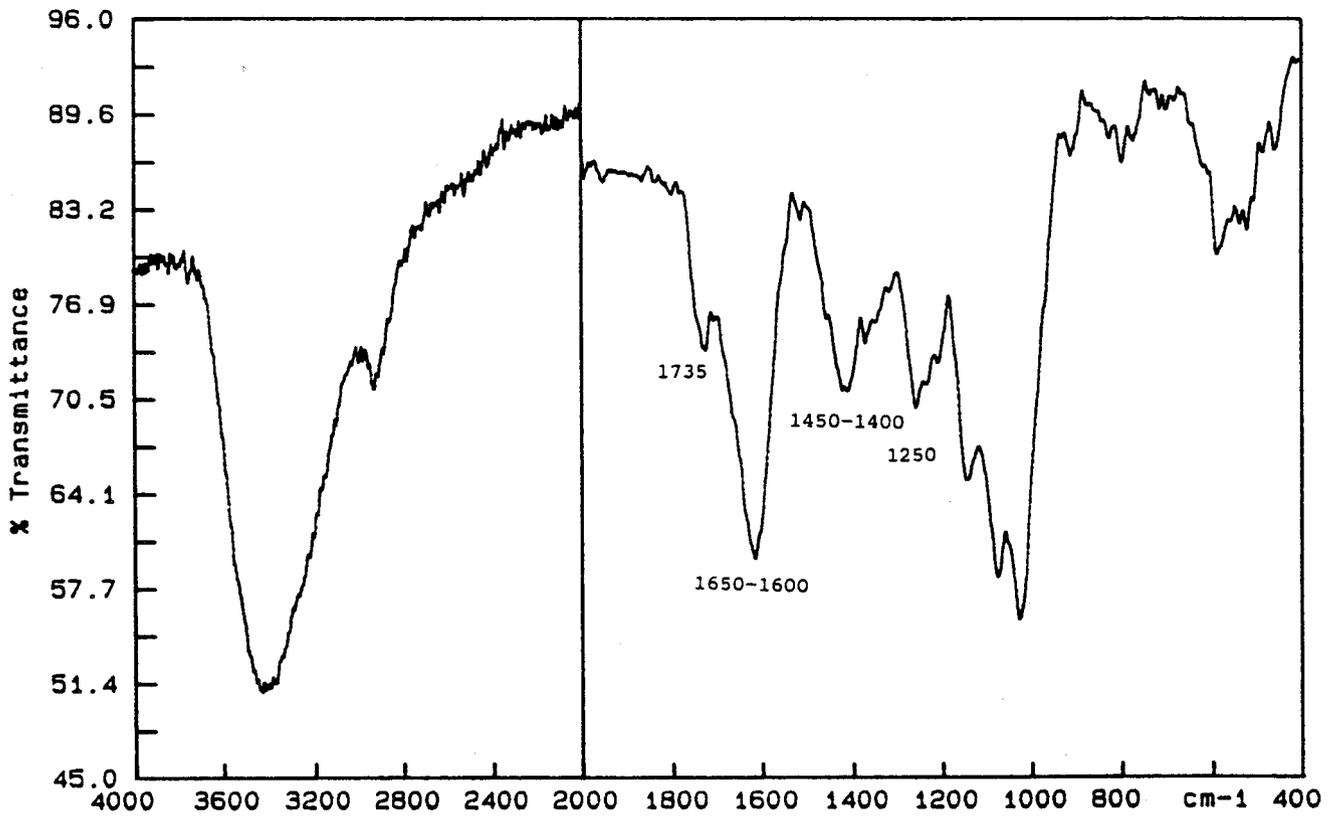


Figure 18 : Spectre d'absorption Infra-Rouge du polysaccharide

1545.

4.4. Pouvoir optique rotatoire.

Le polysaccharide purifié, à une concentration de $1,84 \cdot 10^{-3}$ g/cm³ donne une déviation de 0,215 ; ce qui implique que le pouvoir optique rotatoire du polysaccharide est :

$$[\alpha]_{\text{DNa}}^{20} = + 116,8^{\circ}.$$

5. Composition qualitative et quantitative du polysaccharide purifié.

5.1 Dosages centésimaux.

La composition centésimale du polysaccharide est donnée dans le Tableau V (p. 116). Le polymère (fraction pure) est composé d'oses neutres et d'oses acides dans un rapport 3/2. Il ne contient ni osamines ni protéines, ni lipides.

5.2 Recherche chromatographique des substituants de nature non glucidique et des acides uroniques.

a. Chromatographie sur colonne d'exclusion d'ions.

La Figure 19 (p. 129) illustre le résultat de la chromatographie sur un mélange témoin (A) et sur le polysaccharide hydrolysé (B) (ATFA, 4 N, 4 h, 100°C). Pour le polysaccharide hydrolysé, à partir du point d'injection, on observe un premier pic intense qui correspond à l'agent

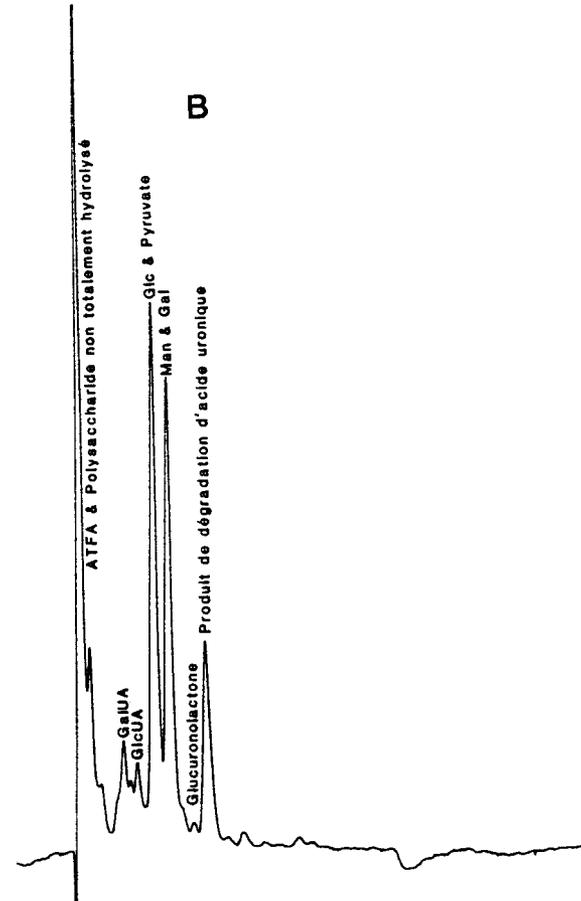
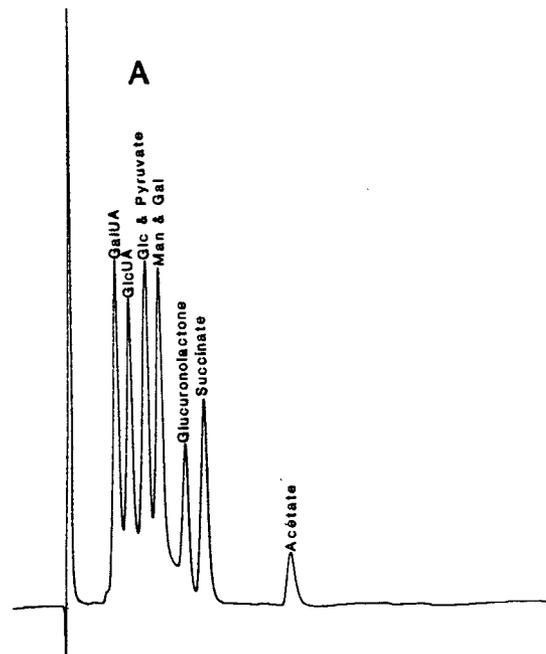


Figure 19 : Chromatographie liquide haute performance sur colonne d'exclusion d'ions HPX 87H Aminex (300x7,8 cm, Biorad, forme H⁺). **A** : Mélange témoin. **B** : Polysaccharide hydrolysé (ATFA, 4 N, 4 h, 100°C).

d'hydrolyse et à du polysaccharide partiellement hydrolysé. Cette technique permet de mettre en évidence la présence de deux acides uroniques, les acides glucuronique et galacturonique. Ces deux monosaccharides sont suivis par deux pics qui ne peuvent être attribués précisément. En effet, dans le premier, le glucose et le pyruvate coéluent, alors que dans le deuxième, ce sont le mannose et le galactose. L'identification de faibles quantités d'acide glucuronique et galacturonique, comparée aux résultats des dosages colorimétriques, confirme le faible taux d'hydrolyse des liaisons uronosidyles.

b. Chromatographie en phase gazeuse des acides organiques.

L'analyse du chromatogramme de phase gazeuse (Fig. 20, p. 131) permet d'identifier et de doser de l'acide pyruvique. Celui-ci représente 9 % du polysaccharide.

5.3. Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.

a. Après méthanolyse et triméthylsilylation.

L'utilisation du méthanol chlorhydrique 0,5 N, à 80°C pendant 24 h, permet de mettre en évidence, dans le polysaccharide, la présence de 5 monosaccharides différents (Fig. 21, p. 132) : deux acides uroniques, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique ; deux oses neutres, le glucose et le galactose, et du galactose pyruvaté en positions 4 et 6. La position de l'éthylidène sur le galactose a été déterminée par comparaison de son spectre de masse en mode impact

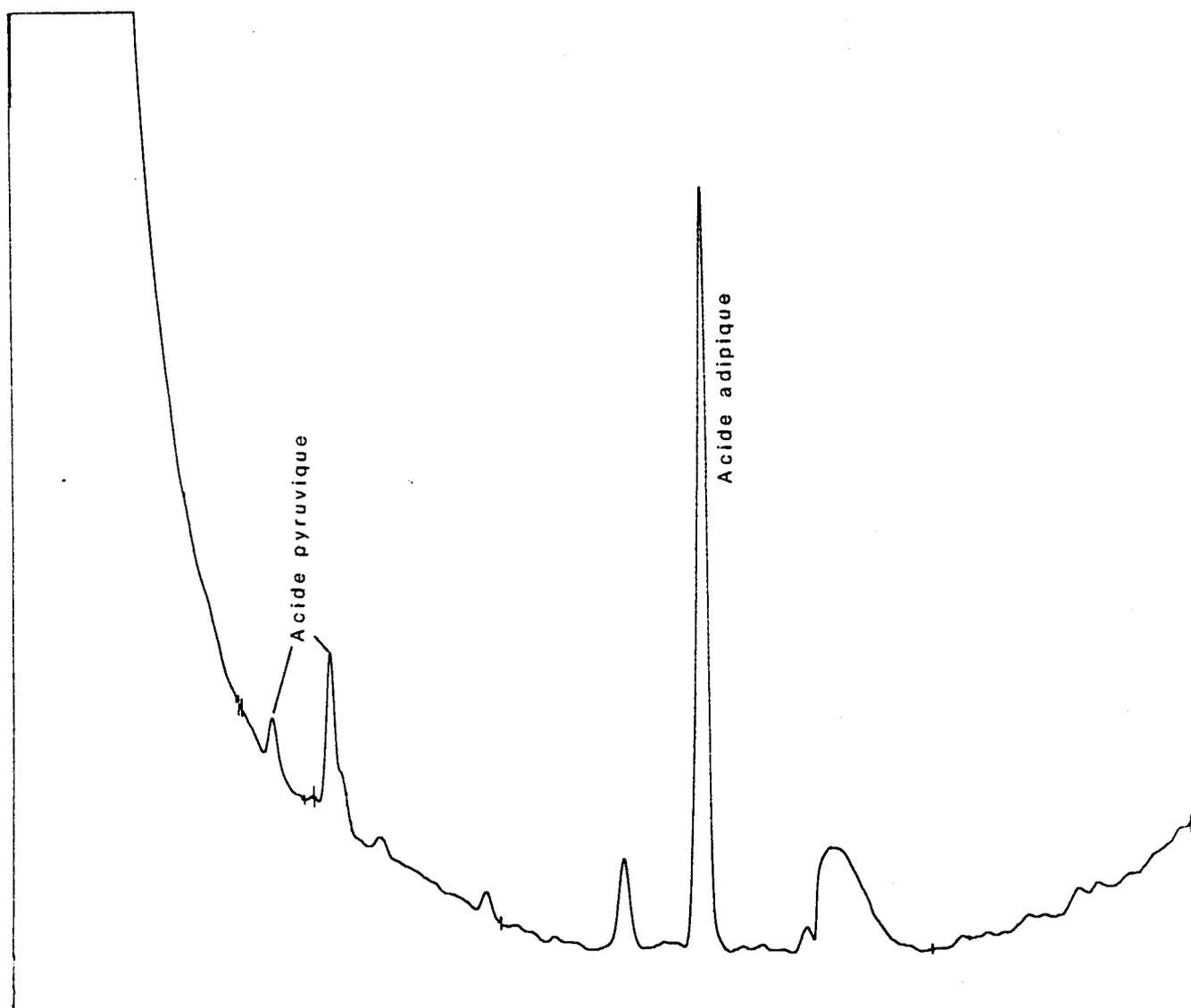


Figure 20 : Chromatographie en phase gazeuse, sur colonne de Carbowax 20 M, des acides organiques obtenus à partir du polysaccharide 1545. **A** : Acide pyruvique. **B** : Acide adipique (témoin interne).

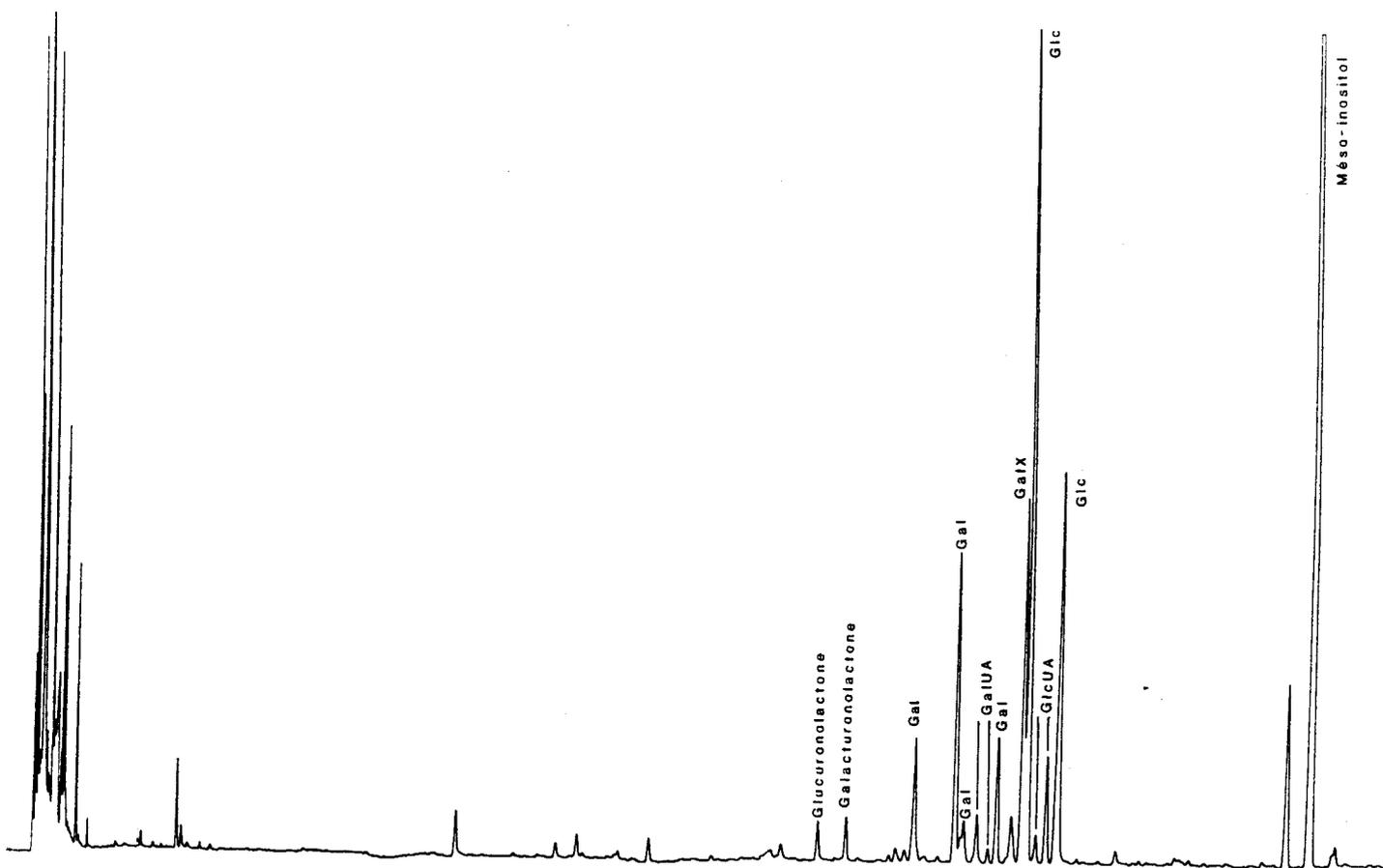


Figure 21 : Chromatographie en phase gazeuse, sur colonne de type OV 101 (25 m x 0,2 mm DI), des méthylglycosides triméthylsilylés obtenus après méthanolyse du polysaccharide 1545 (MeOH/HCl, 0,5 N, 24 h, 80°C).

électronique à ceux de témoins (Fig. 22, p. 134). Le Tableau VIII (Colonne A, p. 135) donne la composition molaire en monosaccharides du polymère. On peut observer que le rendement de méthanolyse est de 30 %, ceci s'explique par le fait que le méthanol chlorhydrique 0,5 N, 24 h à 80°C ne permet pas de couper de façon quantitative les liaisons uronosidyles.

Dans le but d'augmenter les rendements de libération en monosaccharides, nous avons utilisé du méthanol chlorhydrique plus concentré en acide. Ainsi, le méthanol chlorhydrique 1,5 N et 3,87 N (80°C, 24 h) libèrent respectivement 58 % et 75 % de monosaccharides (Tableau VIII, colonnes B et C, p. 135). L'expérience utilisant le méthanol chlorhydrique 3,87 N permet la libération de 43,5 % d'oses neutres pour 31,5 % d'oses acides, ce qui se rapproche des résultats des dosages colorimétriques (oses neutres : 59 %, oses acides 36 %). Lorsque l'on effectue la méthanolyse avec le méthanol chlorhydrique 3,87 N, mais à 100°C et pendant 24 h (Tableau VIII, colonne D, p. 135), nous obtenons un excellent rendement puisque nous libérons 64% d'oses neutres et 38% d'acides uroniques. Ces valeurs sont identiques à celles obtenues par colorimétrie. Cette dernière expérience nous permet de donner les rapports molaires en monosaccharides : Gal ; Glc ; GalUA ; GlcUA : 2,7 ; 4 ; 1,1 ; 2,6, respectivement.

b. Après hydrolyse, réduction et peracétylation.

