

50376
1991
200

N° d'ordre 768



65885

50376
1991
200

présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE
LILLE FLANDRES-ARTOIS
pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE
Spécialité : BIOCHIMIE

par

THIERRY FONTAINE

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
STRUCTURALE DE POLYSACCHARIDES**

**ETUDE DE L'EXOPOLYSACCHARIDE PRODUIT PAR BACILLUS
CIRCULANS.**

APPLICATION AU SEQUENCAGE DES POLYSACCHARIDES ACIDES

Soutenue le 18 septembre 1991 devant la commission d'examen :

Président : André VERBERT
Rapporteurs : Guy G.S. DUTTON
Gérard STRECKER
Examinateur : Bernard FOURNET
Jean-Bernard LELEU

Ce travail a été effectué 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 de Recherche du CNRS N°111 : Relations structure-fonction des constituants membranaires. Directeur : Monsieur le Professeur André Verbert).

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	5
GENERALITES	
I - LES POLYSACCHARIDES BACTERIENS	
A. Polysaccharides de la paroi bactérienne.	7
B. Polysaccharides excrétés ou exopolysaccharides	8
II - LES POLYSACCHARIDES ANIONIQUES : TECHNIQUES ET APPROCHE STRUCTURALE DES POLYMERES CONTENANT DES ACIDES HEXURONIQUES	
A. Purification des polysaccharides anioniques	10
B. Etude de la composition des polysaccharides contenant des acides uroniques	11
C. Etude structurale	13
1. Méthylation	13
2. Méthodes de rupture des polysaccharides contenant des acides uroniques	14
Conclusions	29
TRAVAUX PERSONNELS	
I - ETUDE DE L'EXOPOLYSACCHARIDE PRODUIT PAR <u>BACILLUS CIRCULANS</u>	30
II - ETUDE DU COMPORTEMENT DE L'ACIDE PYRUVIQUE PRESENT DANS CERTAINS POLYSACCHARIDES LORS DE LA METHANOLYSE ET DU CLIVAGE REDUCTIF	39
III - APPLICATION DE DIFFERENTES TECHNIQUES A L'ETUDE DE POLYSACCHARIDES CONTENANT DES ACIDES URONIQUES	
A. Introduction	62
B. Matériels et méthodes	
1. Réduction des acides uroniques	62

2. Dégradation au lithium dans l'éthylène diamine	6
3. β -élimination	6
4. Décarboxylation oxydative au tétraacétate de plomb	6
5. Dégradation de Hofmann	6
C. Résultats - discussion	6
Conclusions	7
 CONCLUSIONS GENERALES	 7
 BIBLIOGRAPHIE	 8

ABBREVIATIONS

CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
DBU	: Diaza-1,5-biclo-(5,4,0)undé-5-ène
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
GlcN	: Glucosamine
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance
LPS	: lipopolysaccharide
R.M.N.	: Résonance magnétique nucléaire
SM	: Spectrométrie de masse
TMSOTf	: Triméthylsilyl trifluorométhane sulfonate

INTRODUCTION

De nombreuses espèces bactériennes synthétisent des exopolysaccharides que l'on retrouve dans le milieu extérieur. Ces sécrétions se font dans certaines conditions de culture : composition du milieu, pH, température, pression osmotique. Ces exopolysaccharides possèdent des propriétés particulières dues à leur masse moléculaire élevée et à leur structure.

Le ou les rôles biologiques de ces exopolysaccharides ainsi que leurs nombreuses propriétés sont directement liés à leur composition, configuration et conformation. Ainsi, les études qui sont menées sur les polysaccharides bactériens dans le cadre de la connaissance de leurs activités biologiques, de leur synthèse, ou même de leurs propriétés physico-chimiques en vue d'une application nécessitent la connaissance de leur structure.

L'objectif de ce travail concerne la détermination des structures primaires de polymères glucidiques, en particulier de polysaccharides contenant des acides uroniques en utilisant la présence de ces monosaccharides pour appliquer des méthodes de rupture spécifiques.

Après avoir résumé l'état actuel de nos connaissances sur les polysaccharides bactériens et sur les techniques de séquençage des polymères contenant des acides uroniques, nous décrirons les études de la séquence de l'unité de répétition de l'exopolysaccharide bactérien produit par Bacillus circulans.

D'autre part, nous développons une technique de caractérisation de l'acide pyruvique présent dans certains polysaccharides et différentes techniques de séquençage des polysaccharides autour des acides hexuroniques.

Ces travaux ont fait l'objet :

I. des communications suivantes :

Structure primaire du polysaccharide exocellulaire de Bacillus Sp.

T. Fontaine, J-M. Wieruszeski, B. Fournet, M-H. Saniez, P. Duflot and J-B. Leleu

XIII^{ème} Journées de la Chimie et de la Biochimie des Glucides (First Mediterranean Conference on Carbohydrates) 21 - 23 mai 1990, Avignon.

XVII^{ème} Forum des jeunes chercheurs, biochimie et biologie moléculaire, 3 - 6 juillet 1990, Villeneuve d'Ascq.

II. des publications suivantes :

Article 1 :

Exopolysaccharide structure from Bacillus circulans

T. Fontaine, J-M. Wieruszeski, F. Talmont, M-H. Saniez, P. Duflot, J-B. Leleu and B. Fournet.

Eur. J. Biochem. 196, (1991) 107-113.

Article 2 :

Analysis of pyruvic acid acetal containing polysaccharides by methanolysis and reductive cleavage methods.

T. Fontaine, F. Talmont, G.G.S. Dutton and B. Fournet

Anal. Biochem. sous presse.

GENERALITES

A. Purification des polysaccharides anioniques

L'étude d'un polymère nécessite sa purification. La présence de fonctions acides sur un polysaccharide permet d'utiliser des techniques déjà décrites pour les polyanions.

La précipitation sélective des polyanions par des sels d'ammonium quaternaire tels que le bromure de cetyltriméthylammonium (cetavlon, $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3Br$) ou le bromure de cetylpyridinium ($C_{16}H_{33}NC_5H_5Br$) permet de les isoler d'un mélange contenant des macromolécules neutres (Scott, 1965). Ce fractionnement est fondé sur l'interaction ionique entre les ammoniums quaternaires et les fonctions acides. La chaîne aliphatique du sel permet l'agrégation des polyanions et leur précipitation. Ce complexe est tellement stable qu'il nécessite une force ionique importante pour sa dissociation.

La présence des fonctions acides permet l'utilisation de la chromatographie d'échange d'anions. Cette technique est utilisée dans le fractionnement de différents glycosaminoglycannes isolés de tissus (Mc Devitt et Muir, 1971; Hranisavljevic et al., 1972).

La présence des charges est également mise à profit dans la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide qui permet d'estimer la taille moléculaire de ces polysaccharides anioniques (Mc Devitt et Muir, 1971; Hsu et al., 1974).

B- Etude de la composition des polysaccharides contenant des acides uroniques : identification et dosage des acides uroniques.

L'étude de la composition nécessite une analyse qualitative et quantitative.

- Identification des acides uroniques.

Les méthodes classiques d'analyse des monosaccharides sous forme de leurs méthyl glycosides triméthylsilylés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) permettent l'identification des acides uroniques par leur temps de rétention et leurs spectres de masse (Vanlaeke et al., 1989; Saady et Blanke, 1990). Toutefois, la stabilité de la liaison

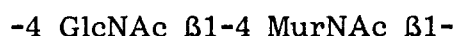
I - LES POLYSACCHARIDES BACTERIENS

Indépendamment de la souche bactérienne, les polysaccharides sont classés en différents groupes en fonction de leur localisation cellulaire.

A. Polysaccharides de la paroi bactérienne.

En fonction de la capacité des parois bactériennes à fixer le violet de gentiane, les bactéries sont classées en deux grands groupes : bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. Cette propriété repose sur la composition de ces parois.

La paroi des bactéries à Gram positif se caractérise par la présence d'un constituant majeur, le peptidoglycane, responsable de la rigidité des cellules (Schleifer et Kandler, 1972). Ce polysaccharide est constitué d'unités disaccharidiques de répétition :



La rigidité est conférée par des liaisons croisées constituées d'enchaînements peptidiques.

Ce peptidoglycane est associé à un autre type de polymère, les acides teichoïques (Archibald et Baddiley, 1966). Ces composés de faible poids moléculaire sont constitués de ribitol ou de glycérol reliés par des liaisons phosphodiester. Selon l'espèce bactérienne, il existe quelques variations dans la composition de ces molécules, portant sur la nature des acides aminés et des monosaccharides.

Les lipopolysaccharides (LPS) forment un autre type de polymère glucidique constitutif de l'enveloppe. Ils sont spécifiques des bactéries à gram négatif.

Ils présentent trois parties :

Le lipide A renferme un noyau disaccharidique (GlcN $\beta 1-6$ GlcN) sur lequel sont greffés des acides gras. L'acide 3 hydroxy (D) myristique, caractéristique des LPS, est conjugué spécifiquement sur les fonctions amines des osamines. Le lipide A contient aussi des groupements phosphoester et phosphoéthanolamine (Galanos et al., 1977; Rosner et al., 1979).

Le core est lié au lipide A par l'intermédiaire d'une molécule de Kdo ou acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique. Il est constitué par l'enchaînement de monosaccharides dont des heptoses (L-glycéro-D-manno-heptose) (Galanos et al., 1977). On note la présence de groupements phosphates et phosphoéthanolamines. La structure du core est variable d'une souche bactérienne à l'autre.

La fraction polysaccharidique externe est responsable de la spécificité antigénique du LPS. Sa structure, qui détermine l'antigène O de la bactérie est formée d'unités glycosidiques de répétition dont le nombre varie de 1 à 30. Elle comporte des sucres particuliers : dideoxy-hexoses (paratose, abequose, tyvelose) (Sutherland, 1975), acide 2-acétamido-2-deoxy- β -D-mannuronique (Männel et Mayer, 1978), 3N-3,6-dideoxy β -D-glucopyranose (D-Qui3N) (Banoub et Shaw, 1981) mais aussi la présence de substituants non glucidiques : acétates, L-sérine, pyruvate, acide 2,4-dihydroxy-butanoïque, etc. (Kenne et Lindberg, 1983). Cette très grande variabilité est illustrée par l'identification chez E. coli de plus d'une centaine de sérotypes O.

B. Polysaccharides excrétés ou exopolysaccharides.

Les exopolysaccharides bactériens forment une gangue autour de la cellule que l'on appelle aussi capsule. Ils sont liés de façon plus ou moins lâche à la cellule et n'interviennent pas dans sa rigidité.

Ces polysaccharides sont répertoriés en plusieurs classes selon leur structure (Sutherland, 1972).

Les homopolysaccharides ne renferment qu'un seul type de monosaccharide. Ces molécules ne sont pas spécifiques des organismes qui les synthétisent (ex : dextrane (Hehre, 1941), levane (Hestrin et al., 1943)).

Les hétéropolysaccharides sont constitués de monosaccharides différents. Ils forment un vaste groupe et sont composés d'unités de répétition de 2 à 10 monosaccharides. Leur structure est spécifique de la souche productrice, ils forment chez les bactéries à Gram négatif les antigènes K, ainsi 80 sérotypes K ont été décrits chez Klebsiella pneumoniae.

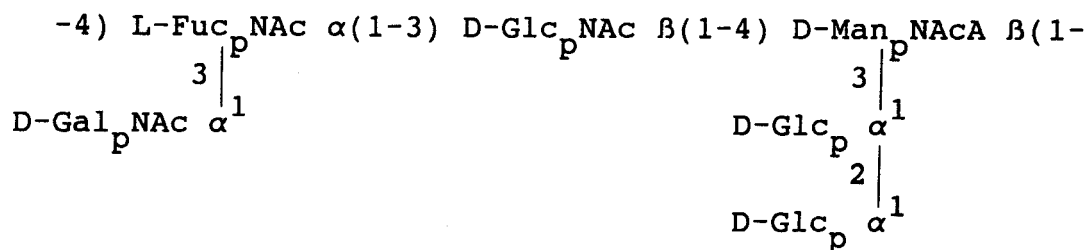
Outre des hexoses neutres, leur composition révèle la présence de nombreux monosaccharides particuliers : sucres méthylés, aminés, carboxyéthylés (Kenne et Lindberg, 1983), mais aussi la présence de substituants tels que l'acétate, le phosphate, le succinate, le pyruvate, des acides aminés, etc. Leur structure est indépendante de celle des LPS (Perry et al., 1990). Nous avons résumé dans la figure 1 quelques exemples d'unités de répétition d'exopolysaccharides.

De façon générale, leur poids moléculaire élevé (de l'ordre du million) et leur structure sont responsables des conformations particulières qui déterminent les propriétés physico-chimiques et par conséquent, leurs rôles et leurs applications. Ainsi la formation de gel, la capacité de rétention d'eau, la chélation d'ions, la présence de groupements anioniques (Sutherland, 1988) expliquent leurs capacités à former une barrière entre la bactérie et le milieu extérieur (Dudman, 1977), ainsi que leur propriété d'adhésion sur un support (Berkeley et al., 1980; James et al., 1982; Sutherland, 1983). D'autre part, les séquences de ces polymères sont responsables de phénomènes de reconnaissance spécifique comme les associations Rhizobium-légumineuse (Tsien et Schmidt, 1981), et bactérie-bactériophage (Lindberg, 1973).