L'hydrolyse du polysaccharide par de l'acide trifluoroacétique 4 N pendant 4 h à 100°C permet de libérer 33 % d'oses neutres alors que l'acide sulfurique, qui est plus agressif, en libère 46 %, ce qui est plus proche de la quantité déterminée par dosage colorimétrique (59 %). Dans les deux cas, on ne met en évidence que deux

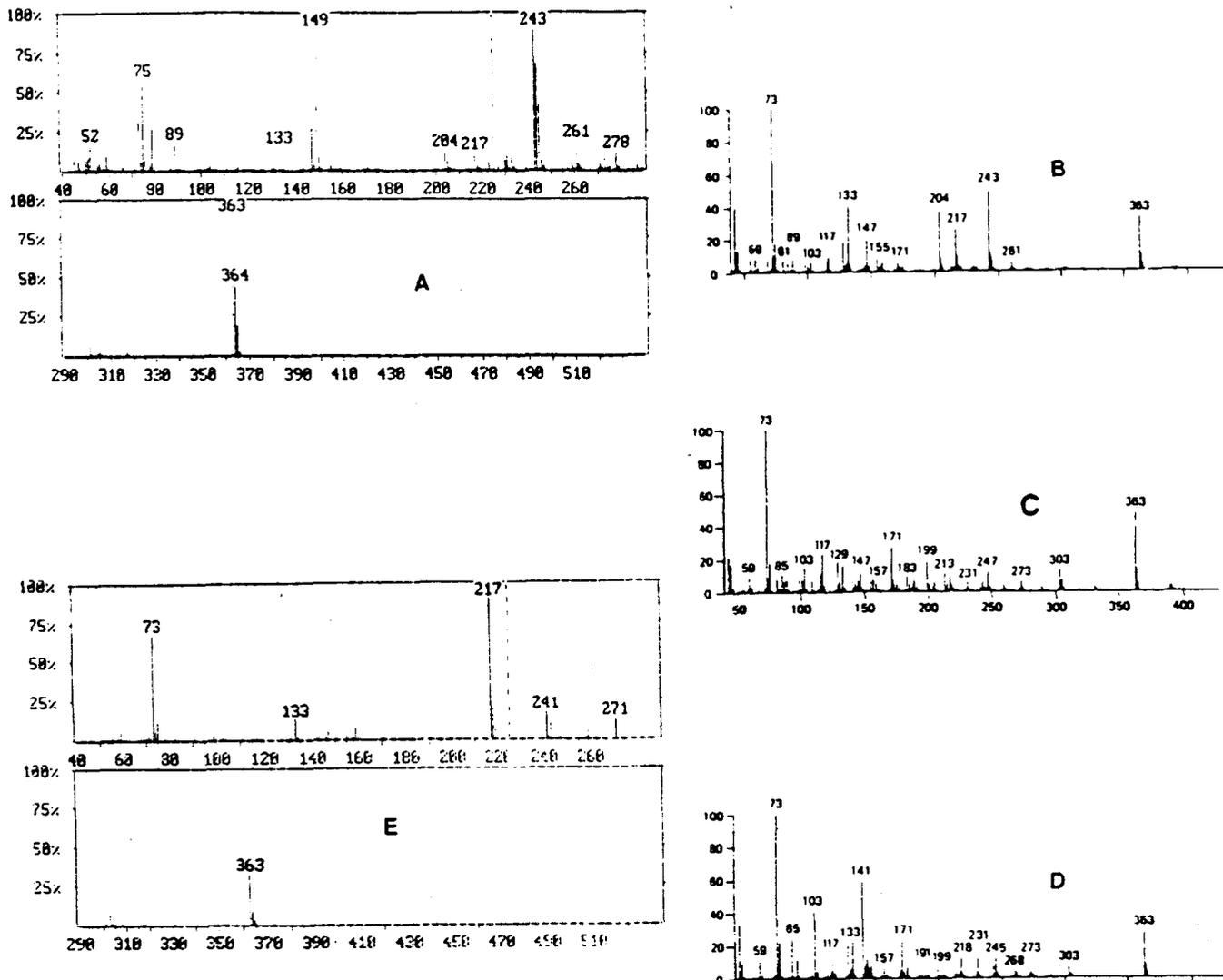


Figure 22 : Détermination de la position de l'éthylidène sur le galactose par comparaison de son spectre de masse en mode impact électronique, à ceux de témoins (B,C,D : Dudman et Lacey, 1986 ; E : monosaccharide obtenu à partir du polysaccharide de *Klebsiella pneumoniae* K12, aimablement fourni par J. P. Josseleau, CERMAV). Les monosaccharides sont sous forme de méthyl-glycosides pertriméthylsilylés.

A : Galactose pyruvaté provenant du polysaccharide.
B : 4,6-O-(1-carboxyéthylidène)-D-galactopyranoside.
C : 2,3-O-(1-carboxyéthylidène)-D-galactopyranoside.
D : 3,4-O-(1-carboxyéthylidène)-D-galactopyranoside.
E : 5,6-O-(1-carboxyéthylidène)-D-galactopyranoside.

Tableau VIII : Composition molaire en monosaccharides¹ du polysaccharide pur natif ou réduit selon diverses méthodes. **A** : Méthanolyse, MeOH/HCl, 0,5 N, 24 h, 80°C ; **B** : Méthanolyse MeOH/HCl, 1,5 N, 24 h, 80°C ; **C** : Méthanolyse, MeOH/HCl, 3,87 N, 24 h, 80°C ; **D** : Méthanolyse, MeOH/HCl, 3,87 N, 24 h, 100°C ; **E** : Hydrolyse, ATFA, 4 N, 4h, 100°C ; **F** : Hydrolyse, H₂SO₄ 72% 5 min, puis 1 N, 6 h ; **G** : Réduction des acides uroniques par le carbodiimide, méthanolyse (0,5 N, 24 h, 100°C) ; **H** : Réduction des acides uroniques par le carbodiimide, hydrolyse (ATFA, 4 N, 4 h, 100°C) ; **I** : Réduction des acides uroniques méthylestérifiés par BH₄K, méthanolyse (MeOH/HCl, 0,5 N, 24 h, 80°C) ; **J** : Réduction des acides uroniques méthylestérifiés par BH₄K, hydrolyse (ATFA, 4 N, 4 h, 100°C).

| Expériences | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
| Sucres | | | | | | | | | | |
| Gal | 1,9 | 1,9 | 2,4 | 2,7 | 3,6 | 4,7 | 3,2 | 3,5 | 1,8 | 3,4 |
| Glc | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Man | tr | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gal X ₆ ^{4*} | 0,9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GlcUA | 1,2 | 1,4 | 2,6 | 2,6 | - | - | - | - | - | - |
| GalUA | 0,8 | 1 | 1,8 | 1,1 | - | - | - | - | - | - |
| Rendement | 28 | 58 | 75 | 100 | 33 | 46 | 55 | 50 | 49 | 76 |
| % | | | | | | | | | | |

Gal X₄^{6*} 4,6-O-(1-carboxyéthylidène)-galactose

¹ Rapports molaires déterminés sur la base de 4 résidus de glucose

types de monosaccharides, le glucose et le galactose dans un rapport équimolaire (Tableau VIII, colonnes E et F, p. 135). Ce résultat diffère quelque peu de celui déterminé par méthanolyse (MeOH/HCl 3,87 N, 100°C, 24 h) qui était Gal : 2,7 ; Glc : 4. Cette technique ne permet malheureusement pas d'identifier les acides uroniques qui se retrouvent ici sous forme d'acides aldoniques peracétylés, dont la fonction acide est libre, et qui par conséquent, sont trop polaires pour être élués de la colonne.

c. Après réduction des acides uroniques.

*** Réduction des acides uroniques au carbodiimide.**

Les deux cycles de réduction successifs que nous avons fait subir au polysaccharide n'ont pas permis d'obtenir un polymère globalement neutre. Après le premier cycle de réduction, on dose encore 10,4 % d'acides uroniques, ce chiffre passe à 5 % après un deuxième cycle de réduction. Les compositions molaires déterminées sur le polymère ayant subi 2 cycles de réduction sont données dans le Tableau VIII (Colonnes G et H, p. 135). On constate que les rendements de méthanolyse et d'hydrolyse doublent mais n'atteignent cependant que 50%.

*** Réduction des acides uroniques selon Dutton et al. (1986).**

Cette technique est fondée sur la réduction, par un borohydrure alcalin, des acides uroniques méthylestérifiés à l'aide de méthanol chlorhydrique (0,5 N, 24 h, 80°C). La dépolymérisation totale du polysaccharide est soit effectuée par méthanolyse, ou par hydrolyse. Les résultats sont donnés dans le Tableau VIII (Colonnes I et J, p. 135). On constate que le rendement atteint 76% lorsqu'on effectue l'hydrolyse.

5.4. Conclusions.

Les conclusions que nous pouvons tirer des différentes expériences de dosages colorimétriques et chromatographiques sont les suivantes :

- Le polysaccharide est constitué de 50 % de monosaccharides neutres et de 40 % d'acides uroniques.
- 10 % du galactose est sous forme 4,6-O-(1-carboxy-éthylidène)-galactopyranose.
- Le polysaccharide contient du galactose, du glucose, du 4,6-O-(1-carboxy-éthylidène)-galactopyranose, de l'acide glucuronique et de l'acide galacturonique dans les rapports molaires suivants : 3 ; 4 ; 1 ; 3 ; 1.

6. Analyse structurale du polysaccharide.

6.1 Méthylation.

a. Méthylation du polysaccharide natif.

L'impossibilité de solvater le polysaccharide natif dans le DMSO, nous a conduit à effectuer, au préalable, une étape de peracétylation. Après alkylation, le polysaccharide perméthylé a été isolé de deux manières différentes, soit par dialyse contre de l'eau distillée, soit par extraction chloroformique. Dans les deux cas, les rendements de méthylation, estimés en poids, sont très faibles (de l'ordre de 5%). Ceci peut être expliqué par une β -élimination des acides uroniques concurrente de leur méthylation. Nous avons identifié, après méthanolyse du polysaccharide perméthylé, du 2,3,4,6-tétra-O-méthyl

glucose, 2 éthers triméthyliques, les 2,3,6-tri-O-méthyl glucose et 2,3,6-tri-O-méthyl galactose, du 2,3-di-O-méthyl-4,6-éthylidène galactose et un éther diméthylique, du 3,6-di-O-méthyl glucose et en plus faible proportion les 2,3 di-O-méthyl glucose et 2,3 di-O-méthyl galactose, ce dernier provenant certainement de l'élimination partielle du groupement pyruvyle du 2,3-di-O-méthyl-4,6-éthylidène galactose pendant la méthanolyse (Tableau IX, colonne A, p. 139). La technique d'identification des éthers méthyliques après méthanolyse ne nous a pas permis d'identifier les éthers méthyliques des acides uroniques. Cette première expérience indique le caractère branché du polysaccharide qui possède à ses extrémités terminales non réductrices du galactose pyruvaté et du glucose. Enfin, ces résultats sont à analyser avec précaution compte tenu du faible rendement de polysaccharide perméthylé, d'une part, et de la difficulté à obtenir une libération quantitative des éthers méthyliques.

b. Méthylation du polysaccharide natif réduit au carbodiimide.

Après réduction de ses fonctions acides, le polysaccharide est perméthylé, méthanolysé et acétylé et les méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés sont identifiés par couplage CPG-MS. Le Tableau IX (Colonne B, p. 139) rassemble les résultats de l'identification des éthers méthyliques.

On observe l'apparition de trois nouveaux éthers méthyliques : du perméthyl galactose qui peut provenir soit de la réduction d'un acide galacturonique en position externe, soit du galactose pyruvaté réduit dont le pyruvate est libéré lors de la méthanolyse ; du 6 mono-O-méthyl glucose dont on ne sait s'il provient d'un résidu de glucose ou d'un acide glucuronique lié en positions 2, 3 et 4 ; du 2,6 di-O-méthyl

Tableau IX : Compositions molaires en méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés libérés à partir de **A** : Polysaccharide natif perméthylé. **B** : Polysaccharide natif réduit par le carbodiimide et perméthylé. **C** : Polysaccharide perméthylé réduit par le borohydrure de lithium.

| Ethers méthyliques ^a | A | B | C | Nature des substitutions |
|---------------------------------|-----|-----|-----|--|
| 2,3,4,6-Glc | ++ | ++ | ++ | Glc— |
| 2,3,4,6-Gal | - | + | + | GalX $\frac{4}{6}$ — |
| 2,3-GalX $\frac{4*}{6}$ | +++ | - | - | GalX $\frac{4}{6}$ — |
| 2,3,6-Gal | +++ | +++ | +++ | $\frac{4}{-}$ Gal— |
| 2,3,6-Glc | +++ | +++ | +++ | $\frac{4}{-}$ Glc— + $\frac{4}{-}$ GlcUA— |
| 2,3-Glc | + | + | +++ | $\frac{4}{-}$ Glc $\frac{6}{ }$ — + $\frac{4}{-}$ GlcUA— |
| 2,3-Gal | + | + | +++ | GalX $\frac{4}{6}$ — |
| 3,6-Glc | ++ | - | - | $\frac{4}{-}$ Glc $\frac{2}{\backslash}$ — |
| 2,6-Glc | - | + | ++ | $\frac{4}{-}$ Glc $\frac{3}{/}$ — |
| 6-Glc | - | + | - | $\frac{4}{-}$ GlcUA $\frac{3}{/}$ $\frac{2}{\backslash}$ — |
| 2-Gal | - | - | +++ | $\frac{4}{-}$ GalUA $\frac{3}{/}$ — |

^a 2,3,4,6-Gal = 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactoside, etc..

* 2,3 di-O-méthyl-4,6-(1-O-carboxy-méthylester-éthylidène)-galactoside

glucose qui peut lui aussi provenir soit d'un glucose substitué en 3 et 4 ou d'un acide glucuronique lié en 3 et 4. Nous n'expliquons pas la disparition du 3,6-di-O-méthyl glucose qui peut constituer un artéfact de méthylation. En effet, il n'est pas non plus identifié lors de l'expérience de réduction au borohydrure de lithium (Tableau IX, colonne C, p. 139).

c. Analyse du polysaccharide perméthylé après réduction par le borohydrure de lithium.

La réduction par le borohydrure de lithium des fonctions carboxyliques estérifiées des acides uroniques implique l'apparition sur le carbone 6 du monosaccharide d'une fonction alcool primaire qui est ensuite acétylée. La colonne C du Tableau IX (p. 139) rassemble les éthers méthyliques qui ont été identifiés. On constate l'apparition d'un 2 mono-O-méthyl galactose qui nous n'avions identifié pas lors de l'analyse des éthers méthyliques du polysaccharide réduit par le carbodiimide et perméthylé (colonne B), ce qui implique l'existence dans le polysaccharide d'un acide galacturonique substitué sur ses positions 3 et 4. Cette analyse confirme aussi la présence de 2,6 di-O-méthyl glucose qui provient bien du glucose substitué en 3 et 4 et non de l'acide glucuronique (l'acide uronique réduit après méthylation ne peut être méthylé en position 6. La disparition du 6 mono-O-méthyl glucose (identifié dans le polysaccharide réduit par le carbodiimide et perméthylé, (Tableau X, colonne B, p. 139) indique qu'il provient d'un acide glucuronique substitué en positions 2, 3 et 4. D'autre part, par rapport à la réduction au carbodiimide, on observe la diminution du 2,3,6 tri-O-méthyl glucose et l'augmentation du 2,3 di-O-méthyl glucose, ce qui implique l'existence d'un acide glucuronique lié en 4.

Nous n'identifions pas, lors de cette dernière analyse, de 2,3,4 tri-O-méthyl galactose ; ceci implique que le 2,3,4,6 tétra-O-méthyl galactose, identifié lors de l'analyse de perméthylation après réduction du polysaccharide au carbodiimide, ne provient pas d'un acide galacturonique en position externe.

d. Conclusions.

Les conclusions que nous pouvons tirer des analyses des éthers méthyliques obtenus à partir du polysaccharide perméthylé natif, du polysaccharide perméthylé préalablement réduit par le carbodiimide et du polysaccharide perméthylé réduit par le borohydrure de lithium sont les suivantes :

- Le polysaccharide est constitué dans sa chaîne principale de galactose et de glucose substitué en position 4 (identification dans les 3 expériences de 2,3,6-tri-O-méthyl galactose et de 2,3,6-tri-O-méthyl glucose), ainsi que de l'acide glucuronique substitué également en position 4.

- Le polysaccharide semble très branché au niveau des résidus de glucose substitués en position 4 et 6, 2 et 4, 3 et 4, ainsi qu'au niveau de l'acide galacturonique substitué en position 3 et 4 et surtout au niveau de l'acide glucuronique substitué en 2, 3 et 4. Ce dernier résultat est peut-être la conséquence d'une sous-méthylation de ce polymère très anionique et de haute masse moléculaire. Enfin, la présence de 2,3-di-O-méthyl-4,6-(1-O-carboxy-méthylester-éthylidène)-galactoside indique que ce monosaccharide occupe les extrémités terminales non réductrices du polysaccharide.

Les expériences de méthylation effectuées sur ce polysaccharide très anionique (40 % d'acides uroniques) sont marquées par des

rendements faibles en polysaccharide perméthylé, dus certainement à des phénomènes de β -élimination lors de la méthylation. Enfin, les difficultés rencontrées lors de la méthylation, de même que celles survenues lors de la réduction par le carbodiimide (difficultés d'une réduction quantitative des fonctions acide carboxylique), ne nous ont pas permis d'établir les rapports molaires entre les différents éthers méthyliques.

6.2 Dégradation du polysaccharide natif par le lithium métal dans l'éthylène diamine.

a. Rendement.

L'action du lithium dans l'éthylène diamine effectuée sur 25 mg de polysaccharide natif, fournit après purification 12,5 mg d'une fraction résistante. Cette dernière fraction, analysée par chromatographie de partage sur couche mince de silice, par comparaison à des témoins (glucose, galactose, et glucidex 19 : malto-oligosaccharides de degré de polymérisation 1 à 19) (Fig. 23, p. 143), est constituée de monosaccharides neutres, d'oligosaccharides de degré de polymérisation 3 à 4 et d'un matériel macromoléculaire non dégradé, qui ne migre pas.

b. Fractionnement de la fraction résistante à la dégradation par le lithium dans l'éthylène diamine.