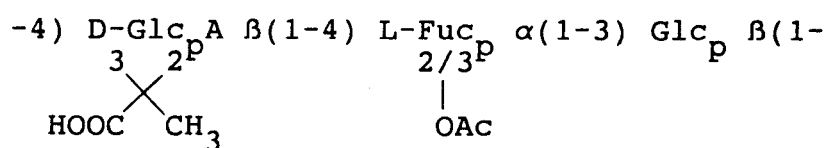
II - LES POLYSACCHARIDES ANIONIQUES : TECHNIQUES ET APPROCHE STRUCTURALE DES POLYMERES CONTENANT DES ACIDES HEXURONIQUES

De nombreux exopolysaccharides possèdent des groupements acides. Les fonctions acides peuvent être portées par des acides uroniques, des acides sialiques, des substituants non glucidiques (pyruvate, phosphate, sulphate). Ces groupements anioniques interviennent dans les propriétés antigéniques et rhéologiques du polymère.

A



B



C

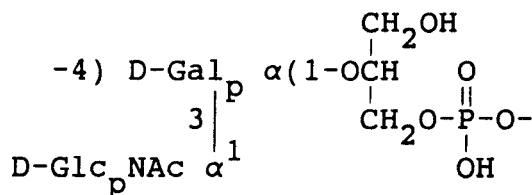


Figure 1 : Structure de l'unité de répétition de trois exopolysaccharides :

A : Exopolysaccharide de Streptococcus pneumoniae type 12A (Leontein et al., 1983)

B : Exopolysaccharide de Klebsiella species (Jansson et al. 1988).

C : Exopolysaccharide de Actinobacillus pleuropneumoniae type 3. (Perry et al., 1990).

uronosidyle empêche la libération quantitative des acides uroniques et limite leur dosage.

Il est également possible d'utiliser la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour la détermination des acides uroniques libérés par hydrolyse acide (acide trifluoroacétique 4N, 4H, 100°C). La chromatographie d'exclusion d'ions permet la séparation en 15 minutes des acides glucuronique et galacturonique et des monosaccharides neutres (Pecina et al., 1984; Cardon, 1986). La chromatographie d'échange d'anions permet également cette séparation en utilisant soit une détection UV à 210nm (Gacesa et al., 1983), soit une détection ampérométrique pulsée (Martens et Frankenberger, 1990; Whitfield et al., 1991).

- Quantification des acides uroniques.

L'identification des acides uroniques par CPG et HPLC nécessite leur libération. La stabilité de la liaison uronosidyle empêche cette libération quantitative. Ainsi le dosage de ces monosaccharides nécessite souvent l'utilisation de méthodes colorimétriques telles que le carbazol (Dische, 1962) ou le méta-hydroxy diphényle (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973).

Le dosage des acides uroniques peut être effectué par les méthodes classiques d'analyse des monosaccharides neutres après réduction de la fonction carboxylique en alcool primaire. Les différentes techniques reposent toutes sur le même principe : activation de la fonction acide puis réduction par un hydrure.

L'activation peut se faire par la formation de la lactone correspondante. La lactonisation est effectuée à pH 4,75 à l'aide d'un carbodiimide, puis la réduction est effectuée par un borohydrure à pH 7. (Taylor et Conrad, 1972; Anderson et Stone, 1985; York et al., 1985). Ces dernières techniques nécessitent plusieurs cycles de réduction pour obtenir une réaction complète (Quintero et al., 1989).

L'activation peut également être effectuée par méthylestérification de la fonction acide : soit par une solution de méthanol chlorhydrique à froid (Fazio et al., 1982), soit par l'utilisation de diazométhane (Jones and Perry, 1957; Aspinall, 1965). Dans ces deux cas, la réduction est faite par un borohydrure après dialyse et lyophilisation du polysaccharide modifié. Dutton et al. (1986a) effectuent

la méthylestérification des acides hexuroniques par méthanolyse du polysaccharide (MeOH/HCl 0.5N, 80°C, 16H), suivie d'une réduction par le borohydrure de potassium dans le méthanol. Le dosage quantitatif de tous les monosaccharides est enfin réalisé après hydrolyse (acide trifluoroacétique 2N, 2H, 100°C).

C. Etude structurale

L'étude structurale d'un polysaccharide contenant des acides uroniques nécessite la même méthodologie que pour l'ensemble des polymères glucidiques, à savoir l'obtention d'oligosaccharides plus faciles à étudier par les techniques classiques : résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13, spectrométrie de masse. Toutefois, il est nécessaire de connaître la substitution de chaque monosaccharide constitutif du polymère pour sélectionner les techniques de rupture sélective. On utilise, pour ce faire, la méthylation.

1. Méthylation des polysaccharides contenant des acides uroniques.

La méthylation permet l'étherification de tous les hydroxyles libres et, après clivage des liaisons osidiques, apparaissent les hydroxyles engagés dans ces liaisons. La première étape consiste à former des alcoolates sous l'action d'une base forte, puis à fixer le groupement méthyle par attaque nucléophile sur un donneur de méthyle. Les méthodes utilisées pour les polysaccharides dérivent de la méthode décrite par Hakomori (1964). La base utilisée est le méthylsulfinyl de sodium. D'autres bases du même type sont également employées : le méthylsulfinyl de potassium (Darvill et al., 1978; Philipps et Fraser, 1981), le méthylsulfinyl de lithium (Blakeney et Stone, 1985; Paz Parente et al., 1985; D'Ambra et al., 1988).

Le donneur de méthyle utilisé est l'iodure de méthyle, qui, lors de ce protocole, est ajouté après action de la base.

La soude comme base (Ciucanu et Kerek, 1984) est peu utilisée pour la méthylation des polysaccharides et provoque des phénomènes de β -élimination en présence d'acides uroniques (Gunnarsson, 1987) qui n'ont pas lieu en présence de carbanions (Somme, 1986). En effet, les bases classiques, contrairement à la soude, sont des agents nucléophiles détruits en présence d'iodure de méthyle.

2. Méthodes de rupture des polysaccharides contenant des acides uroniques

La méthode la plus simple et la plus efficace est l'utilisation d'enzymes spécifiques qui permettent l'obtention de l'unité de répétition que l'on peut analyser facilement. Cette méthodologie a été utilisée sur des exopolysaccharides de Klesiella pneumoniae et Escherichia coli en utilisant des enzymes phagiques. (Dutton et al., 1986b; Parolis et al., 1989). En l'absence de ces enzymes très spécifiques, il est nécessaire d'avoir recours à des ruptures chimiques. A côté des méthodes classiques telles que l'oxydation periodique (Goldstein et al., 1965), l'oxydation chromique (Angyal et James, 1970), les hydrolyses ménagées (Saeman et al., 1954) et autres solvolyses qui permettent l'obtention d'oligosaccharides, il existe des réactions de clivage sélectif de tel ou tel monosaccharide. La fonction carboxylique des acides uroniques leur confère des propriétés qui peuvent être mises à profit pour obtenir des ruptures spécifiques.