La fraction résistante a été chromatographiée sur colonne de gel filtration de type TSK HW40 (Fig. 24, p. 144). 9 fractions ont été obtenues et analysées par chromatographie de partage sur couche mince de gel de silice. La fraction I, (6,6 mg), majoritaire, correspond à du matériel macromoléculaire non dégradé indiquant le faible rendement de

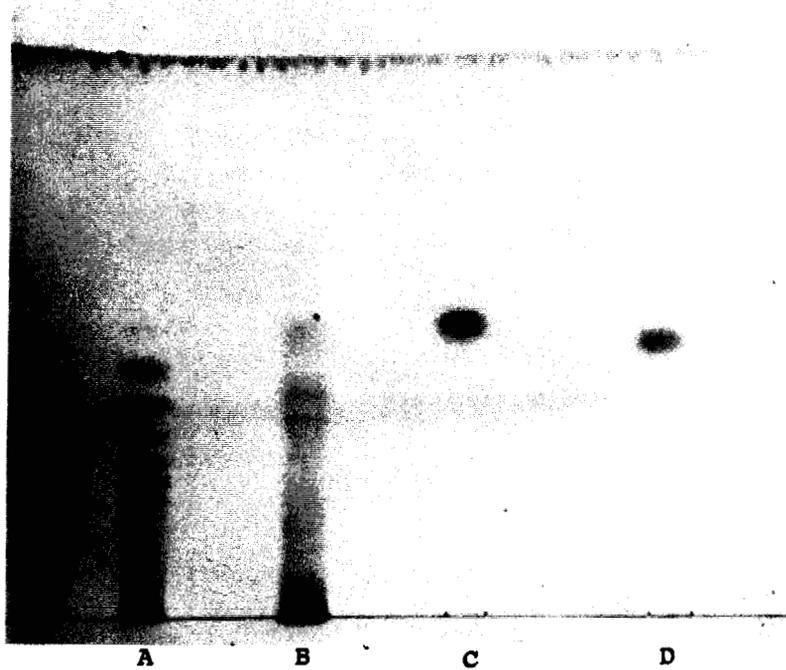


Figure 23 : Chromatographie de partage sur couche mince de gel de silice du polysaccharide traité par le lithium dans l'éthylène diamine. **A** : témoin de malto-oligosaccharides **B** : polysaccharide traité par le lithium, **C** : glucose, **D** : Galactose.

Indice de refraction

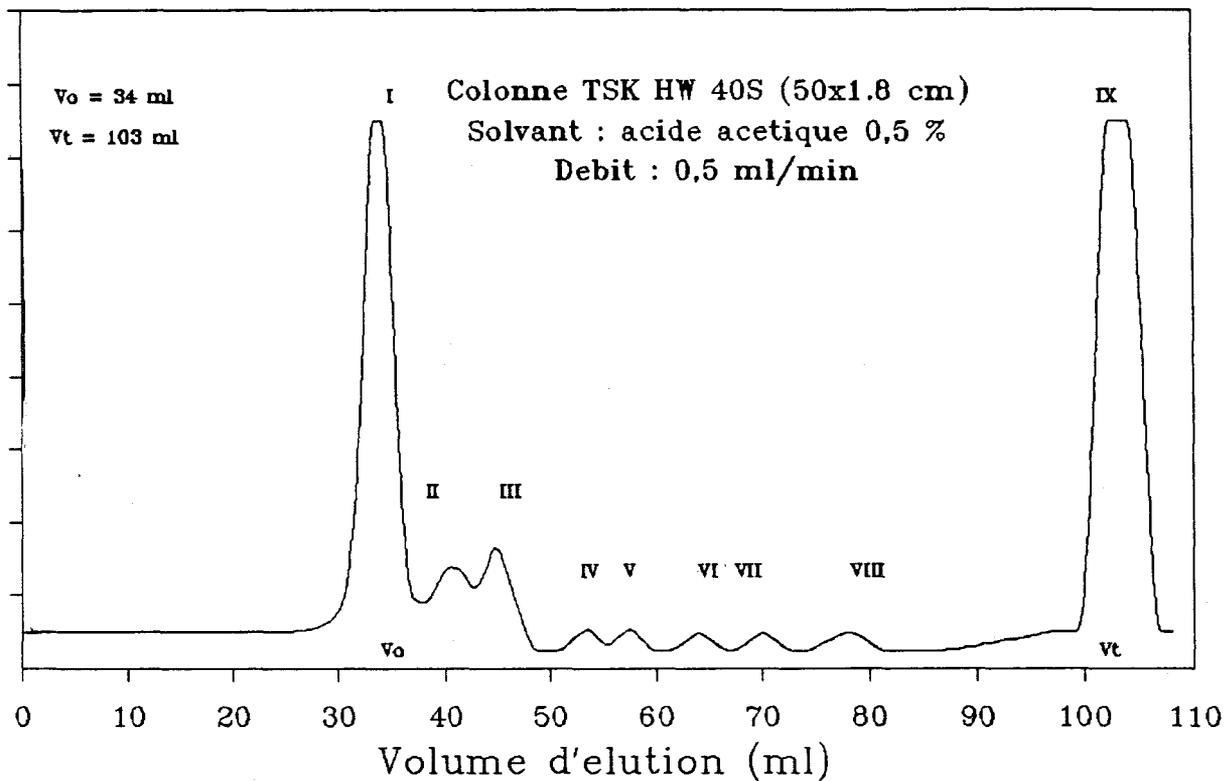


Figure 24 : Chromatographie de gel filtration sur colonne de gel TSK HW 40, du polysaccharide traité par le lithium métal dans l'éthylène diamine.

la réaction. Seule la fraction VI (180 µg) a été isolée dans un état d'homogénéité satisfaisant permettant d'en effectuer l'étude structurale.

c. Etude structurale de la fraction lithium VI.

L'oligosaccharide a été dans un premier temps réduit à l'aide de borodeutérure de potassium, puis méthanolysé et enfin triméthylsilylé. Cette série de réactions nous a permis d'identifier par chromatographie en phase gazeuse, du glucitol. L'oligosaccharide possède donc du glucose en position terminale réductrice. La fraction VI réduite a ensuite été perméthylée et analysée par spectrométrie de masse.

*** Analyse par spectrométrie de masse en mode FAB positif et par couplage CPG-SM en mode ionisation chimique.**

L'analyse des spectres de masse en mode FAB positif (Fig. 25, p. 146) et par couplage CPG-IC-SM (Fig. 25, p. 146) donnent respectivement pour l'oligosaccharide les masse $M+23 = 726$ et $M+18 = 721$. Cet oligosaccharide-alditol perméthylé possède donc une masse $M = 703$ ce qui correspond à deux acides uroniques et un alditol. D'autre part, on peut observer sur les deux spectres la présence d'un fragment de masse $M = 451$, qui correspond à une séquence HexUA-HexUA.

*** Analyse par couplage CPG-SM en mode impact électronique.**

L'oligosaccharide alditol perméthylé, chromatographié à 280°C, est élué en 11 min. Le spectre de masse obtenu est donné dans la Figure 26 (p. 147). L'ion de masse 236 correspond au fragment alditol.

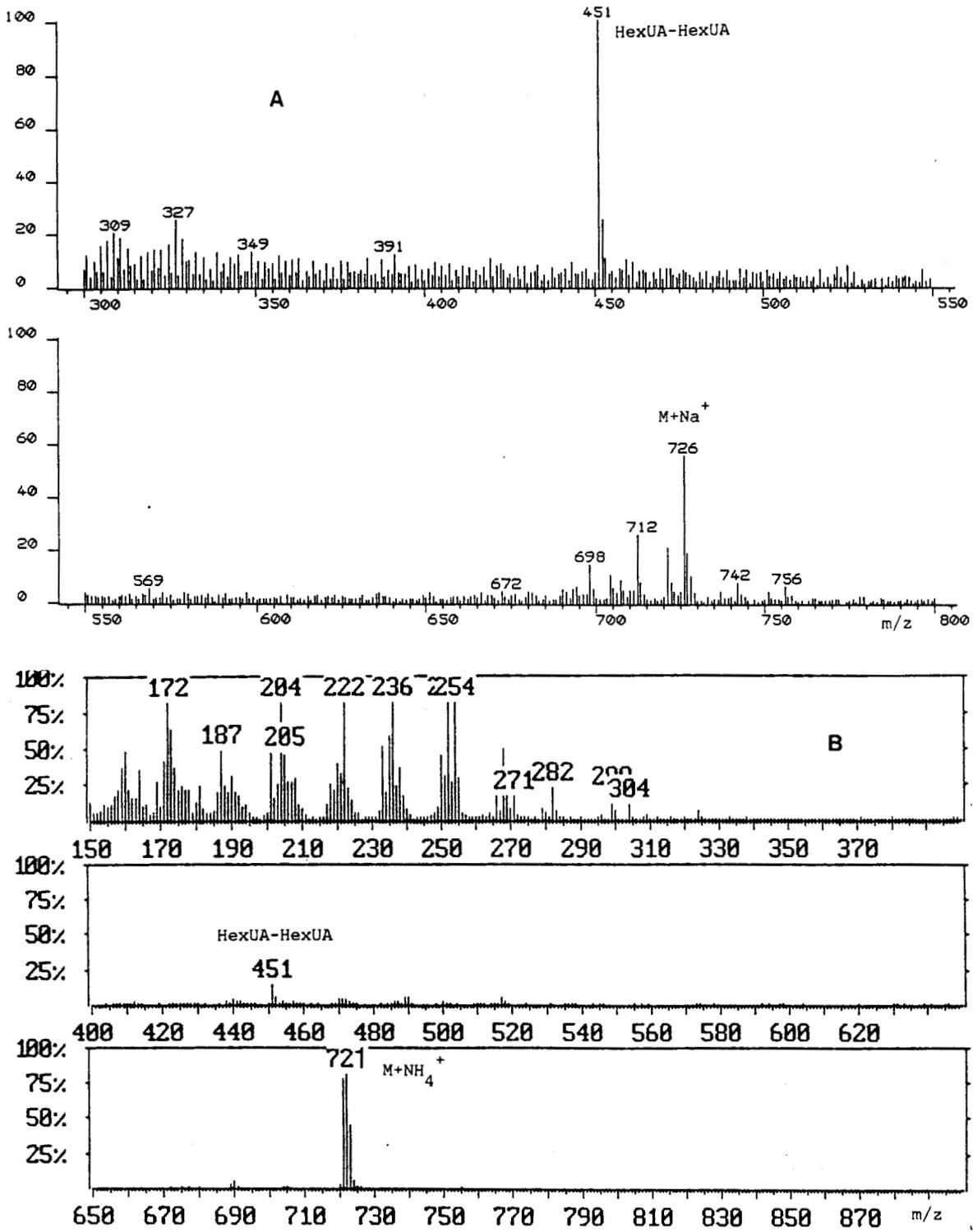


Figure 25 : Spectres de masse de l'oligosaccharide alditol perméthylé Li VI. **A** : FAB positive.
B : CPG-IC-SM.

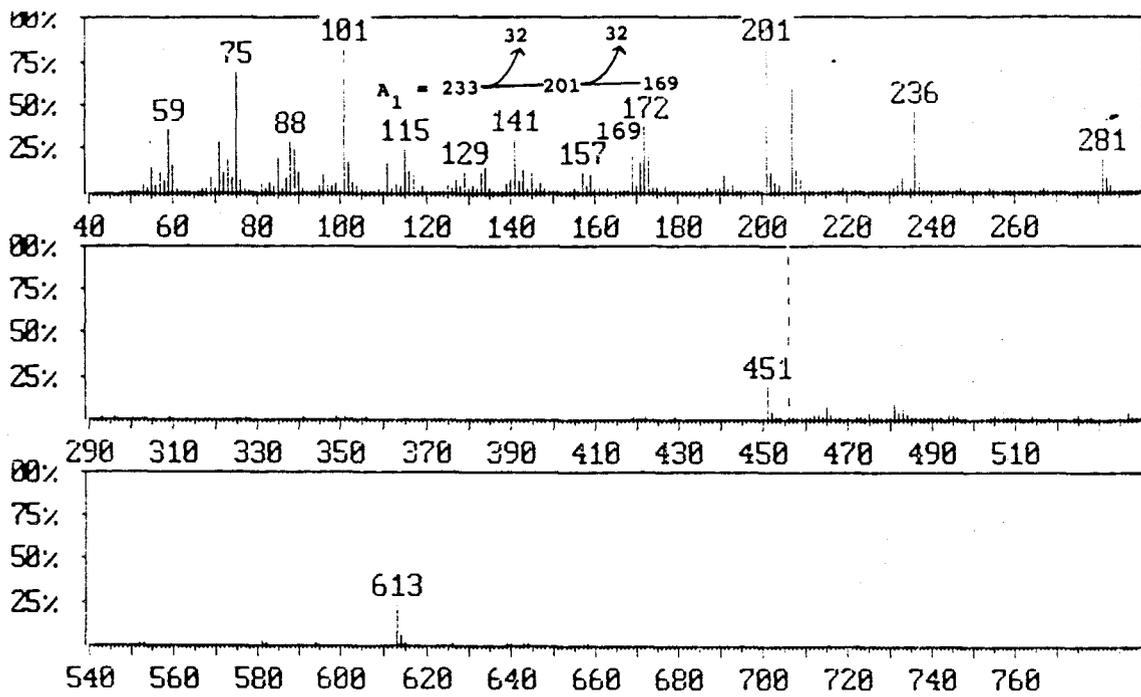
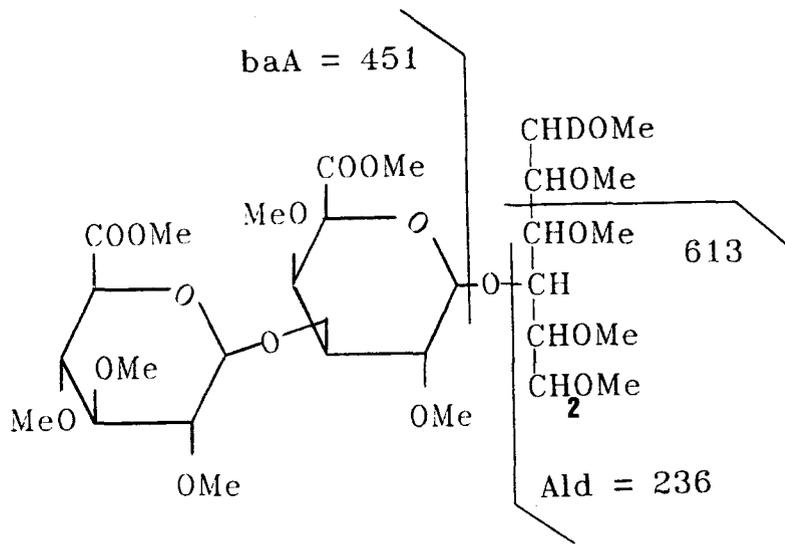


Figure 26 : Spectre de masse, en mode CPG-IE-SM, de l'oligosaccharide alditol perméthylé Li VI.

carbones 2 et 3 du résidu alditol. Ce dernier fragment nous indique que le glucose terminal réducteur est substitué en position 4 par le disaccharide HexUA-HexUA. Une liaison en position 3 se manifesterait par un ion de masse $M = 614$.

Dans le but d'identifier les acides uroniques du trisaccharide et de définir la liaison HexUA-HexUA, le trisaccharide alditol perméthylé a été soumis à une réduction au borohydrure de lithium en milieu anhydre puis à une acétylation. L'oligosaccharide alditol perméthylé et acétylé a été analysé par couplage CPG-SM en mode d'ionisation électronique. Le spectre de masse obtenu (Fig. 27, p. 149) confirme l'analyse précédente : les ions de masse $M = 479$ (baA_1) et $M = 641$ correspondent respectivement aux ions de masse $M = 451$ (baA_1) et $M = 613$ par incrément de $M = 28$, correspondant à la modification des méthylesters des acides uroniques, transformés en alcools primaires acétylés (2×14). L'analyse des éthers méthyliques obtenus par méthanolyse de cet oligosaccharide alditol perméthylé permet de caractériser la présence de 2,3,4 tri-O-méthyl glucose de 2,4 di-O-méthyl galactose et de 1,2,3,5,6 penta-O-méthyl, 4-O-acétyl glucitol. Cette analyse permet de donner la séquence suivante pour le trisaccharide:



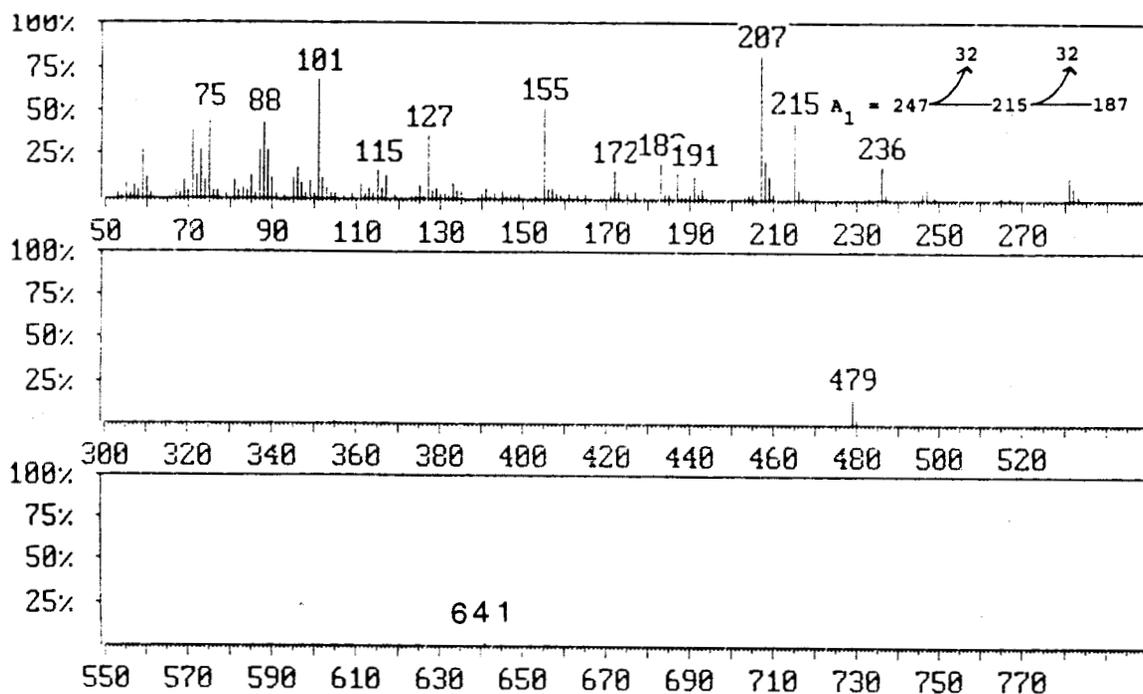
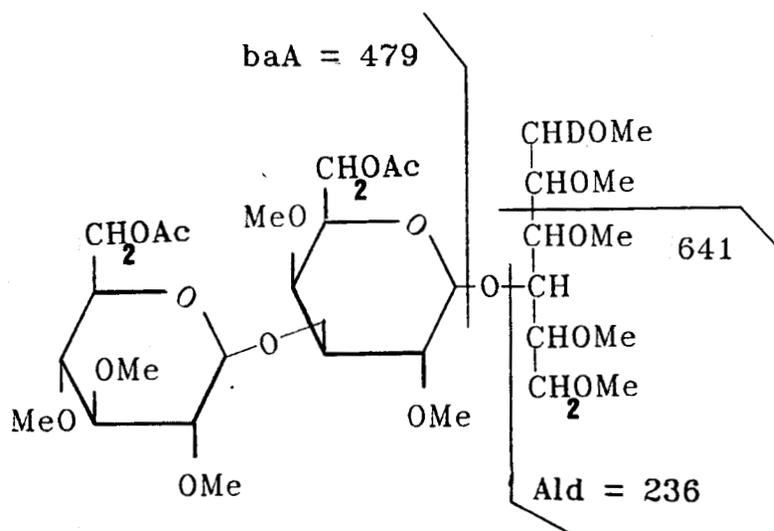


Figure 27 : Spectre de masse en mode CPG-IE-SM de l'oligosaccharide alditol perméthylé Li VI, réduit par le borohydrure de lithium

d. Conclusions.