Parmi les différentes techniques de rupture au niveau des acides uroniques, on peut distinguer deux catégories en fonction de la nécessité de modifier le polysaccharide avant la réaction.

a. Dégradation sur le polysaccharide natif

Photolyse

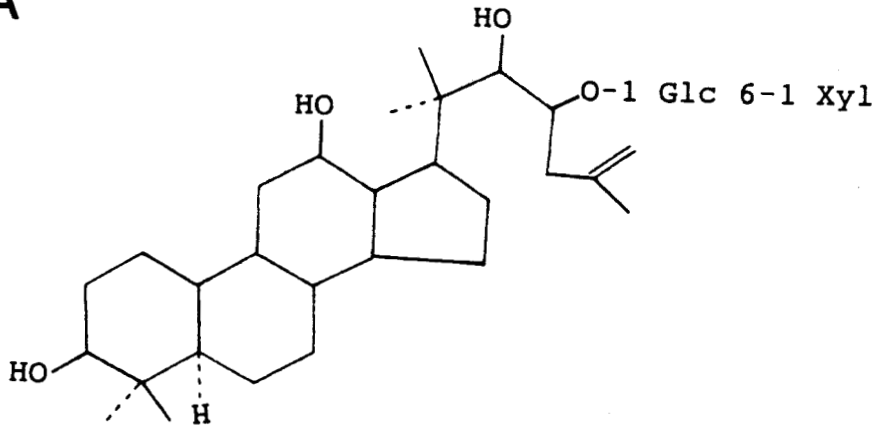
La radiation UV est connue et utilisée depuis longtemps pour la dégradation de polymères glucidiques neutres tels l'amidon et la cellulose (Philipps, 1963). Ce traitement, en transformant les fonctions alcools en groupements carbonyles est responsable de l'augmentation du pouvoir réducteur du polymère ainsi traité. Mogilevkii et Laufer (1951) ainsi que Balazs et al. (1959) ont effectué l'irradiation de mucopolysaccharides sous forme sodium en solution aqueuse par une lampe à mercure. Les auteurs décrivent que l'augmentation du pouvoir réducteur de la solution, qui s'accompagne de la diminution de la viscosité et de la taille moléculaire, correspond à une dégradation de l'acide glucuronique. Ce sont les seuls exemples, à notre connaissance, d'irradiation UV sur un polysaccharide acide.

Toutefois, il est important de noter que cette technique est utilisée sur un autre type de molécule contenant des acides uroniques : les saponines. Les saponines sont des substances d'origine végétale ou échinodermique constituées de deux parties : une partie hydrophobe, correspondant à un triterpène ou un stérol et une partie hydrophile, composée d'un ou plusieurs oligosaccharides linéaires ou branchés reliés à l'aglycone sur un groupement hydroxyle ou sur une fonction carboxylique (Hiller et Voigt, 1977; Hiller et Adler, 1982). Certaines saponines possèdent des oligosaccharides liés à la sapogénine par un acide glucuronique (Kitagawa et Yoshikawa, 1977; Schöpke et Hiller, 1990) (Fig. 2). Une irradiation UV à 254 nm de ce type de molécule en solution méthanolique permet le clivage de la liaison uronosidyle et ainsi la libération de l'oligosaccharide avec des rendements de l'ordre de 75% (Kitagawa et al., 1983). Un mécanisme réactionnel a été proposé pour la photolyse du méthyl glycoside, méthyl ester de l'acide glucuronique (Bradbury et Von Sonntag, 1978) (Fig 3). Sous l'action d'une irradiation UV, il y a formation d'un radical libre sur la fonction ester suivie de l'ouverture du cycle et de plusieurs réactions radicalaires dont une seule permet la libération du méthyl glycoside.

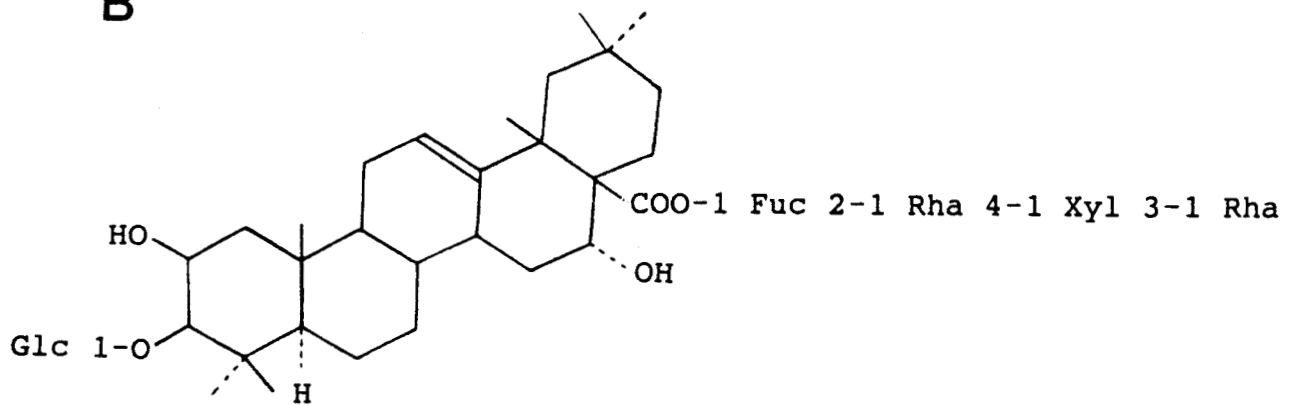
Dégradation au lithium solide dans l'éthylène diamine.

Cette technique de dégradation des acides uroniques présents dans un polysaccharide a été décrite pour la première fois par Mort et Bauer en 1982. En effet, à partir de l'exopolysaccharide produit par Rhizobium japonicum contenant un acide galacturonique dans sa chaîne principale, le lithium solide dans l'éthylène diamine a permis d'obtenir un oligosaccharide correspondant à l'unité de répétition dépourvue de l'acide uronique. Lau et al. (1987a), par une étude plus approfondie de cette méthode, démontrent que le lithium provoque une rupture sélective de la liaison uronosidyle ainsi que la libération des substituants en 2 et 4 de ce monosaccharide. Ils notent également l'élimination des substituants non glucidiques tels que l'acétate, pyruvate et méthoxyle déjà décrite par Monneret et al. (1974). Lau et al. (1987a et b) ont utilisé cette technique sur divers polysaccharides, bactériens et végétaux, en obtenant des rendements satisfaisants (50 à 80%). Concernant la substitution en 3 des acides uroniques, Lau et al. (1987a) montrent que ce substituant reste lié sur le résidu d'acide

A



B



C

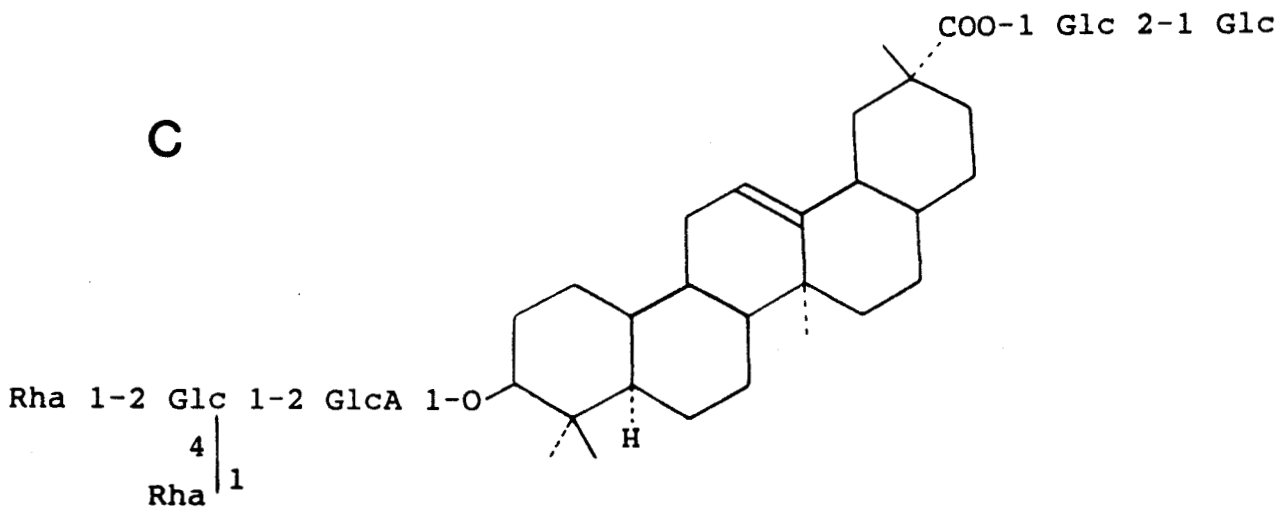


Figure 2 : Structure de trois saponines (Schöpke et Hiller, 1990) extraites de :

- A : Gynostemma pentaphyllum.
- B : Crocoshmia crocosmiiflora.
- C : Cyamopsis tetragonoloba.

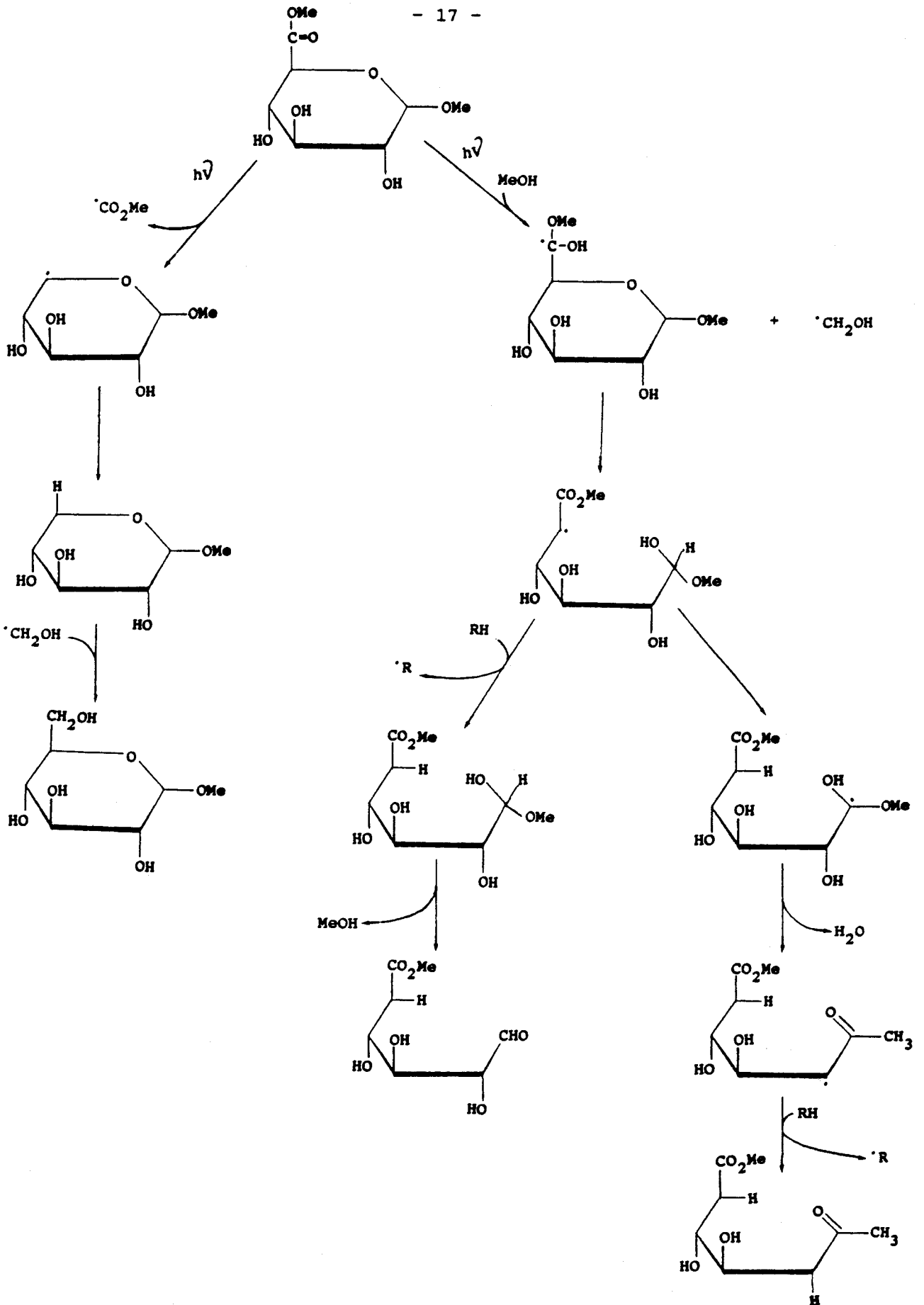


Figure 3 : Photolyse du méthyl glycoside méthyl ester de l'acide glucuronique (Bradbury et Von Sonntag, 1978).

uronique, ce qui est en contradiction avec les résultats de Mort et Bauer (1982).

Le mécanisme réactionnel n'est pas connu, toutefois le lithium en présence d'ammoniac ou d'une alkylamine est un réducteur, notamment des fonctions carboxyliques (Burgstahler et al., 1963; Smith et al., 1967). Le développement de la coloration bleue pendant la réaction indique la présence de phénomènes radicalaires.

L'importance de cette technique est l'obtention d'oligosaccharides natifs, facilement analysables par RMN.