L'attaque du polysaccharide natif par le lithium dans l'éthylène diamine a permis d'obtenir un seul oligosaccharide significatif et ceci, en petite quantité. Cette technique de coupure spécifique, développée par **Mort et Bauer (1982)**, donne des résultats intéressants quand le polymère possède en moyenne un à 2 résidus d'acide uronique (substitué en position 4) par unité de répétition. La très grande hétérogénéité de substitution des acides uroniques du polysaccharide (**Voir chapitre 6.1.**), ainsi que des problèmes de solubilisation dans l'éthylène diamine, sont sans doute responsable du faible rendement de rupture des liaisons glycosidiques.

6.3 Hydrolyse partielle.

a. Cinétique d'hydrolyse.

Une cinétique d'hydrolyse par de l'acide trifluoroacétique 2 N a été réalisée sur le polysaccharide de façon à déterminer le temps d'hydrolyse permettant d'obtenir un maximum d'oligosaccharides. Les différentes fractions correspondant aux temps d'hydrolyse 0, 30 min, 1 h, 1 h 30, 2 h, 2 h 30, 3 h, 3 h 30, 4 h, 4 h 30, 5 h, 5 h 30, 6 h ont été analysées par chromatographie de partage sur couche mince de silice (**Fig. 28, p. 151**). On peut constater qu'au bout de 1 h, la quasi totalité du polysaccharide est dépolymérisée. On peut mettre en évidence sur cette couche mince la présence de 4 entités oligosaccharidiques majeures et deux composés de mobilité chromatographique supérieure correspondant aux monosaccharides neutres et aux acides hexuroniques.

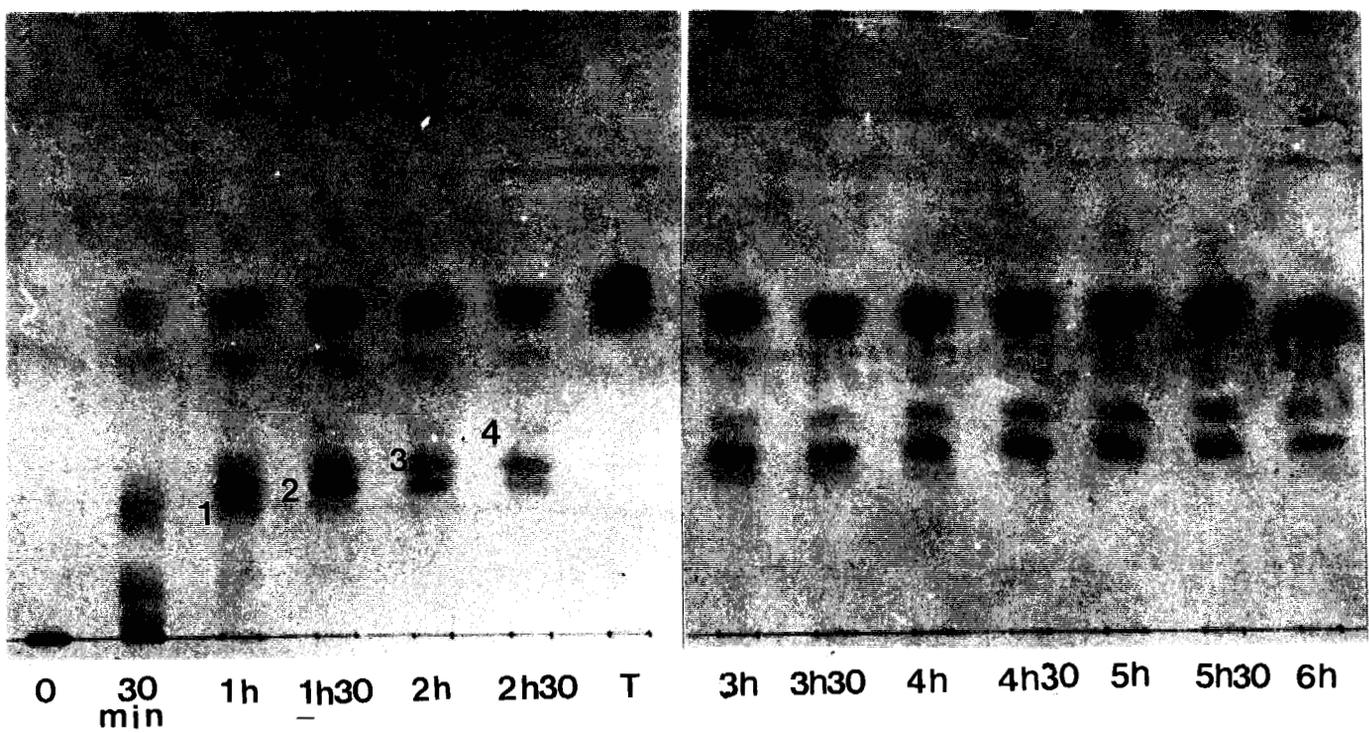


Figure 28 : Cinétique d'hydrolyse, sur couche mince de gel de silice, du polysaccharide hydrolysé par de l'acide trifluoroacétique 2 N. **T** : témoin de mannose, glucose et galactose.

En ce qui concerne les fractions oligosaccharidiques, la première entité (1), la plus lourde, disparaît au bout de 2 h. La deuxième entité (2) apparaît dès 1 h d'hydrolyse pour disparaître au bout de 4 h 30'. La troisième entité (3) apparaît au bout de 1 h et est encore présente à 6 h d'hydrolyse. La quatrième entité (4) apparaît au bout de 3 h d'hydrolyse. L'apparition de ces oligosaccharides au cours de l'hydrolyse partielle reflète les stabilités relatives des liaisons glycosidiques. Le chromatogramme relativement simple que l'on obtient indique la présence, dans le polymère, de séquences oligosaccharidiques très résistantes à l'hydrolyse. En effet, ces séquences persistent après 6 h d'hydrolyse. Ces séquences résistantes, riches en acides hexuroniques, proviennent certainement de séquences plus lourdes, en raison de la présence d'oses neutres qui sont libérés au cours de l'hydrolyse.

Pour notre étude, nous avons choisi de soumettre le polysaccharide à un temps d'hydrolyse de 2 h, qui se caractérise par la libération de deux entités oligosaccharidiques majeures.

b. Etude de l'hydrolysât partiel par spectrométrie de masse en mode FAB négative (produit natif), en mode FAB positive (produit perméthylé) et en mode MS-MS.

*** Analyse en FAB négative.**

Cette analyse a été effectuée, directement, sur l'hydrolysât acide partiel (Fig. 29, p. 153). Nous distinguons dans ce spectre, la présence de trois régions : une région correspondant à des entités trisaccharidiques, qui se caractérise par la présence des ions $[M-H]^- = 531$ et $(M-H+Na)^- = 543$, constitués de 2 acides uroniques et d'un

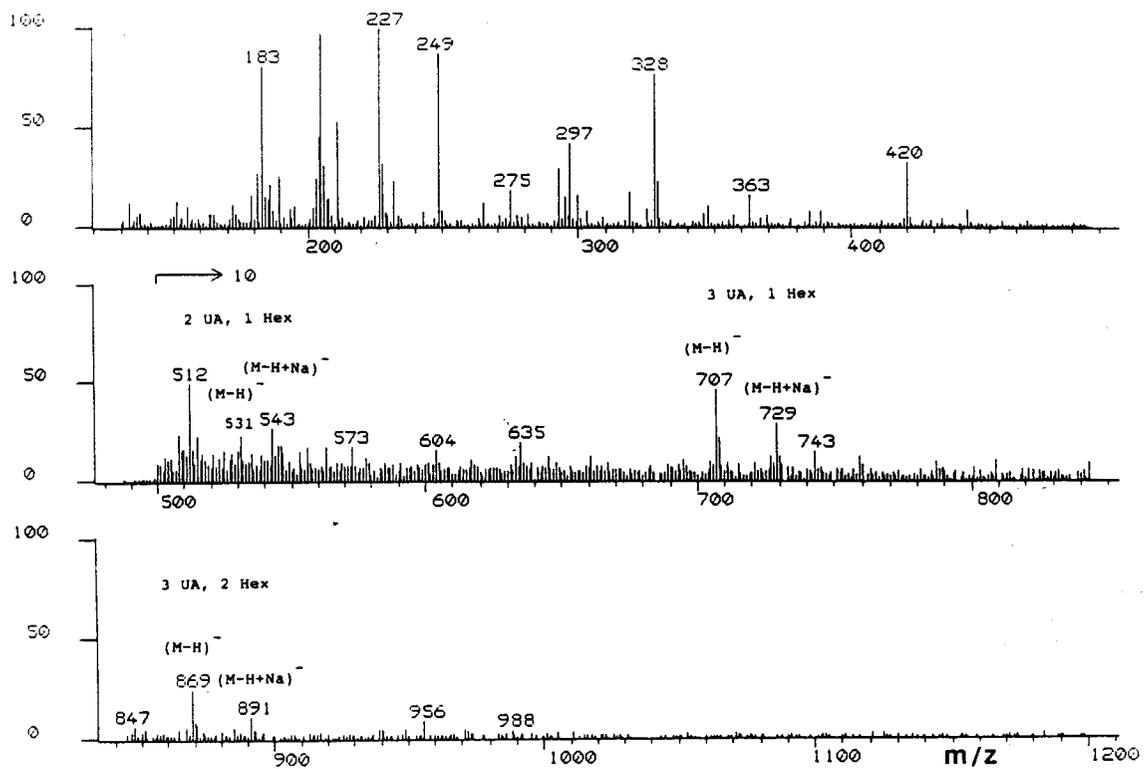


Figure 29 : Spectre de masse, en mode d'ionisation FAB négative, des oligosaccharides natifs obtenus après hydrolyse partielle du polysaccharide (ATFA 2 N, 2 h, 100°C).

ose neutre ; la région suivante se déduit de la première par la présence d'un acide uronique supplémentaire ($[M-H]^- = 707$ et $[M-H+Na]^- = 729$) ; enfin, une entité pentasaccharidique, constituée de 3 acides hexuroniques et de 2 hexose neutres, est caractérisée par les pics de masse $[M-H]^- = 869$ et $[M-H+Na]^- = 891$.

*** analyse en FAB positive.**

Cette analyse a été réalisée sur les oligosaccharides alditols perméthylés obtenus après réduction et perméthylation des oligosaccharides de l'hydrolysate partiel (Fig. 30, p. 155). Cette expérience indique clairement la présence de deux entités oligosaccharidiques majeures de nature tétra et pentasaccharidique : $[M+Na]^+ = 1148$ (3 acides uroniques, 1 hexose, 1 hexitol) ; $[M+Na]^+ = 944$ et $[M+Na-MeOH] = 912$ (3 acides hexuroniques, 1 hexitol), respectivement. Nous distinguons également une entité trisaccharidique caractérisée par les pics de masse $[M+Na]^+ = 726$ et $[M+Na-MeOH] = 694$, qui correspond à la présence de 2 acides hexuroniques et 1 hexitol. Enfin, nous observons la présence de deux fractions disaccharidiques mineures : acide hexuronique-hexitol ($[M+Na]^+ = 508$) et acide hexuronique-acide hexuronique ($[M+Na]^+ = 522$). Nous pouvons constater que cette analyse en FAB positive d'oligosaccharides perméthylés est plus sensible que l'analyse en FAB négative des oligosaccharides natifs puisqu'elle révèle la présence de disaccharides que nous n'avions pas détecté par cette dernière méthode. L'analyse par FAB positive fournit également des informations de séquence. En effet, le pic fragment B_3 de masse $m/z = 669$ (HexUA-HexUA-HexUA) provient de l'élimination de 1 ou de 2 résidus d'hexose neutre des fractions tétra ou pentasaccharidiques,

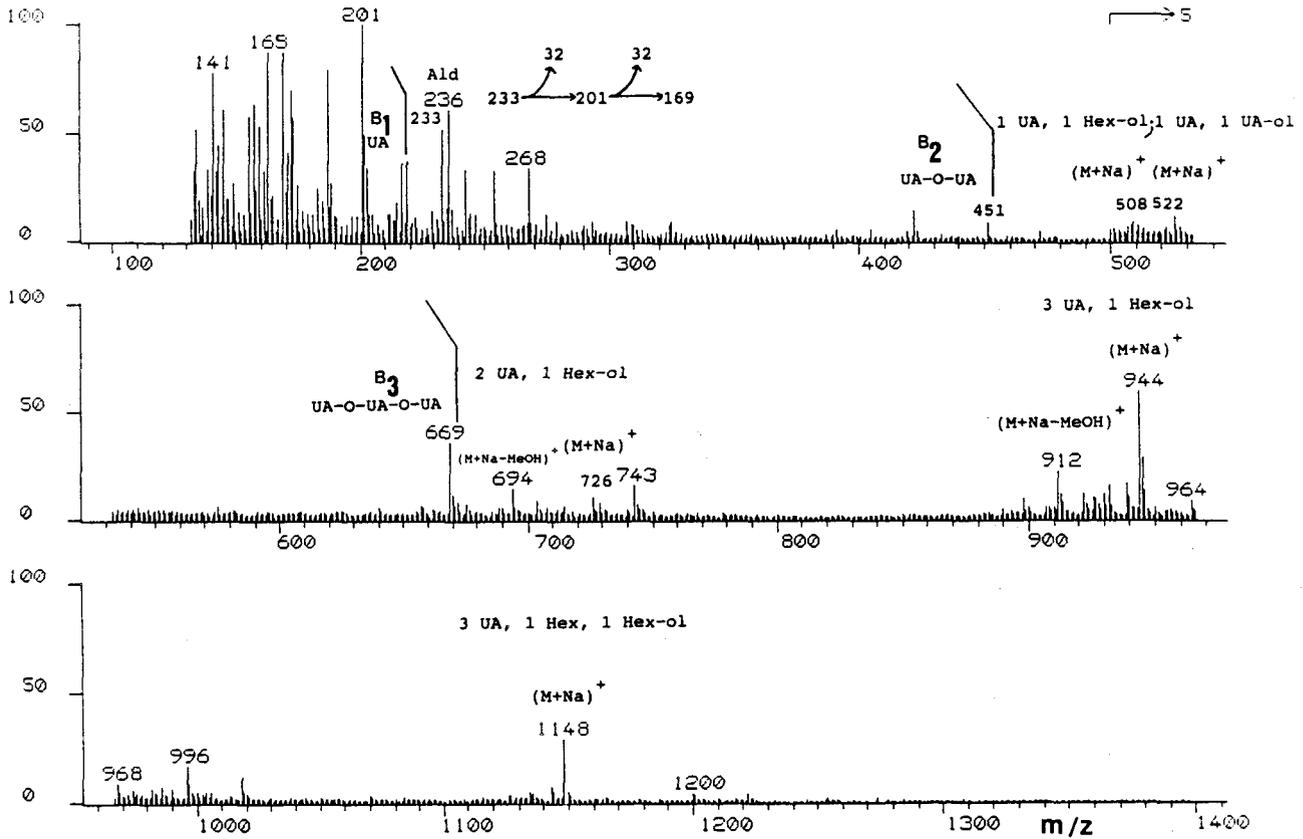


Figure 30 : Spectre de masse, en mode d'ionisation FAB positive des oligosaccharides alditols perméthylés obtenus après hydrolyse partielle du polysaccharide (ATFA, 2 N, 2h, 100°C), réduction et perméthylation.

respectivement. De même, nous observons un ion B_2 de masse $m/z = 451$ (HexUA-HexUA), un fragment alditol Z_1 de masse $m/z = 236$ et enfin un fragment B_1 ($m/z = 233$, acide hexuronique) qui se caractérise par des pertes successives de méthanol ($m/z = 201$ et $m/z = 169$). La nomenclature des ions de fragmentation est donnée dans le chapitre suivant.

*** Analyse en mode MS-MS.**

- Fragmentation des oligosaccharides.

Nous avons indiqué dans la **Figure 31 (Domon and Costello, 1988, p. 157)**, les principales fragmentations que l'on peut observer en FAB-MS et également en collision lors de l'analyse MS-MS. Deux grands types de fragmentations sont observées. Nous avons des fragmentations conduisant, d'une part, à des ions correspondant à la partie terminale non réductrice de l'oligosaccharide (ions A_i , B_i , C_i , i désignant le monosaccharide considéré ; par exemple $i = 1$ pour le premier monosaccharide non réducteur) et d'autre part, à des ions renfermant l'extrémité terminale réductrice (X_j , Y_j , Z_j , j désignant la liaison glycosidique calculée à partir de l'extrémité terminale réductrice). Parmi ces fragmentations, nous pouvons distinguer celles provenant de la rupture de liaisons glycosidiques (fragments B, C, Y, Z) et celles correspondant à des ruptures dans le cycle des monosaccharide (A et X).

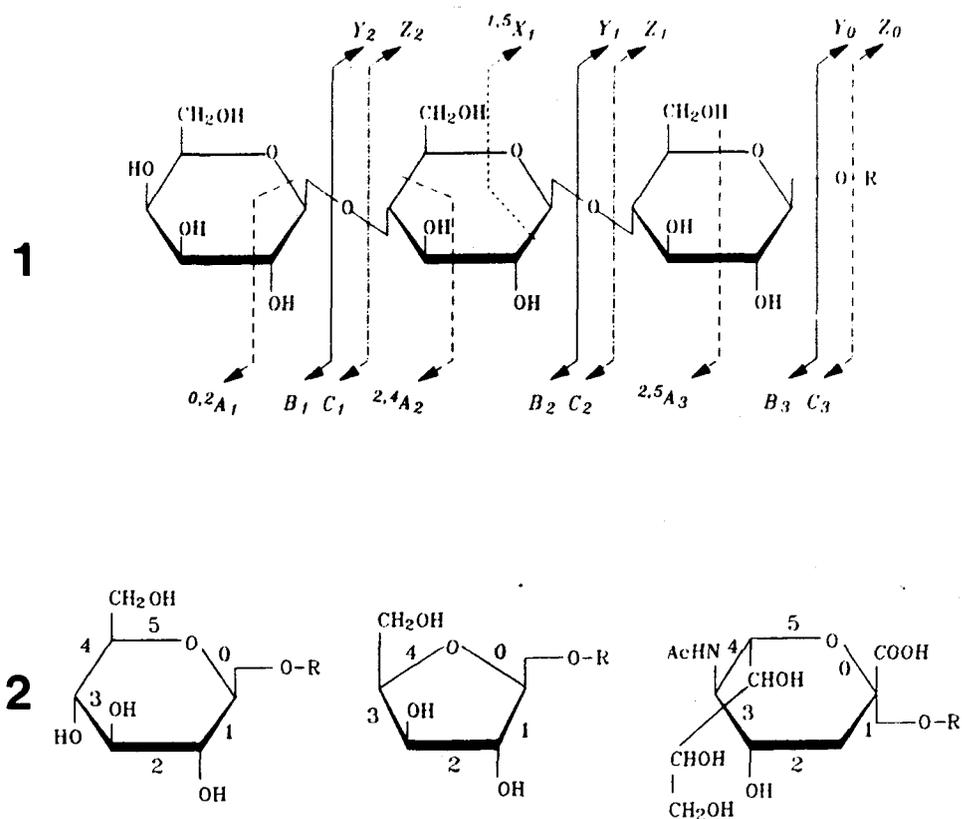


Figure 31 : Principales fragmentations observées lors de l'analyse d'un oligosaccharide en FAB-MS ou FAB-MS-MS (1) et numérotation du cycle des monosaccharides (2), lors de cette analyse (Domon et Costello, 1988).

- Fragmentation des liaisons glycosidiques.

La fragmentation la plus simple, que l'on observe lors de l'analyse par spectrométrie de masse en mode FAB-MS ou en mode FAB-MS-MS, résulte de la rupture de la liaison glycosidique.

En mode négatif, Promé et al., (1987) ont proposé que l'ion moléculaire obtenu par déprotonation de l'oligosaccharide, conduit à la formation d'un époxyde, accompagné de l'ouverture du cycle, suivi de la rupture de la liaison glycosidique (Fig. 32, p. 159). Cette suite de réactions donne naissance à un ion Y_j . Un transfert d'hydrogène permet la production d'un ion de type B_i . Lorsque la déprotonation s'effectue sur la fonction hydroxyle adjacente à la liaison glycosidique (Fig. 32, p. 159), un époxyde se forme, avec rupture de la liaison glycosidique et transfert de charge sur l'oxygène appartenant à cette liaison. L'ion C_i est ainsi formé. De la même façon que précédemment, un transfert d'hydrogène permet la formation de l'ion Z_i .

En mode positif (Fig. 32, p. 159), la liaison glycosidique protonée est rompue, conduisant à un ion B_i de type oxonium. Alternativement, la rupture de la liaison glycosidique peut s'accompagner d'un transfert d'hydrogène, conduisant à un ion de nature Y_i .

- Fragmentation du cycle des monosaccharides.

Les voies de fragmentation conduisant à la formation d'ions par ouverture des cycles des monosaccharides sont beaucoup plus complexes. Comme dans le cas de la fragmentation des liaisons glycosidiques, nous distinguons (Fig. 31, p. 157) des fragments terminaux réducteurs (fragments X_j) et des fragments terminaux non réducteurs (fragments A_i).

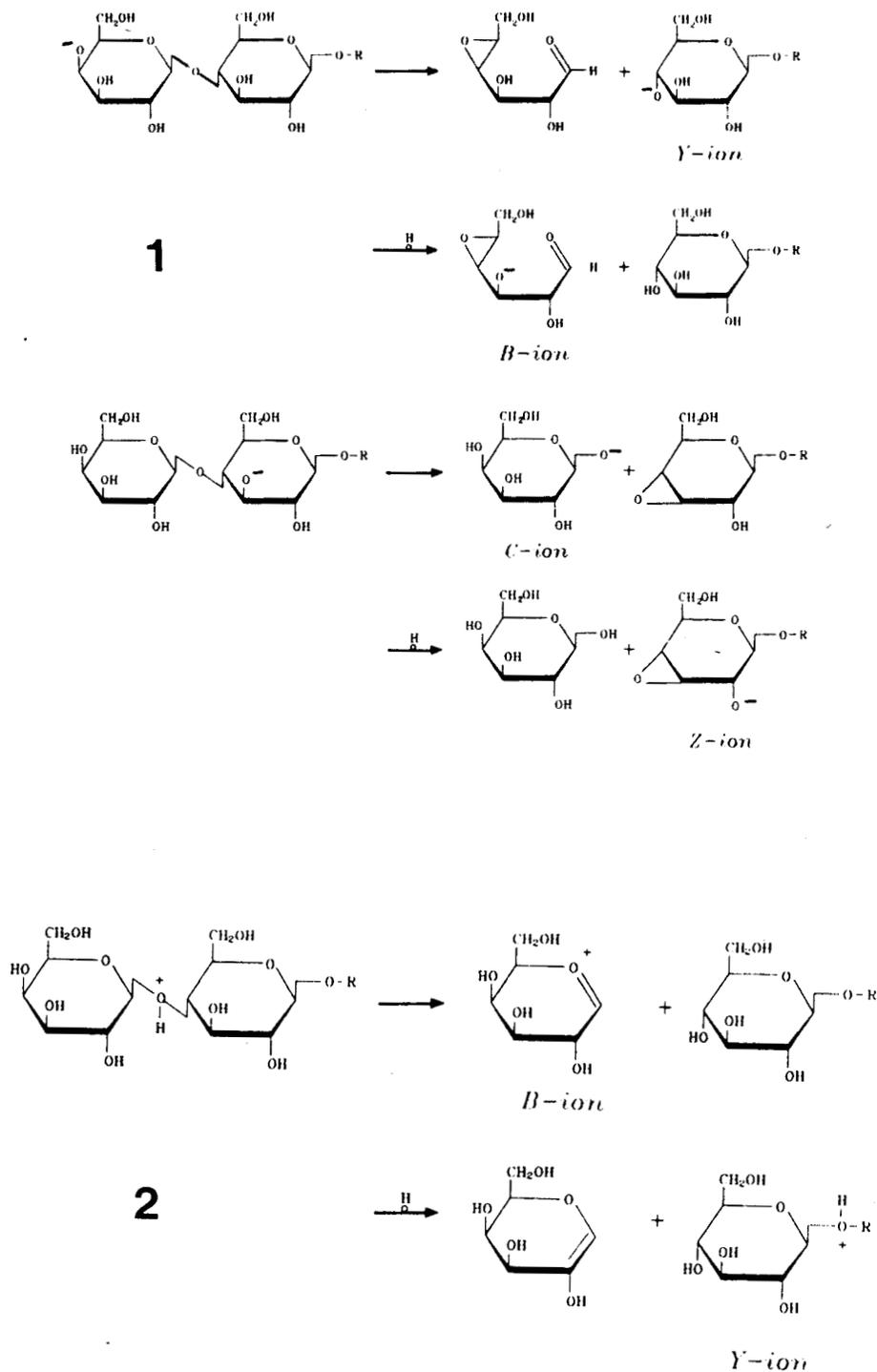


Figure 32 : Schéma de fragmentation des liaisons glycosidiques lors de l'analyse en FAB-MS et en FAB-MS-MS (Domon et Costello, 1988). 1 : mode négatif.

2 : mode positif.

Afin de spécifier l'endroit des cassures, les liaisons C-C ou C-O du cycle sont numérotées à partir de la liaison oxygène - carbone anomérique, de 0 à 5. Les chiffres placés en indice supérieur, sur les fragments X_j et A_i indiquent les endroits de rupture.

- Etude de la fragmentation des oligosaccharides de l'hydrolysate partiel par collision.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent (Fig. 29, p. 153), l'analyse par spectrométrie de masse en mode FAB négative de l'hydrolysate partiel permet de visualiser deux entités oligosaccharidiques majeures : une entité tétrasaccharidique (3 acides uroniques et 1 hexose) de masse $[M-H]^- = 707$ et une entité pentasaccharidique (3 acides uroniques et 2 hexoses) de masse $[M-H]^- = 869$. Une entité trisaccharidique (2 acides uroniques, 1 hexose) est également visible sur le spectre, mais l'intensité de l'ion moléculaire ($m/z = 531$) est faible. Compte tenu des quantités relatives de ces trois oligosaccharides dans l'hydrolysate total, des spectres de collision ont pu être obtenus à partir du mélange pour le tétra et le pentasaccharide. Quant au trisaccharide, nous avons réussi à le purifier par chromatographie d'échange d'ions de l'hydrolysate partiel sur colonne de Dowex 1x2 (200-400 mesh, forme CH_3COO^-) et élution de la colonne par un gradient de concentration en acide acétique (Voir matériel et méthodes). Nous avons ainsi isolé un trisaccharide (élué de la colonne par une concentration de 30 % en acide acétique).

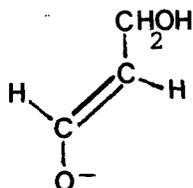
L'utilisation des techniques de séquençage des enchaînements glucidiques, nous montre que la structure de ce trisaccharide est identique à celle du trisaccharide isolé de l'action du lithium métal

sur le polysaccharide natif (voir chapitre 6.2.), à savoir :

GlcUA1-3GalUA1-4Glc

. Collision du trisaccharide.

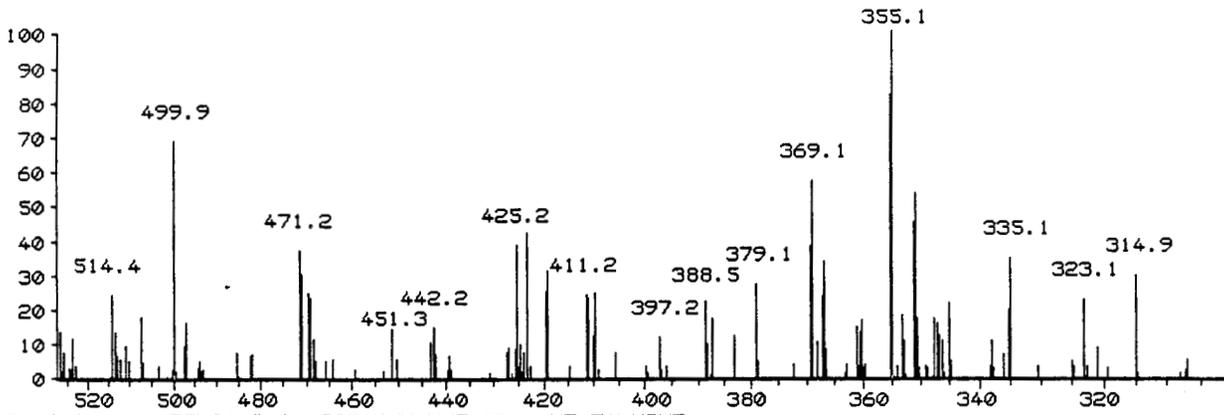
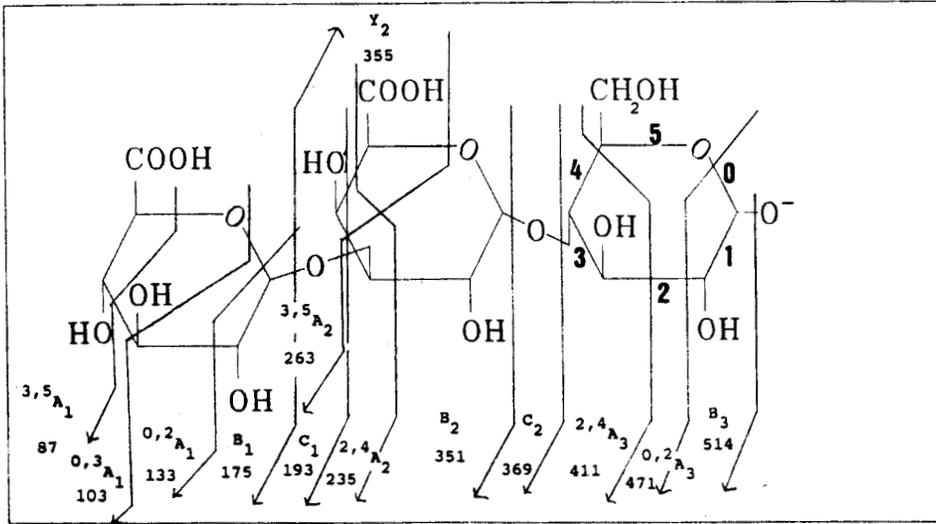
La fragmentation et le spectre de collision de l'ion moléculaire $[M-H]^- = 531$ du trisaccharide sont rassemblés dans la **Figure 33** (p. 162). La séquence HexUA-HexUA-Hex est déduite des fragments terminaux non réducteurs, obtenus par rupture des liaisons glycosidiques ($B_1 : 175 ; C_1 : 193 ; B_2 : 351 ; C_2 : 369 ; B_3 : 514$) et par rupture dans le cycle ($^{0,2}A_1 : 133 ; ^{2,4}A_2 : 235 ; ^{2,4}A_3 : 411 ; ^{3,5}A_2 : 263 ; ^{0,2}A_3 : 471$). Seul un fragment terminal réducteur est observé : $Y_2 : 355$ correspondant à la séquence HexUA-Hex. On observe également des fragments de masse inférieure : $^{3,5}A_1 : 87 ; ^{0,3}A_1 : 103$. L'ion de masse $m/z = 59$ correspond à un ion de type $^{1,3}A_1$ ou $^{2,4}A_1$. Enfin, nous observons un ion de masse $m/z = 73$ de structure suivante :



Cet ion peut provenir de l'ion Y_1 par rupture des liaisons 3 et 5 de l'hexose neutre terminal réducteur.

. Collision des tétra et pentasaccharides.

Les deux ions moléculaires de masse $[M-H]^- = 707$ et $[M-H]^- = 869$, majoritaires lors de l'analyse en FAB négative ont également été collisionnés. Leurs fragmentations et leurs spectres de collision sont



Profile of 17JL06.2-0: CID 6KV M/Z 531 -VE TALMONT
FIC: 5941608 100%: 401mV Base: 57299mV Mass 17-Jul-90 14:15
193.0

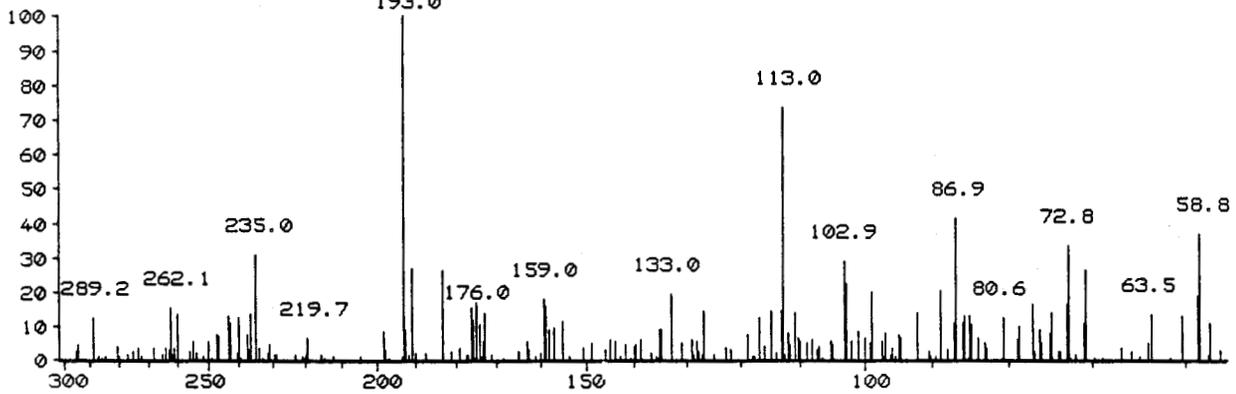
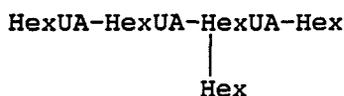
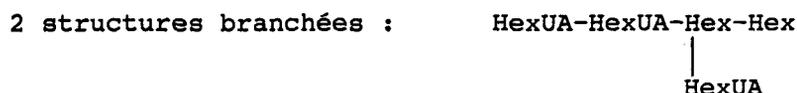
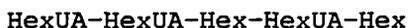
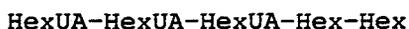


Figure 33 : Fragmentation et spectre de collision en mode FAB négative-CID-MS-MS du trisaccharide de masse moléculaire $(M-H)^- = 531$.