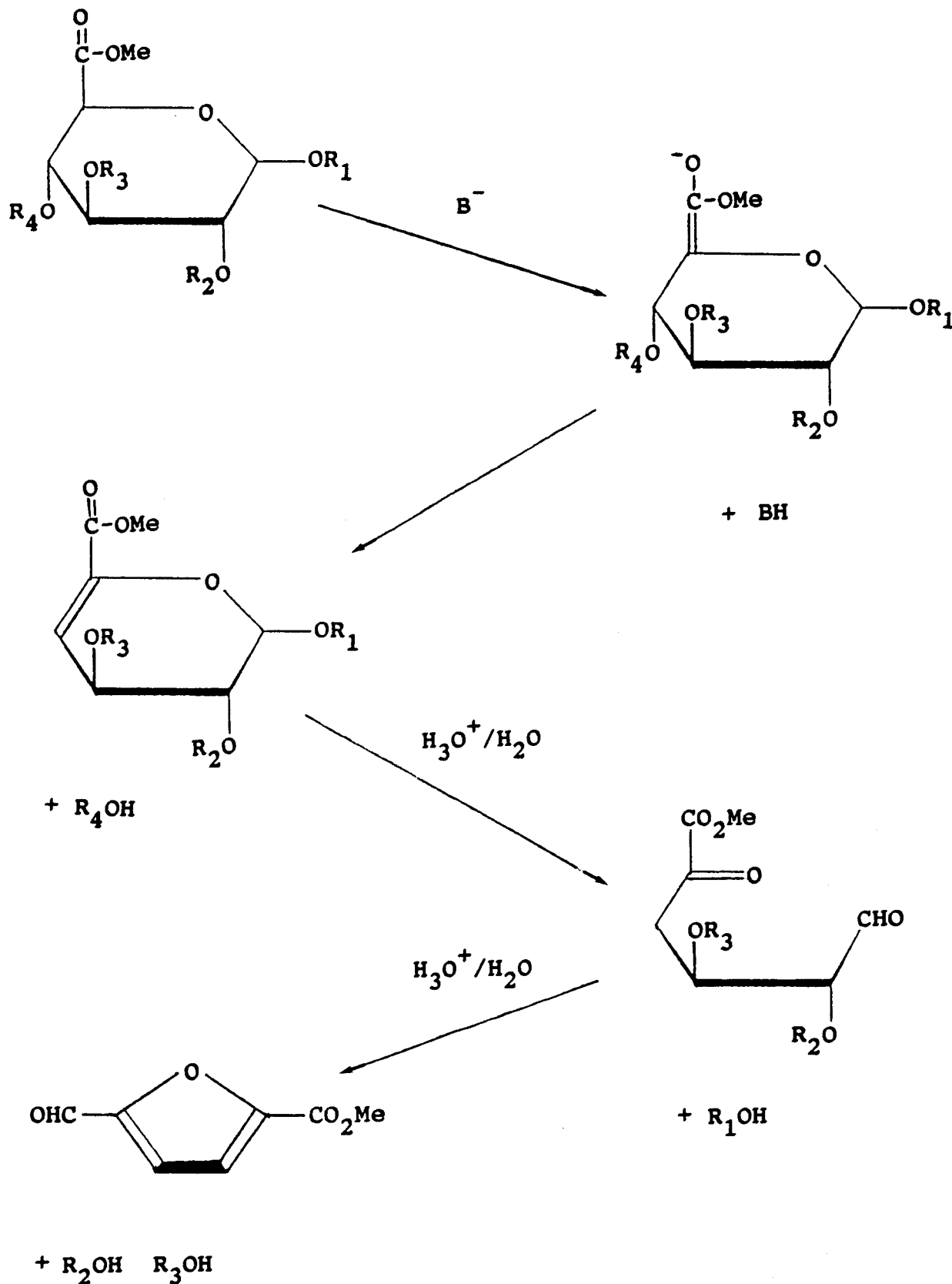
b. Dégradation sur le polysaccharide modifié

Afin d'activer la fonction carboxylique des acides uroniques ou plus simplement de solubiliser le polysaccharide dans les réactifs, il est parfois nécessaire de modifier le polymère.

β-élimination des acides uroniques

Cette technique est la plus connue et la plus utilisée pour le séquençage des polymères contenant des acides uroniques. En effet, une fonction carbonyle ou une fonction carboxylique sous forme ester ou amide est un centre électroattracteur, qui en présence d'une base permet une réaction de β-élimination. Ainsi il est possible de libérer les glycannes de glycolipides ou de glycoprotéines liés O-glycosidiquement (Carlson, 1966; Aminoff et al., 1980; Hakomori, 1983).

L'application de cette technique au niveau d'un acide uronique d'un polysaccharide a été effectuée par Mc Cleary et al. en 1967, puis par Lawson et al. en 1969. Ils montrent que le méthoxyde de sodium dans le méthanol dégrade les acides uroniques méthylestérifiés et libère le substituant en C-4. Cette technique de β-élimination a été détaillée par l'équipe de Lindberg (Lindberg et al., 1973; Björndal et al., 1973; Curvall et al., 1975; Lindberg et Lönngren, 1976). Ils proposent le mécanisme réactionnel décrit dans la figure 4. La méthode se déroule en deux étapes : dans un premier temps, il y a β-élimination en présence d'une base et libération du substituant en C-4 de l'acide uronique; dans un second temps, on réalise une hydrolyse ménagée qui coupe la liaison de l'acide uronique modifié, et qui libère ses substituants en C-2 et C-3.



$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$: sucre ou groupement méthyle

Figure 4 : Réaction de β -élimination (Lindberg et al., 1973).

Cette méthode est effectuée sur les polysaccharides perméthylés en présence de 2,2 diméthoxypropane soit par action du méthoxyde de sodium dans le méthanol, soit du méthylsulfinyl de sodium dans le DMSO. Ainsi, à partir de l'exopolysaccharide de Klebsiella type 52 perméthylé, il a été possible d'isoler par cette technique un tétrasaccharide et d'établir la séquence de l'unité de répétition (Björndal et al., 1973).

D'autres bases de dégradation peuvent être employées :

- le diaza-1,5-bicyclo-[5,4,0]-undé-5-cène (DBU) en présence d'anhydride acétique dans le benzène a été utilisé sur des polysaccharides d'origine végétale après perméthylation (Aspinall et Chaudhari, 1975; Aspinall et al., 1975; Gowda et al., 1983).

- La triéthylamine en présence d'anhydride acétique a été utilisée sur des polysaccharides peracétylés (Lindberg et al., 1978). Dans ce cas, la fonction carboxylique est sous forme d'anhydride mixte. Les auteurs indiquent que le rapport triéthylamine/anhydride acétique est important pour l'optimisation de la réaction. Le rendement dépend également du degré de substitution de l'acide uronique. Les groupements O-acyl étant facilement éliminés en milieu alcalin, cette technique permet l'obtention d'oligosaccharides déacylés.

- La pyridine en présence d'anhydride acétique a été utilisée pour la dégradation d'acides uroniques contenus dans des saponines. (Kitagawa et al., 1977; Kitagawa et Yoshikawa, 1977). Les saponines étant solubles dans la pyridine, il n'est pas nécessaire de les modifier.

Les méthodes les plus utilisées sont celles qui utilisent le méthoxyde de sodium ou le méthylsulfinyl de sodium. Elles fournissent les meilleurs rendements.