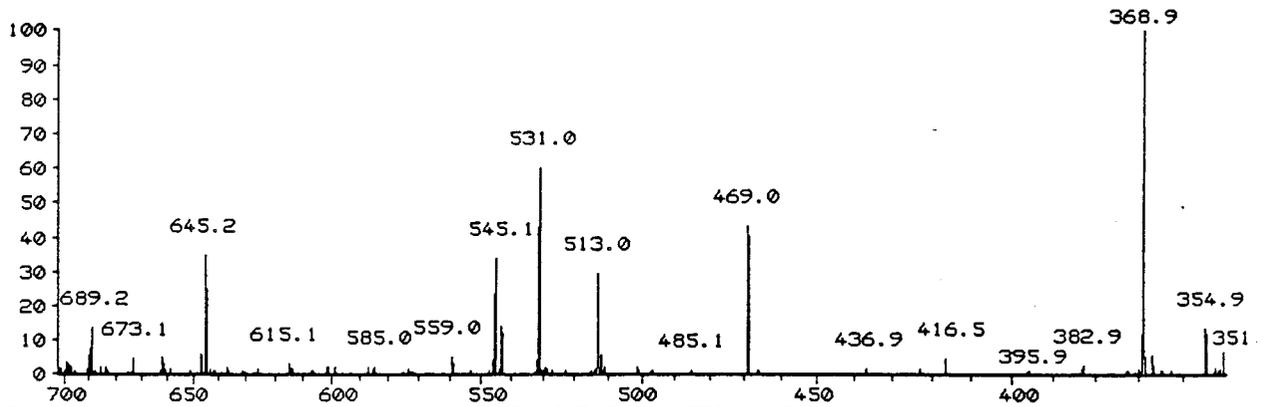
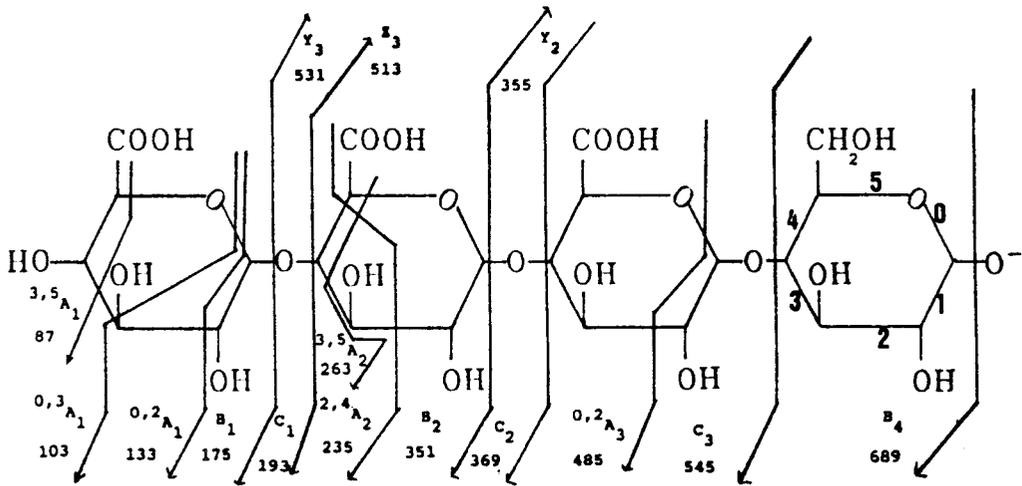
rassemblés dans les **Figures 34 (p. 164) et 35 (p. 165)**, respectivement.

La séquence HexUA-HexUA-HexUA-Hex ($[M-H]^- = 707$) est déduite par les fragments terminaux réducteurs, obtenus par rupture des liaisons glycosidiques ($B_1 : 175 ; C_1 : 193 ; B_2 : 351 ; C_2 : 369 ; C_3 : 545 ; B_4 : 689$) et par rupture dans les cycles (${}^{0,2}A_1 : 133 ; {}^{3,5}A_2 : 263 ; {}^{2,4}A_2 : 235 ; {}^{0,2}A_3 : 485$). Nous observons lors de cette analyse, 3 fragments terminaux réducteurs provenant de la rupture de liaisons glycosidiques ($Y_2 : 355 ; Z_3 : 513 ; Y_3 : 531$). Nous n'avons pas observé de fragments terminaux réducteurs correspondant à des ruptures dans le cycle des unités monosaccharidiques.

En ce qui concerne l'ion $[M-H]^- = 869$, les fragments collectés, après collision permettent d'envisager 4 hypothèses de structure ; 2 structures linéaires :



Nous pouvons éliminer d'emblée la dernière hypothèse. En effet, nous n'observons pas dans le spectre de collision de fragments caractéristiques d'un hexose en position terminale non réductrice ($B_1 : 161 ; C_1 : 179$).



Profile of 17JL05.2-0: CID 6KV M/Z 707.1517 G/EAU/ET3N -VE TALMONT
TIC: 10149030 100%: 522mV Base: 64524mV Mass 17-Jul-90 13:26

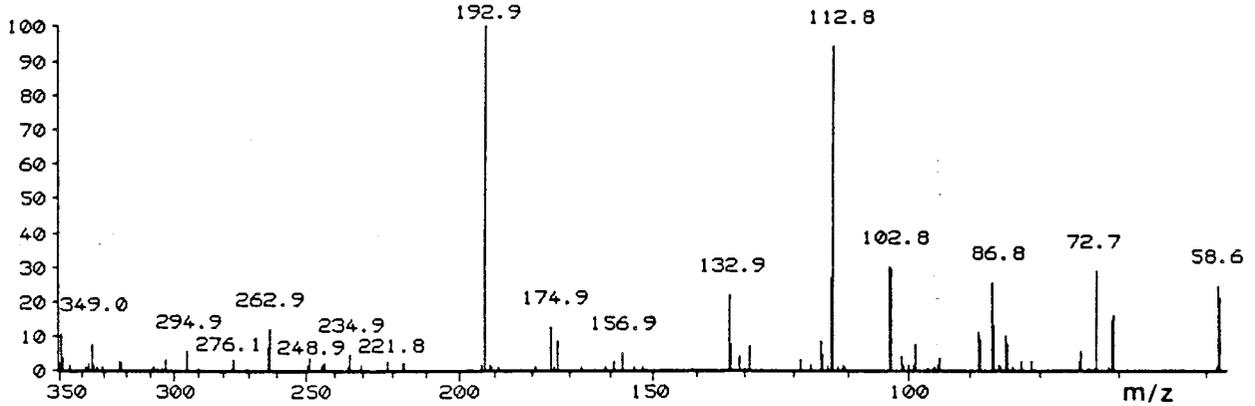
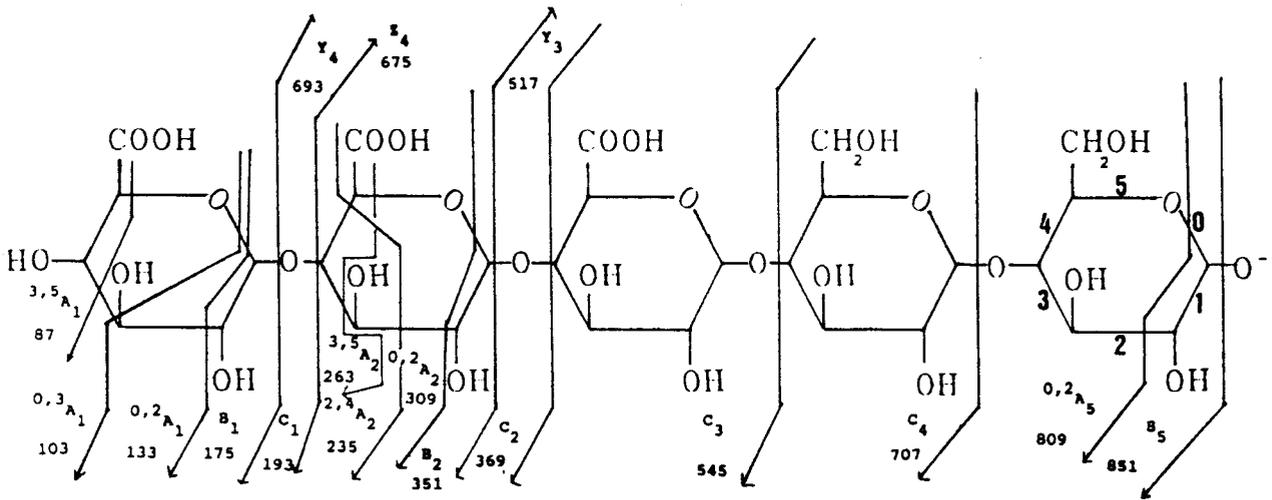


Figure 34 : Fragmentation et spectre de collision en mode FAB négative-CID-MS-MS de l'entité tétrasaccharidique de masse moléculaire $(M-H)^- = 707$.



La séquence HexUA-HexUA de cette entité pentasaccharidique est déduite sans ambiguïté des fragments obtenus par rupture des liaisons glycosidiques ($B_1 : 175 ; C_1 : 193 ; B_2 : 351 ; C_2 : 369$), ainsi que des fragments de rupture des cycles ($^{0,2}A_1 : 133 ; ^{2,4}A_2 : 235 ; ^{0,2}A_2 : 309 ; ^{3,5}A_2 : 263$). La présence d'un fragment C_3 à $m/z = 545$ est en faveur de l'enchaînement linéaire HexUA-HexUA-HexUA. Le doute que nous avons quant à la présence de cette structure linéaire est fondé sur la faible intensité de cet ion. La présence dans le spectre de collision d'un pic à $m/z = 531$ (C_3), de faible intensité également, nous oblige à considérer également l'enchaînement HexUA-HexUA-Hex. Les autres ions du côté réducteur ($C_4 : 707 ; B_5 : 851 ; ^{0,2}A_5 : 809$) de même que les fragments terminaux réducteurs $Y_3 : 517 ; Z_4 : 675 ; Y_4 : 693$, ne peuvent nous aider dans le choix de l'une ou l'autre de ces structures.

Cependant, l'étude de la cinétique d'apparition des oligosaccharides au cours de l'hydrolyse partielle (Fig. 28, p. 151) permet de constater la disparition de l'entité pentasaccharidique au profit de l'entité tétrasaccharidique au cours du temps. Cette observation est en faveur de la structure linéaire HexUA-HexUA-HexUA-Hex-Hex pour ce pentasaccharide qui au cours de l'hydrolyse partielle perd le résidu Hex en position terminale réductrice pour donner naissance au tétrasaccharide HexUA-HexUA-HexUA-Hex dont le spectre de collision est absolument clair.

c. Etude de l'hydrolysats partiel par chromatographie en phase supercritique (SFC).

L'hydrolysats partiel, réduit par le borohydrure de potassium et perméthylé, a été analysé par chromatographie en phase supercritique et

détection par ionisation de flamme (SFC-FID) et par couplage chromatographie en phase supercritique, spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique (SFC-CI-MS).

*** SFC-FID.**

La **Figure 36 (p. 168)** illustre les résultats de la chromatographie en phase supercritique des constituants de l'hydrolysat partiel. Nous pouvons constater la grande résolution de cette technique qui permet de mettre en évidence pour les entités tri et tétrasaccharidiques, la présence de 4 isomères pour chaque entité, dont un est majoritaire. Ces isomères proviennent des différentes possibilités de liaison des monosaccharides dans la chaîne oligosaccharidique. Quant à la fraction pentasaccharidique, elle montre une bonne homogénéité, ce qui est en faveur d'une seule structure linéaire HexUA-HexUA-HexUA-Hex-Hex.

*** SFC-CI-MS.**

La **Figure 37 (p. 169)** montre le courant ionique total des oligosaccharides alditols perméthylés, obtenu par couplage du chromatographe en phase supercritique au spectromètre de masse. Chacune des entités oligosaccharidiques a été analysée par ionisation chimique à l'aide d'ammoniac. Comme nous pouvons le voir, la résolution des pics n'est pas aussi bonne que pour l'analyse en SFC-FID. En effet, pour l'ensemble tétrasaccharidique, nous observons 2 éléments au lieu de 4. Cette expérience confirme les analyses par FAB-MS et par SFC-FID. A savoir, l'ensemble trisaccharidique est constitué de 4 isomères de masse

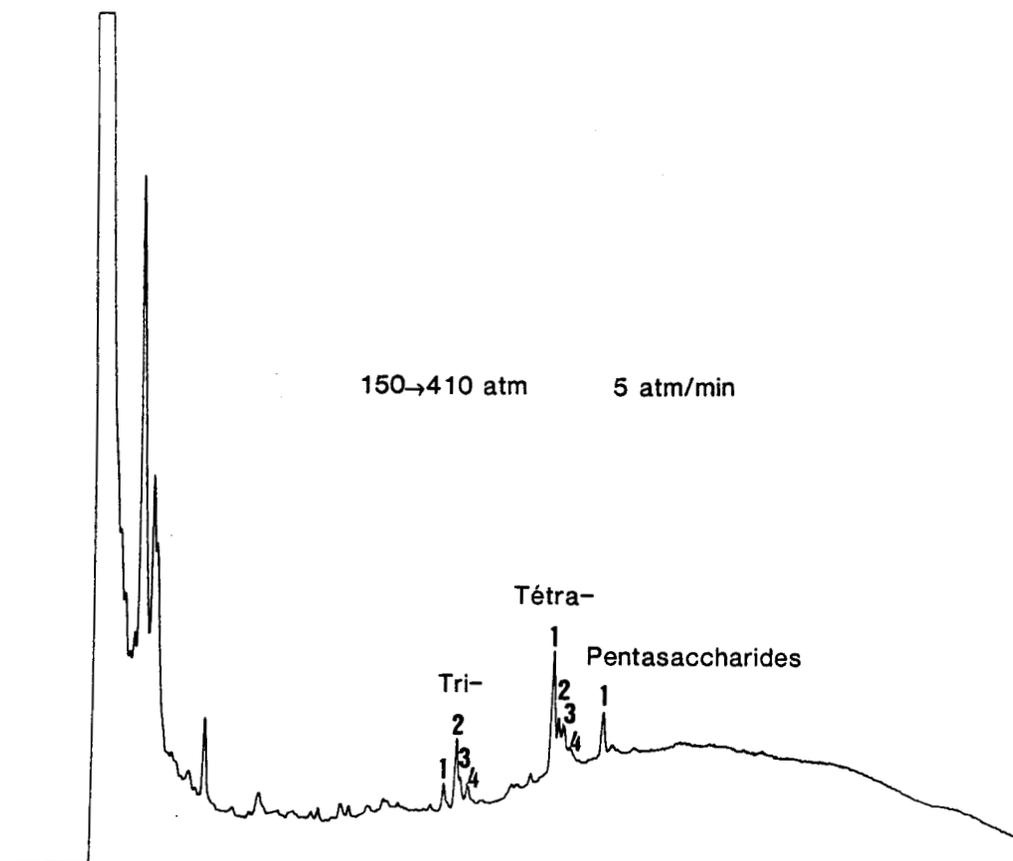


Figure 36 : Chromatographie en phase supercritique de l'hydrolysat partiel (ATFA, 4 N, 4 h, 100°C), réduit et perméthylé.

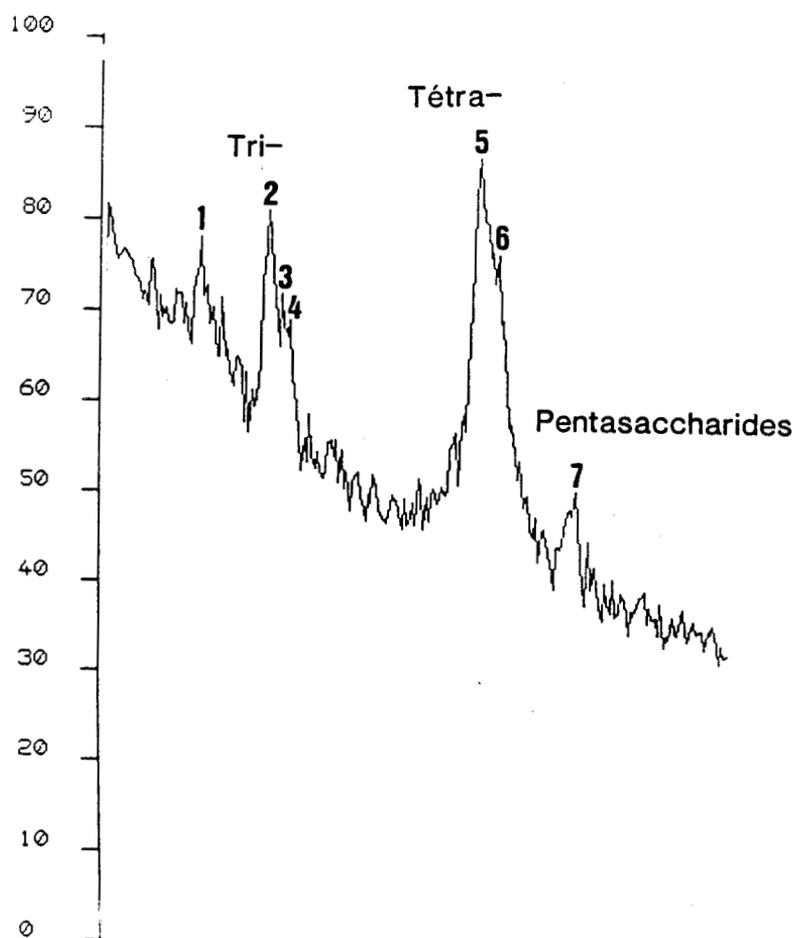


Figure 37 : Courant ionique total, de l'hydrolysate partiel (ATFA, 2 N, 2 h, 100°C), obtenu par couplage SFC-CI-MS.

M = 703 qui correspondent à des trisaccharides constitués par deux acides uroniques et un ose neutre. L'ion majoritaire observé par ionisation chimique n'est pas le même pour chacun des isomères. Dans l'ordre d'élution des composés, on a les ions $[M+NH_4]^+ = 721$ (1), $[M+NH_4-MeOH]^+ = 689$ (2), $[M+NH_4-MeOH-MeOH]^+ = 657$ (3), $[M+H]^+ = 704$ (4). Nous confirmons également la nature tétrasaccharidique de deux isomères par des fragments pseudomoléculaires à $[M+18]^+ = 939$ (5), $[M+18-32]^+ = 907$ (6) correspondant à des oligosaccharides composés de trois acides uroniques et d'un ose neutre. Le pentasaccharide est également confirmé ($[M+18]^+ = 1143$ (7) comme étant composé de 3 acides uroniques et de 2 oses neutres.

d. Conclusions.

Les conclusions que nous pouvons tirer des résultats de l'hydrolyse partielle du polysaccharide sont les suivantes :

- Les séquences de 3 oligosaccharides : tri, tétra et pentasaccharides ont pu être déterminées grâce à l'utilisation de techniques modernes d'analyse, comme la chromatographie en phase supercritique et son couplage à la spectrométrie de masse et surtout grâce à la spectrométrie de masse en tandem (FAB-CID-MS-MS). Cette dernière technique nous a permis d'identifier deux oligosaccharides se déduisant l'un de l'autre par l'élimination d'un hexose neutre en position terminale réductrice.

- La simplicité du chromatogramme en couche mince de la cinétique d'hydrolyse partielle : libération rapide d'hexoses neutres et production d'un nombre limité d'oligosaccharides acides (majorité de penta et tétrasaccharides) permet de penser que le polysaccharide est

formé d'ensembles très résistants à l'hydrolyse acide. Ces ensembles, constitués d'acides hexuroniques, sont sans doute séparés par des zones formées d'oses neutres. L'hydrolyse implique alors une dépolymérisation très rapide du polysaccharide. En effet, après 1 h d'hydrolyse, nous n'observons plus de matériel glucidique lourd au trait de départ de la chromatographie de partage sur couche mince.

7. Conclusions

Les conclusions que nous pouvons tirer de ce travail, sur la caractérisation d'un nouvelle exopolysaccharide excrété par une bactérie hydrothermale, sont les suivantes :

1. L'exopolysaccharide excrété par la souche 1545 a été isolé à raison de 10 g de polymère brut par litre de culture. La purification de cette fraction brute par chromatographies, sur colonne d'échange d'anions (fraction éluée par 300 mM de NaCl dans le tampon) et sur colonne de gel filtration, a permis d'obtenir un polymère homogène en gel d'agarose, de masse moléculaire 1100 kDa. Le rendement de la préparation est de 50 %, calculé à partir de la fraction brute isolée du milieu de fermentation.

2. L'exopolysaccharide est constitué de 50 % de monosaccharides neutres, de 10 % de 4,6-O-(1-carboxy-éthylidène)-galactopyrannose et de 40 % d'acides uroniques. Les rapports molaires des différents monosaccharides sont les suivants : galactose : 3 ; glucose : 4 ; 4,6-O-(1-carboxy-éthylidène)-galactopyrannose : 1 ; acide glucuronique : 3 ; acide galacturonique : 1.

3. L'application de méthodes d'étude de la séquence des polymères glucidiques, à savoir : perméthylation, dégradation au lithium, hydrolyse partielle, permet de tirer des conclusions partielles quant à la séquence de l'unité de répétition du polysaccharide :

Le caractère très anionique du polysaccharide a conduit à des rendements de perméthylation très faibles, dus certainement à des phénomènes de β -élimination. Toutefois, nous avons pu établir clairement la présence en position terminale non réductrice de résidus de galactose substitués par de l'acide pyruvique (4,6-O-(1-carboxy-éthylidène)-galactose. Ce résultat, ainsi que l'identification d'éthers diméthylés, nous permettent d'affirmer que cet exopolysaccharide est branché.

La dégradation du polysaccharide par le lithium dans l'éthylène diamine a conduit à un faible rendement d'obtention d'oligosaccharides (25 %). Cette technique, qui est efficace lorsque le polymère ne renferme qu'un à deux résidus d'acides uroniques par unité de répétition, montre ses limites lorsque la macromolécule est riche en oses acides. En fait, deux phénomènes s'additionnent, d'une part, les difficultés rencontrées lors de la solubilisation du polymère anionique dans l'éthylène diamine qui n'ont pas permis une bonne attaque du polysaccharide par le lithium, et d'autre part, la présence de nombreuses séquences poly-hexuroniques qui implique l'élimination et la dégradation de monosaccharides. Toutefois, nous avons pu isoler, après dégradation, un trisaccharide dont la structure est :

GlcUA1-3GalUA1-4Glc.

La cinétique d'hydrolyse partielle du polysaccharide, effectuée à l'aide d'acide trifluoroacétique, nous permet de penser que le polymère est constitué de séquences polyhexuronyles résistantes à l'hydrolyse acide, séparées par des séquences d'oses neutres. C'est ainsi que nous avons pu caractériser, dans l'hydrolysats partiel, à

l'aide de la technique de FAB-CID-MS-MS (fast atom bombardement-collision induced decomposition-mass spectrometry-mass spectrometry), trois oligosaccharides de séquence : HexUA-HexUA-Hex ; HexUA-HexUA-HexUA-Hex et HexUA-HexUA-HexUA-Hex-Hex. Cette disposition des différents monosaccharides, dans la chaîne polysaccharidique, explique la dépolymérisation rapide de l'hydrocolloïde par des concentrations et des temps d'hydrolyse relativement faibles.

CONCLUSION GENERALE

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

1. Nous avons effectué la caractérisation biochimique des tubes et mucus de 4 vers caractéristiques du milieu hydrothermal profond : *Riftia pachyptila* et *Tevnia jerichonana* (vestmentifères), *Alvinella pompejana* et *Paralvinella sp* (annélides polychètes). Le tube des deux vestimentifères est constitué en proportions égales de protéines et de glucides. La fraction glucidique est majoritairement composée de chitine, mais on observe également des quantités non négligeables d'oses neutres et d'oses acides. Cette dernière classe d'oses contribuant, sans doute, avec la chitine aux propriétés de résistance mécanique des tubes.

Le tube organo-minéral d'*Alvinella pompejana* et le mucus de *Paralvinella sp* sont très contaminés par le milieu hydrothermal. La fraction organique du mucus de *Paralvinella sp* ne représente que 10 % du total et est composée de 60 % de glucides et 40 % de protéines. Le tube d'*Alvinella pompejana* est de nature organo-minérale. La fraction organique représente 37,7 % du tube et est constituée, majoritairement, de protéines. La fraction glucidique se caractérise par la présence de monosaccharides O-méthylés qui représentent 50 % du matériel glucidique du tube.

2. Nous avons isolé et caractérisé les trois monosaccharides O-méthylés présents dans le tube d'*Alvinella pompejana*. Ce sont le 2-mono-O-méthyl-L-fucose, le 3-mono-O-méthyl-L-fucose et le 2,4-di-O-méthyl-L-fucose. Les deux premiers monosaccharides n'ont jamais été caractérisés dans le règne animal, le 2,4-di-O-méthyl-L-fucose est caractérisé pour la première fois dans la nature.

3. Nous avons isolé, purifié et caractérisé partiellement un exopolysaccharide excrété par une bactérie qui se développe au niveau de l'épiderme de l'annélide polychète *Alvinella pompejana*. Ce polysaccharide, homogène en gel d'agarose et qui possède un poids moléculaire de 1100 KDa, est très anionique. Il est, en effet, constitué de 40 % d'acides uroniques, de 10 % de 4,6-O-(1-carboxy-éthylidène)-galactose et de 50 % d'oses neutres. Ce polysaccharide est formé de glucose, galactose, de 4,6-O-(1-carboxy-éthylidène)-galactose, d'acide glucuronique et d'acide galacturonique dans les rapports molaires : 4 ; 3 ; 1 ; 3 ; 1.

L'utilisation des méthodes d'approche des séquences oligosaccharidiques nous permettent de tirer des conclusions partielles sur la structure primaire de cet exopolysaccharide. Celui-ci semble très branché et posséder des séquences riches en acides uroniques qui constituent des points de résistance aux réactifs d'hydrolyse. Ces points de résistance sont séparés par des zones plus riches en hexoses neutres. Les analyses plus fines des oligosaccharides libérés par hydrolyse acide partielle nous ont permis de caractériser des séquences de type tri- tétra- et pentasaccharidiques de nature : HexUA-HexUA-Hex ; HexUA-HexUA-HexUA-Hex et HexUA-HexUA-HexUA-Hex-Hex.

- L'étude de la structure primaire de cet exopolymère anionique, tout à fait préliminaire, nous a permis d'introduire au laboratoire un certain nombre de nouvelles techniques de séquençage de polysaccharide au niveau d'acides uroniques, en particulier la dégradation au lithium.

- Les premiers résultats sur l'étude des propriétés rhéologiques du polymère effectuée par P. Aymard dans le Laboratoire de Biophysique de l'ENSIA de Massy sous la direction de G. Cuvelier et B. Launay montre des comportements intéressants, en particulier la mise en évidence d'une augmentation de viscosité aux basses vitesses de cisaillement (Aymard, 1990).

- Ce travail qui concerne la caractérisation d'une nouvelle molécule glucidique excrétée par une bactérie du milieu hydrothermal profond devra se poursuivre par la caractérisation de l'unité de répétition du polymère. D'autre part, des études concernant d'autres macromolécules glucidiques, isolées également de bactéries du milieu hydrothermal profond et qui ont montré des propriétés rhéologiques particulièrement intéressantes (conservation de propriétés gélifiantes à des températures de l'ordre de 80°C), devraient être poursuivies dans le cadre de ce programme biotechnologie marine de l'IFREMER.

BIBLIOGRAPHIE

AKITA E., MAEDA K., UMEZAWA H., 1964.

Structure of labilose, a methanolysis product of labilomycin.

J. Antibiot. (Tokyo), Ser.A, 17, 37-38.

ALLISON D.G., SUTHERLAND I.W., 1984.

A staining technique for attached bacteria and its correlation to extracellular carbohydrate production.

J. Microbiol. Meth., 2, 93-99.

AYMARD P., 1990.

Etudes des propriétés rhéologiques en milieu aqueux de quelques polyosides produits par des bactéries marines du milieu hydrothermal profond.

Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies de Sciences Alimentaires, ENSIA Massy.

BACIC A., HARRIS P.J., STONE B.A., 1988.

Structure and fonction of plant cell walls. In *The biochemistry of plants*. Vol.14. Ed PREISS J. Academic press, New York, pp.297-371.

BAROSS J., LILLEY M.D., GORDON L.I., 1982.

Is the CH_4 , H_2 and CO venting from submarine hydrothermal systems produced by thermophilic bacteria ?

Nature, 298, 366-368.

BAROSS J.A., DEMING J.W., 1983.

Growth of "black smockers" bacteria at temperatures of at least 250°C.

Nature, 303, 423-426.

BIANCHI A., 1986.

Présence et activité bactériennes dans deux sites d'activité océanique profond du pacifique.

C. R. Acad. Sci., 303, 561-564.

BEHNKE O., 1968.

Electron microscopical observations on the surface coating of human blood platelets.

J. Ultrastruct. Res., 24, 51-69.

BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G., 1973.

New method for quantitative determination of uronic acids.

Anal. Biochem., 54, 484-489.

BOSS K.J., TURNER R.D., 1980.

The giant white clam from the Galapagos rift, *Calyptogena magnifica*, sp. nov.

Malacologia, 20, 161-194.

BOYLE C.D., READE A.E., 1983.

Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria.

Appl. Environ. Microbiol., 46, 392-399.

CARNEY S.L., 1986.

Proteoglycans. In *Carbohydrate analysis : a practical approach*. Eds.

CHAPLIN M.F. and KENNEDY J.F. I.R.L. Press, Oxford, Washington D.C., pp.

97-141.

CAVANAUGH C.M., 1981.

Procaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*
Jones : Possible chemoautotrophic symbiont.

Science, 213, 340-341.

CHEN C.T.A., 1981.

Geothermal systems at 21°N.

Science, 211, 298.

CHILDRESS J.J., ARP A.J., FISHER C.R.Jr, 1984.

Metabolic and blood characteristic of the hydrothermal vent tube worm
Riftia pachyptila.

Mar. Biol., 83, 109-124.

CHRISTENSEN B.E., KJOSBAKKEN J., SMIDROD O., 1985.

Partial chemical and physical characterisation of two extracellular
polysaccharides produced by marine periphytic *Pseudomonas* sp. Strain
NCMB 2021.

Appl. Environ. Microbiol., 50, 837-845.

CORLISS J.B., DYMOND J., GORDON L.I., EDMOND J.M., VON HERZEN R.D.,

GREEN K., WILLIAMS D., BAIMBRIDGE A., CRANE K., VAN ANDEL T.H., 1979.

Submarine thermal springs on the Galapagos rift.

Science, 203, 1073-1083.

CORPE W.A., 1970.

An acid polysaccharide produced by a primary film-forming marine
bacterium.

Dev. Indust. Microbiol., 11, 402-412.

CORPE W.A., 1973.

Microfouling : The role of primary film forming bacteria. In Proc. 3rd Int. Congr. on Marine Corrosion and Fouling. Eds ACKER R.F., BROWN B.F., DE PALMA J.R., IVERSON W.P. Northwestern University Press, Evanston, pp. 598-609.

DEFRETIN R., 1951.

Les constituants glucidiques des mucoprotéines des tubes de quelques Annélides Polychètes tubicoles.

Compt. Rend., 145, 117-119.

DEFRETIN R., 1971.

The tubes of polychaete annelids. In *Comprehensive Biochemistry* (Edited by Florkin M. and Stotz E.H.), Vol. 26C, pp. 713-745. Elsevier, Amsterdam.

DEFRETIN R., BISERTE G., MONTREUIL J., 1949.

Caractérisation des constituants d'une mucoprotéine dans les tubes des polychètes *Onuphis* et *Spirographis*.

C. r. Séanc. Soc. Biol., 143, 1208-1210.

DEMING J.W., BAROSS J.A., 1986.

Solid medium for culturing black smoker bacteria at temperatures to 120°C.

Appl. Environn. Microbiol., 51, 238-243.

DESBRUYERES D., LAUBIER L., 1980.

Alvinella pompejana gen. sp. nov., Ampharetidae aberrant des sources hydrothermales de la ride Est-Pacifique.

Oceanol. Acta., 3, 267-274.

DESBRUYERES D., CRASSOUS P., GRASSLE J., KHRIPOUNOFF A., REYSS D., RIO M., VAN PRAET M., 1982 a.

Données écologiques sur un nouveau site d'hydrothermalisme actif de la ride du Pacifique Oriental.

C. R. Acad. Sci., 295, 489-494.

DESBRUYERES D., LAUBIER L., 1982 b.

Paraalvinella graslei, new genus, new species of Alvinellidae (Polychaeta : Ampharetidae) from the Galapagos rift geothermal vents.

Proc. Biol. Soc. Wash., 93, 484-494.

DESBRUYERES D., GAILL F., LAUBIER L., FOUQUET Y., 1985.

Polychaetous annelids from hydrothermal vents ecosystems : An ecological overview.

Bull. Biol. Soc. Wash., 6, 103-116.

DHIR S.P., BOATMAN E.S., 1972.

Localisation of polysaccharide on *Chlamydia psittaci* by silver-methenamine staining and electron microscopy.

J. Bact., 111, 267-271.

DISCHE Z., 1947.

A new specific color reaction of hexuronic acids.

J. Biol. Chem., 167, 189-198.

DOMON B., COSTELLO C.E., 1988.

A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates.

Glycoconjugate J., 5, 397-409.

DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F., 1956.

Colorimetric method for determination of sugars and related substances.

Anal. Biochem., 28, 350-356.

DUDMAN W.F., LACEY M.J., 1986.

Identification of pyruvated monosaccharides in polysaccharides by gas-liquid chromatography-mass spectrometry.

Carbohydr. Res., 145, 175-191.

DUTTON G.G.S., PAROLIS H., PAROLIS L.A.S., 1986.

The structural elucidation of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* K68.

Carbohydr. Res., 152, 249-259.

EDMOND J.M., VON DAMM K.L., Mc DUFF R.E., MEASURES C.I., 1982.

Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal.

Nature, 297, 187-191.

EDMOND J.M., VON DAMM K.L., 1983.

Les sources chaudes des fonds océaniques.

Pour la Science, 68, 34-49.

ELDER J.W., 1965.

Physical processes in geothermal area.

Am. Geophys. Un. Monogr., 8, 211-239.

ELSON L.A., MORGAN W.T.J., 1933.

Colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine.

Biochem. J., 27, 1824-1828.

ERLICH H.L., 1983.

Manganese oxidizing bacteria from a hydrothermal active area on the Galapagos Rift.

Environn. Biogeochem. Ecol. Bull., 35, 357-366.

FELBECK H., 1981.

Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera).

Science, 213, 223-338.

FERGUSON R.L., RUBLEE P., 1976.

Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton.

Limnol. Oceanogr., 21, 141-145.

FICHTINGER-SCHEPMAN A.N.J., KAMERLIG J.P., VLEGENTHART J.F.G., JONG E.W. de, BOSCH L., WESTBROEK D., 1979.

Composition of a methylated, acidic, polysaccharide associated with coccoliths of *Emiliana huxleyi* (Lohmann) Kamptner.

Carbohydr. Res., 69, 181-189.

FLETCHER M., 1980.

Adherence of marine microorganism to smooth surfaces. In *Bacterial adherence, Receptor and Recognition*, Serie B, Vol.6., Ed. BEACHEY E.H.,

CHAPMAN and HALL, London, pp. 345-374.

FLETCHER M., FLOODGATE G.D., 1973.

Electron microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces.

J. Gen. Microbiol., 74, 325-334.

FOLCH-PI J., LEES M., SLOANE STARLEY G.H., 1957.

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

J. Biol. Chem., 226, 497-509.

FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J., 1981.

Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans.

Anal. Biochem., 116, 489-502.

PRETER R., JONES G.W., , 1976.

Adhesive properties of *Vibrio cholerae*. Nature of the interaction with intact mucosal surfaces.

Inf. Immun., 14, 240-245.

GAILL F., HUNT S., 1986.

Tubes of deep sea hydrothermal vent worms *Riftia pachyptila* (Vestimentifera) and *Alvinella pompejana* (Annelida).

Mar. Ecol. Prog. Ser., 34, 267-274.

GAILL F., 1988.

L'*Alvinella pompejana* des sources hydrothermales est-elle un organisme thermophile.

Oceanis, 14, 595-601.

GAILL F., CHANZY H., VUONG R., 1989.

Structural organization and localisation of the β chitin secreted by deep sea hydrothermal vent worms.

Biol. Cell., 67, 8a.

GASTAMBIDE-ODIER M., VILLE C., 1970.

Desoxysucres isolés du mycoside A : Identification des dérivés acétylés des méthyl 2,4-di-O-méthyl-rhamnopyranoside, 2-O-méthyl-rhamnofuranoside 3-O-méthyl-rhamnofuranoside, 2-O-méthyl-fucopyranoside, et 3-O-méthyl-fucofuranoside.

Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 679-693.

GEESEY G.G., RICHARDSON W.T., YEOMANS H.G., IRVIN R.T., COSTERTON J.W., 1977.

Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream.

Can. J. Microbiol., 23, 1733-1736.

GRASSLE J.F., BERG C.J., CHILDRESS J.J., GRASSLE J.P., HESSLER R.R., JANNASH H.J., KARL D.M., LUTW R.A., MICKEL T.J., RHOADS D.C., SANDERS H.L., SMITH K.L., SOMERO G.N., TURNER R.D., TUTTLE J.H., WALSH D.J., WILLIAMS A.J., 1979.

Galapagos '79 : Initial findings of a deep-sea biological quest.

Oceanus, 22, 2-10.

GRASSLE J.F., 1985.

Hydrothermal vent animals : Distribution and biology.

Science, 229, 713-717.

GRAY G.R., BALLOU C.E., 1971.

Isolation and characterization of a polysaccharide containing 3-O-methyl D-mannose from *Mycobacterium phlei*.

J. Biol. Chem., 246, 6835-6842.

HARWOOD C.S., JANNASCH H.W., CANALA-PAROLA E., 1982.

Anaerobic spirochete from a deep sea hydrothermal vent.

Appl. Environ. Microbiol., 44, 234-237.

HAYASHI A., MATSUURA F., 1976.