Décarboxylation oxydative (dégradation au tétraacétate de plomb)

Cette méthode fut développée par Kitagawa et al. (1977) pour l'étude des saponines, et ensuite fut adaptée aux polysaccharides. A partir d'une saponine perméthylée et acide (fonction carboxylique libre), les auteurs décrivent que le tétraacétate de plomb, chauffé à reflux dans le benzène, permet la décarboxylation et l'acétoxylation en

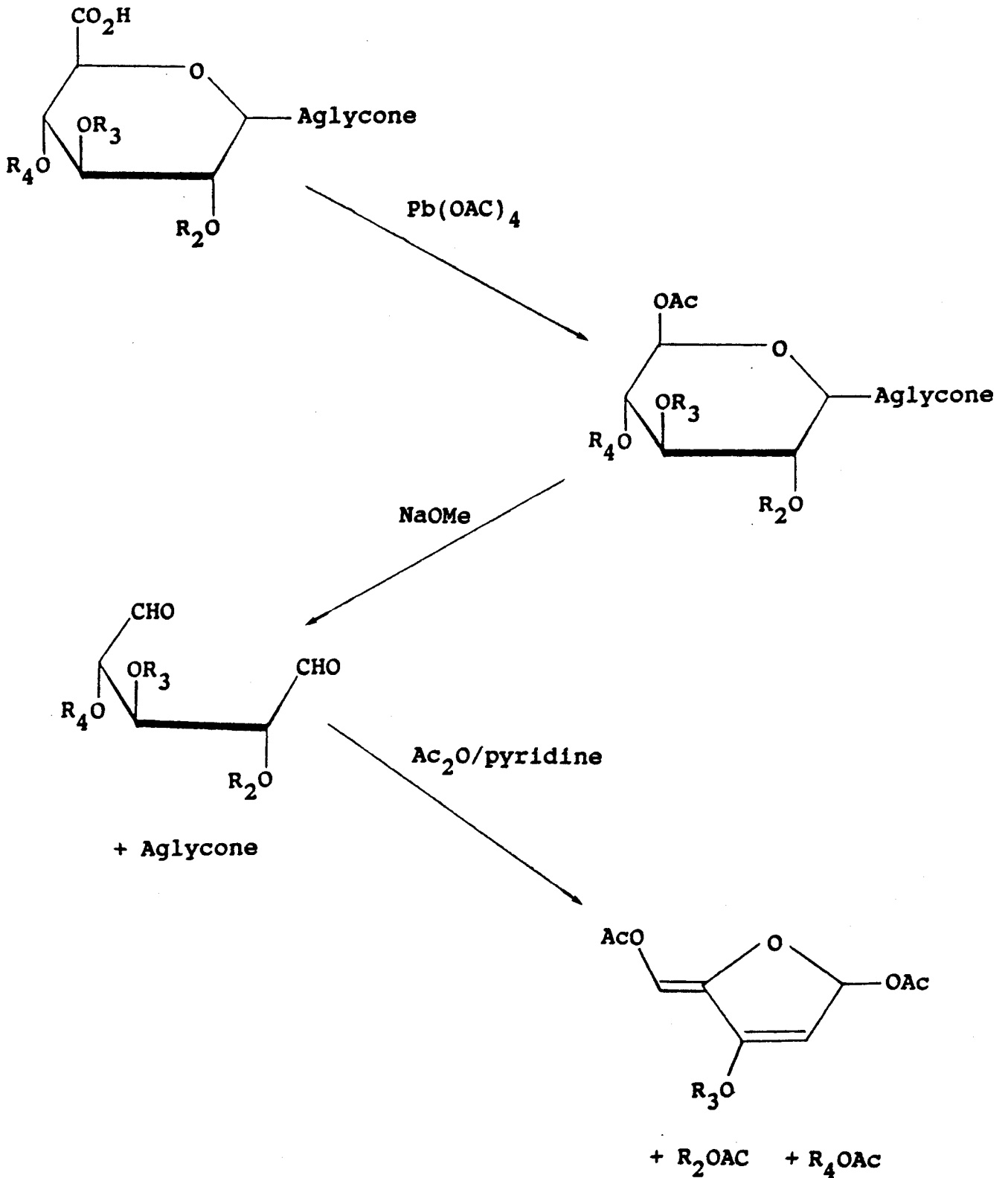
C-5 de l'acide glucuronique. Puis par l'action de méthoxyde de sodium suivie d'une acétylation (anhydride acétique/pyridine), il y a libération de l'aglycone et des substituants en C-2 et C-4 de l'acide uronique (Kitagawa et al., 1977, 1978). Le mécanisme réactionnel, proposé par Kitagawa est présenté dans la figure 5.

Cette technique a été adaptée aux polysaccharides contenant des acides uroniques par Aspinall et ses collaborateurs (Aspinall et al., 1981, 1984, 1989). Sur le polysaccharide perméthylé, Aspinall transforme les groupements méthyl esters en fonctions carboxyliques par action de la soude à pH=12. Après action du tétraacétate de plomb dans le benzène, Aspinall effectue une réduction du dialdéhyde formé par un borohydrure, puis analyse les produits de dégradation. Ainsi à partir d'un polysaccharide de Drosera, il découpe le polysaccharide au niveau de tous les acides glucuroniques en les transformant en xylitol sans libérer les substituants des acides uroniques. Les oligosaccharides alditols ainsi obtenus sont analysés, après deutérométhylation, par CPG/SM. (Aspinall et al., 1984) (Fig. 6).

Dégradation de Hofmann

La dégradation de Hofmann consiste en la transformation d'une fonction amide en fonction amine sous l'action de l'hypochlorite de sodium. Appliquée aux acides uroniques, la transformation d'une glycopyranosiduronamide en 5-aminopentose rend la liaison osidique très fragile en milieu acide (Kochetkov et al., 1967a; 1967b).

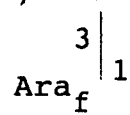
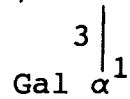
L'utilisation de cette technique sur un polysaccharide acide nécessite la modification de la fonction carboxylique en fonction amide. Cette première étape peut être effectuée soit par l'ammoniaque liquide, technique utilisée pour l'extraction de xylane de bouleau (Wang et al., 1964; Kochetkov et al., 1970; Mian et Percival, 1973), soit par une solution de méthanol saturée en ammoniac (Kochetkov et al., 1973). Dans ce dernier cas, le polysaccharide doit être perméthylé pour être soluble dans le méthanol. La figure 7 représente les différentes étapes de la réaction. Comme pour la dégradation au tétraacétate de plomb, on obtient la transformation de l'acide hexuronique en pentodialdose auquel restent attachés tous les sucres externes au résidu d'acide uronique. Cette technique a été utilisée pour plusieurs types de polysaccharides : polysaccharides produits par des plantes (Mian et Percival, 1973;



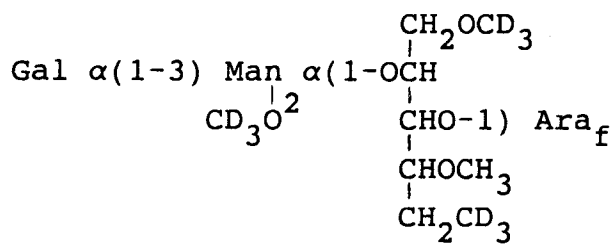
$\text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$: sucre ou groupement méthyle

Figure 5 : Réaction de décarboxylation oxydative d'un acide uronique contenu dans une saponine (Kitagawa *et al.*, 1977, 1978).