The International Symposium on Carbohydrate Chemistry, Abstract p. 85.

HORI T., SUGITA M., ANDO S., TSUKADA K., 1983

Isolation and characterization of a 4-O-methyl glucuronic acid-containing glycosphingolipid from spermatozoa of a fresh water bivalve *Hyriopsis schlegelii*.

J. Biol. Chem., 258, 2239-2245.

HORI T., SUGITA M., ANDO S., KUWAHARA M., KUMAUCHI K., SUGIE E., ITASAKA O., 1981.

Characterization of a novel glycosphingolipid, ceramide nonasaccharide, isolated from spermatozoa of the fresh water bivalve, *Hyriopsis schlegelii*.

J. Biol. Chem., 256, 10979-10985.

HESSLER R.R., SMITHEY W.M.Jr, , 1983.

The distribution and community structure of megafauna at the Galapagos Rift hydrothermal vents. In Hydrothermal processes at seafloor spreading centers, Ed. RONA P.A., BOSTROM K., LAUBIER L., SMITH K.L.Jr, Plenum

Press New York, pp. 735-770.

ITASAKA O., 1966.

Biochemistry of shellfish lipid. VI. Occurrence of 3-O-methylfucose in *Corbicula* glycolipid.

J. Biochem., 60, 435-438.

ITASAKA O., KOSUGE M., OKAYAMA M., HORI T., 1983.

Characterization of a novel ceramide octasaccharide isolated from whole tissue of a fresh-water bivalve, *Corbicula sendai*.

Biochim. Biophys. Acta, 750, 440-446.

IVANOV A.V., 1963.

Pogonophora, Ed. and Transl. CARLISLE D.B., Consultant bureau, New York.

JANNASH H.W., WIRSEN C.O., 1979.

Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers.

Bioscience, 29, 592-598.

JANNASH H.W., WIRSEN C.O., 1981.

Morphological survey of microbial mats near deep-sea thermal vents.

Appl. Environ. Microbiol., 41, 428-438.

JANNASH H.W., 1983.

Microbial processes at deep-sea hydrothermal vents. In Hydrothermal processes of seafloor spreading centers. Eds RONA P.A., BOSTROM K., LAUBIER L., SMITH K.L.jr. Plenum press, New York, pp. 411-419.

JANNASH H.W., NELSON D.C., 1983.

Recent progress in the microbiology of hydrothermal vents. In Current perspectives in microbial ecology. Eds KLUG M.J., REDDY C.A. American Society of Microbiology, Washington D.C. pp. 170-176.

JANNASH H.W., WIRSEN C.O., NELSON D.C., ROBERTSON L.A., 1985.

Thiomicrospira crunogena sp. nov., a colorless, sulfur-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent.

Int. J. Syst. Bact., 35, 422-424.

JONES G.W., 1977.

The attachment of bacteria to the surface of animals cells. In : Microbial Interactions. Receptors and Recognition. Serie B. Vol. 3, pp. 139-176. (REISSING J.L. Ed.), Chapman and Hall, London.

JONES H.C., ROTH I.L., SANDERS W.M.III, 1969.

Electron microscopic study of a slime layer.

J. Bact., 99, 316-325.

JONES M.L., 1981 a.

Riftia pachyptila, new genus, new species, the vestimentiferan worm from the Galapagos rift geothermal vents Pogonophora.

Proc. Biol. Soc. Wash., 93, 1295-1313.

JONES M.L., 1981 b.

Riftia pachyptila Jones : observation on the Vestimentiferan worm from the Galapagos rift.

Science, 213, 333-336.

JONES M.L., 1985.

On the vestimentifera, new phylum : six new species, and other taxa, from hydrothermal vents and elsewhere.

Biol. Soc. Wash. Bull., 6, 117-158.

JONES W.J., LEIGH J.A., MAYER F., WOESE C.R., WOLFE R.S., 1983.

Methanococcus janaschii sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from submarine hydrothermal vent.

Arch. Microbiol., 136, 254-261.

JUNIPER S.K., THOMPSON J.A.J., CALVERT S.E., 1986.

Accumulation of minerals and trace elements in biogenic mucus at hydrothermal vents.

Deep Sea Res., 33, 339-347.

KAMERLING J.P., GERWIG G.J., Vliegenthart J.F.G., CLAMP J.R., 1975.

Characterization by gas liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids.

Biochem. J., 151, 491-495.

KARL D.M., WIRSEN C.O., JANNASH H.W., 1980.

Deep-sea primary production at the Galapagos hydrothermal vents.

Science, 207, 1345-1377.

KELLER-SCHIERLEIN W., MULLER A., 1970.

The sugar component of Aranciamycin : 2-O-methyl-L-rhamnose.

Experientia, 26, 929-930.

KENK V.C., WILSON B.R., 1985.

A new mussel (*Bivalvia*, *Mitilidae*) from hydrothermal vents in the Galapagos rift zone.

Malacologia, 26, 253-271.

KENNE L., LINDBERG B., 1983.

Bacterial polysaccharides. In *The polysaccharides Vol.2.* Ed ASPINAL G.O., Academic press, New-York, pp. 287-363.

KENNEDY L.D., 1980.

Rhizobium extracellular polysaccharide : isolation of 6-deoxy-O-methyl-hexoses.

Carbohydr. Res., 87, 156-160.

KJELLEBERG S., 1984.

Adhesion to inanimate surfaces. In *Microbial adhesion and aggregation.* Ed. MARSHALL K.C. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. pp. 51-70.

KLITGORD K.D., MUDIE J.D., 1974.

The galapagos spreading center : a near bottom geophysical survey.

Geophys. J. R. Astr. Soc., 38, 563-586.

LAU J.M., Mc NEIL M., DARVILL A.G., ALBERSHEIM P., 1987.

Selective degradation of the glycosyuronic acid residues of complex carbohydrates by lithium dissolved in ethylenediamine.

Carbohydr. Res., 168, 219-243.

LAUBIER L., DESBRUYERES D., 1984.

Les oasis du fond des océans.

La Recherche, 161, 1506-1517.

**LEROY Y., LEMOINE J., RICARD G., MICHALSKY J.C., MONTREUIL J.,
FOURNET B., 1990.**

Separation of oligosaccharides by capillary supercritical fluid chromatography and analysis by direct coupling to high-resolution mass spectrometer : application to analysis of oligomannosidic N-glycans.

Anal. Biochem., 184, 235-243.

LILLEY M.D., BAROSS J.A., GORDON L.I., 1983.

Reduced gases and bacteria in hydrothermal fluids : the Galapagos spreading center and 21°N East Pacific Rise. In Hydrothermal processes of Seafloor spreading centers. Eds RONA P.A., BOSTROM K., LAUBIER L., SMITH K.L.jr. Plenum press, New york, pp. 411-419.

LONSDALE P., 1977.

Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers.

Deep Sea Res., 24, 857-863.

LOWRY O.H., ROSENROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951.

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193, 265-275.

Mc ALPINE J.B., CORCORAN J.W., 1971.

Scopamycin.II*. Identification of scopamycin A as 2-O-Methyl-L-rhamnose.

J. Antibiot., 24, 51-56.

Mc LENNAN A.P., RANDALL H.M., SMITH D.W., 1961.

The occurrence of methyl ethers of rhamnose and fucose in specific glycolipids of certain mycobacteria.

Biochem. J., 80, 309-317.

Mc LENNAN A.P., 1962.

The monosaccharides units in specific glycolipids of *Mycobacterium avium*.

Biochem. J., 82, 394-400.

Mc LEOD R.A., 1965.

The question of the existence of specific marine bacteria.

Bacteriol. Rev., 29, 9-23.

Mc NEIL M., CHATTERJEE D., WU HUNTER S., BRENNAN P.J., 1989.

Mycobacterial glycolipids : Isolation, structures, antigenicity, and synthesis of neoantigens.

Methods Enzymol., 179, 215-242.

MAROUDAS N.G., 1975.

Adhesion and spreading of cells on charged surfaces.

J. Theor. Biol., 49, 417-424.

MARSHALL K.C., CRUICKSHANK R.H., 1973.

Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces.

Arch. Mikrobiol. 91, 29-40.

MONTREUIL J., BOUQUELET S., DEBRAY H., FOURNET B., SPIK G., STRECKER G., 1986.

Glycoproteins. In Carbohydrate analysis : a practical approach. Eds. CHAPLIN M.F. and KENNEDY J.F. I.R.L. Press, Oxford, Washington D.C., pp. 143-204.

MONTREUIL J., SPIK G., 1963.

Microdosage des glucides, Fascicule 1 - Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille.

MORT A.J., BAUER W.D., 1982.

Application of two methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharides fragments.

J. Biol. Chem., 257, 1870-1875.

OFEK I., BEACHEY E.H., SHARON N., 1978.

Surface sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence.

Trends Biochem. Sci., 3, 159-160.

OFEK I., MIRELMAN D., SHARON N., 1977.

Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors.

Nature, 265, 623-625.

OKUTANI K., 1974.

Antitumor activity of a polysaccharide preparation from marine bacteria.

Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Uni., 26, 75-78.

OKUTANI K., 1976.

Antitumor polysaccharides produced by a marine *Vibrio*. I. Taxonomic examination of the bacterium.

Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 42, 367-370.

OKUTANI K., 1977.

A viscous antitumor substance obtained from a marine bacterium N° 9-12.

Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 43, 323-328.

OKUTANI K., 1982.

Structural investigation of the fructan from marine bacterium NAM-1.

Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 48, 1621-1625.

OPPENHEIMER C.H., ZOBELL C.E., 1952.

The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure.

J. Mar. Res., 11, 10-18.

PAINTER T.J., 1983.

Algal polysaccharides. In *The polysaccharides Vol.2*. Ed ASPINAL G.O., Academic press, New-York, pp. 195-285.

PARTRIDGE S.M., 1949.

Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars.

Nature, 164, 443.

PARTRIDGE S.M., WESTALL R.G., 1948

Filter-paper partition of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white, and fetal blood of sheep.

Biochem. J., 42, 238-250.

PATE J.L., ORDAL E.J., 1967.

The fine structure of *Chondrococcus columnaris*. III. The surface layer of *Chondrococcus columnaris*.

J. Cell. Biol., 35, 37-51.

PAZ-PARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B., RICARD G., 1984.

A convenient method for methylation of glycoproteins glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion.

Carbohydr. Res., 141, 41-47.

PECINA R., BONN G., BURTCHEER E., BOBLETER O., 1984.

High-performance liquid chromatographic elution behaviour of alcohols, aldehydes, ketones, organic acids and carbohydrates on a strong cation-exchange stationary phase.

J. Chromatogr., 287, 245-259.

PERCIVAL E., YOUNG M., 1974.

Carbohydrates of the brown seaweeds. Part III. *Desmarestia aculeata*.

Carbohydr. Res., 32, 195-201.

PRIEUR D., 1987.

Preliminary study of heterotrophic bacterial communities in waters, in invertebrates from deep sea hydrothermal vent.

Proc. 21st European Marine Biology Symposium, Gdansk, Poland.

PRIEUR D., JEANTHON C., JACQ E., 1987.

Les communautés bactériennes des sources hydrothermales profondes du Pacifique Oriental.

Vie Milieu, 37, 149-164.

PROME J.C., AURELLE H., PROME D., SAVAGNAC A., 1987.

Gas phase glycosidic cleavage of oxyanions from alkyl glycosides.

Org. Mass Spectrom., 22, 6-12.

RAU G.H., 1981.

Hydrothermal vent clams and tube worm $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: Further evidence of nonphotosynthetic food.

Science, 213, 338-339.

REICHSTEIN T., WEISS E., 1962.

The sugars of the cardiac glycosides.

Adv. Carbohydr. Chem., 17, 65-120.

RIMINGTON C., 1931.

The carbohydrate complex of serum proteins. II : Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of ox blood.

Biochem. J., 25, 1062-1071.

RONA P.A., KLINKHAMMER G. NELSEN T.A., TREFRY J.H., ELDERFIED H., 1986.

Black smokers, massive sulfides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge.

Nature, 321, 33-37.

RUBY E.G., WIRSEN C.O., JANNASH H.W., 1981.

Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos rift hydrothermal vents.

Appl. Environ. Microbiol., 42, 317-324.

RUBY E.G., JANNASH H.W., 1982.

Physiological characteristics of *Thiomicrospora* sp. strain L-12 isolated from deep-sea hydrothermal vents.

J. Bact., 149, 161-165.

RUTTER P.A., 1984.

Mecanism of adhesion. In *Microbial adhesion and aggregation*. Ed. MARSHALL K.C. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. pp. 5-19.

SAIER Jr M.H., BALLOU C.E., 1968.

The 6-O-methyl glucose containing lipopolysaccharide of *Mycobacterium phlei*.

J. Biol. Chem., 243, 992-1003.

SAEMAN J.F., MOORE W.E., MITCHELL R.L., MILLETT M.A., 1954.

Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography.

Tappi, 37, 336-343.

SHARON N., 1987.

Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease.

FEBS letters, 217, 145-157.

STEPHEN A.M., 1983.

Other plant polysaccharides. In *The polysaccharides Vol.2*. Ed ASPINAL G.O., Academic press, New-York, pp. 97-193.

SUGITA M., 1979.

Studies on the glycosphingolipids of the starfish, *Asterina pectinifera*.

III. Isolation and structural studies of two novel gangliosides containing internal sialic acid residues.

J. Biochem, 86, 765-772.

SUTHERLAND I.W., 1980.

Polysaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. Ed.

BERKELEY R.C.W., Hellis Horwood limited. pp. 330-338.

SUTHERLAND I.W., 1983.

Microbial exopolysaccharides. Their role in microbial adhesion in aqueous environment.

Crit. Rev. Microbiol., 10, 173-201.

TALMONT F., FOURNET B., 1990.

Chemical composition of mucins from deep sea hydrothermal vent tubicolous annelid worms.

Comp. Biochem. Physiol., 96B, 753-759.



TAYLOR R.L., CONRAD H.E., 1972.

Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups.

Biochem., 11, 1383-1388.

THIERY J.P., 1967.

Mise en évidence des polysaccharides sur coupe fine en microscopie électronique.

J. Microsc. (Paris), 6, 987-1018.

TILLMANS J., PHILIPPI K., 1929.

Über den gehalt der wichtigsten protein der nahrungsmittel an kohlehydrat and über ein kolorimetrisches verfahren zur quantitativen beshimmung von stckstoffreiem zucker in elweiss.

Biochem. Z., 215, 36-60.

TRENT J.D., CHASTAIN R.A., YAYANOS A.A., 1984.

Possible artefactual basis for apparent bacterial growth at 250°C.

Nature, 307, 737-740.

TUNNICLIFFE V., JUNIPER S.K., De BURGH M.E., 1985.

The hydrothermal vent community on axial seamount, Juan de Fuca Ridge.

Biol. Soc. Wash. Bull., 6, 453-464.

TUTTLE J.H., WIRSEN C.O., JANNASH H.W., 1983.

Microbial activities in the emitted hydrothermal waters of the Galapagos Rift vents.

Mar. Biol., 73, 293-299.

UHLINGER D.J., WHITE D.C., 1983.

Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalix in *Pseudomonas atlantica*.

Appl. Environ. Microbiol., 45, 64-70.

VILLE C., GASTAMBIDE-ODIER M., 1970.

Le 3-O-méthyl-L-rhamnose, sucre isolé du mycoside G de *Mycobacterium marinum*.

Carbohydr. Res., 12, 97-107.

WECKESSER J., DREWS G., MAYER H., 1979.

Lipopolysaccharides of photosynthetic prokaryotes.

Ann. Rev. Microb., 33, 215-239.

WEINER R.M., DEVINE R.A., POWELL D.M., DAGASAN L., MOORE R.L., 1985.

Hyphomonas oceantilis sp. nov., *Hyphomonas hirchiana* sp. nov.,

Hyphomonas jannaschiana sp. nov.

Intern. J. Syst. Bact., 35, 237-243.

WHITE R.H., 1984.

Hydrolytic stability of biomolecules at high temperature and its implication for life at 250°C.

Nature, 310, 430-432.

WILLIAMS D.L., VON HERZEN R.P., SCLATER J.G., ANDERSON R.N., 1974.

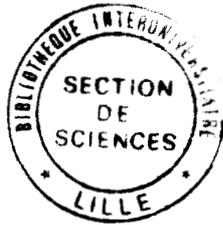
The Galapagos spreading center : Lithospheric cooling and hydrothermal circulation.

Geophys. J. R. Astron. Soc., 38, 587-608.

WIRSEN C.O., TUTTLE J.H., JANNASH H.W., 1986.

Activities of sulfur-oxidizing bacteria at the 21°N East Pacific Rise
Vent site.

Mar. Biol., 91, 449-456.



L'écosystème qui se développe à proximité des sources hydrothermales d'eau profonde possède des caractéristiques physico-chimiques (profondeur, température, pression, présence de métaux lourds) qui en font un milieu très original. Nous avons effectué l'étude biochimique des tubes et mucus de 4 vers caractéristiques du milieu hydrothermal profond : Riftia pachyptila et Tevnia jerichonana (Vestimentifères), Alvinella pompejana et Paralvinella sp (Annelides polychètes). Les tubes des 2 Vestimentifères sont constitués en proportion égale de protéines et de glucides composés en majorité par de la chitine. On observe également des quantités non négligeables d'osés neutres et acides. Le mucus excrété par Paralvinella est très contaminé par le milieu hydrothermal et sa fraction organique ne représente que 10 % de la fraction totale. Cette fraction est composée de 60 % de glucides pour 40% de protéines. La fraction organique du tube d'Alvinella pompejana contient des monosaccharides méthylés originaux : le 2 et le 3-mono-O-méthyl-L-fucose qui sont caractérisés pour la première fois dans le règne animal, ainsi que le 2,4-di-O-méthyl-L-fucose qui est caractérisé pour la première fois dans la nature. Nous avons également isolé, purifié et partiellement caractérisé un polysaccharide excrété par une bactérie qui se développe au niveau de l'épiderme d'Alvinella pompejana. Ce polysaccharide, très anionique, est homogène en électrophorèse sur gel d'agarose et possède un poids moléculaire de 1100 kDa. Il est formé de glucose, galactose, 4,6-O-(1-carboxyéthylidène) galactose, d'acides glucuronique et galacturonique dans les rapports molaires 4, 3, 1, 3, 1. L'utilisation des méthodes d'approche des séquences oligosaccharidiques (en particulier la FAB-CID-MS-MS) nous permettent de tirer des conclusions partielles quant à la structure de cet exopolysaccharide. Celui-ci semble très branché et possède des séquences riches en acides uroniques telles que :

HexUA-HexUA-HexUA-Hex-Hex.