-4) GlcA β (1-2) Man α (1-4) GlcA β (1-2) Man α (1-4) GlcA β (1-



Méthylation (ICH_3)
 Saponification (NaOH , $\text{pH}=12$)
 Dégradation au tétraacétate de plomb
 Réduction (BH_4K)
 Méthylation (ICD_3)



+

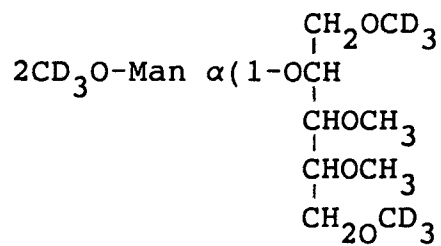
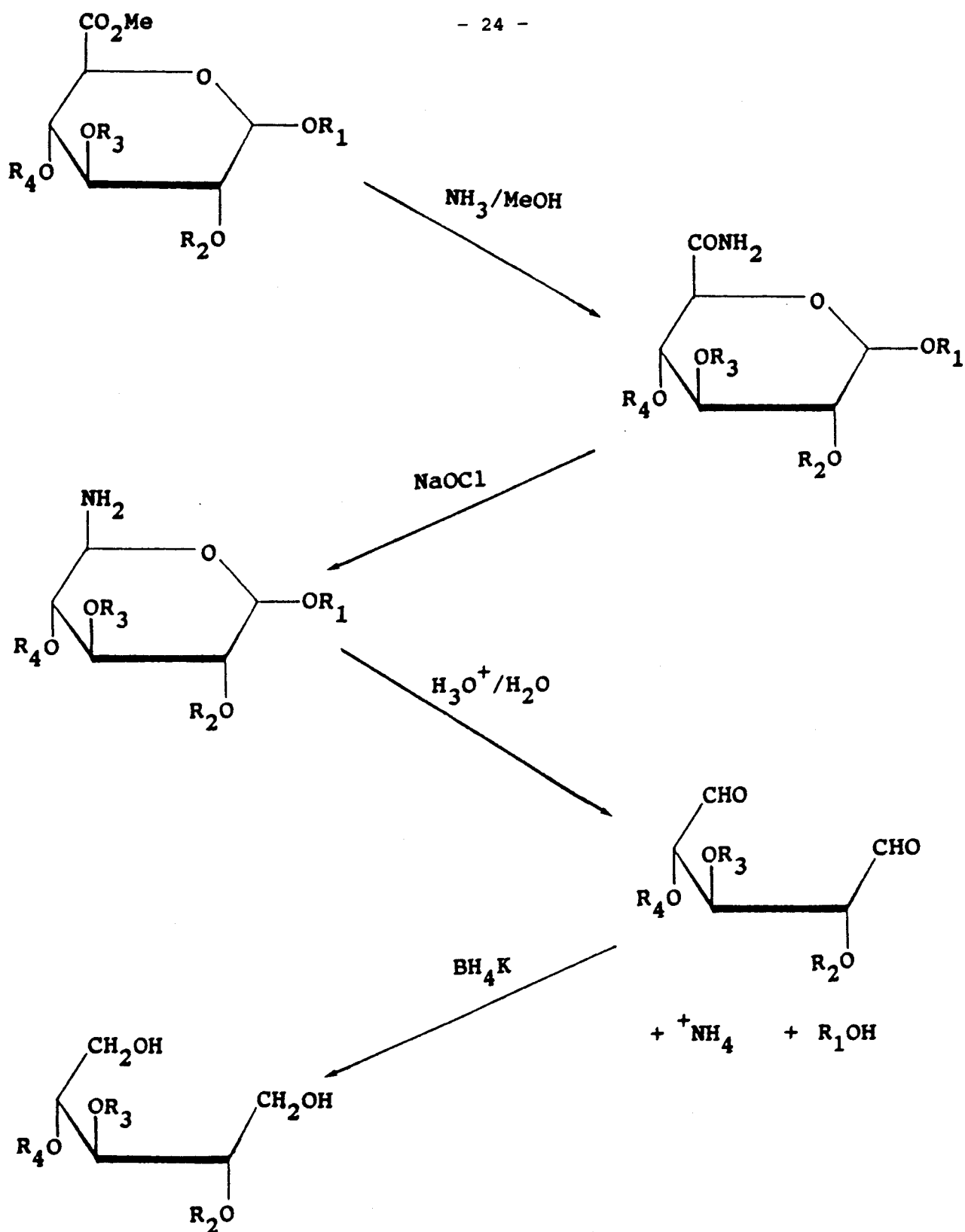


Figure 6 : Application de la réaction de décarboxylation oxydative des acides uroniques à l'étude d'un polysaccharide de Drosera (Aspinall et al., 1984).



$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$: sucre ou groupement méthyle

Figure 7 : Schéma réactionnel de la dégradation de Hofmann appliqué aux acides uroniques (Kochetkov et al., 1967b).

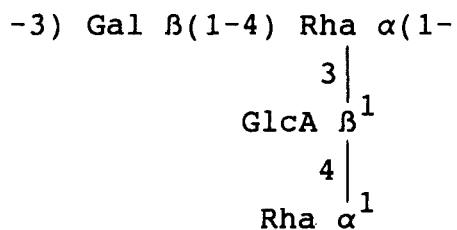
Kochetkov et al., 1970); par des levures (Kochetkov et al., 1973; Kochetkov et al., 1975), par des bactéries (Aspinall et Rosell, 1978b).

La figure 8 présente une application de la dégradation de Hofmann à l'étude de la séquence de l'unité de répétition de l'exopolysaccharide de Klebsiella pneumoniae type K47. Dans ce cas les auteurs libèrent un disaccharide, analysé par couplage CPG/SM, correspondant à la chaîne latérale du polymère. D'autre part, la chaîne principale porte un deutérométhoxyle qui marque le point de branchement de la chaîne latérale. (Aspinall et Rosell, 1978b).

Dégradation hex-5-énose

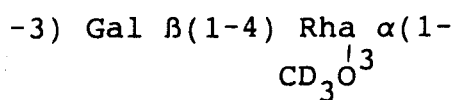
Cette méthode fut développée par l'équipe d'Aspinall. Elle consiste à transformer les acides hexuronopyranosides en hex-5-énopyranosides très labiles en milieu acide (Aspinall et al., 1976; Aspinall et Rosell, 1978a). Cette modification chimique, effectuée sur un polysaccharide perméthylé, nécessite plusieurs étapes (Fig. 9). La première étape consiste en la réduction des fonctions méthyl esters en fonction alcool par l'hydrure double d'aluminium et de lithium, suivie de l'halogénéation spécifique des alcools primaires par le N-iodosuccinimide en présence de triphénylphosphite. Enfin, l'action d'une base (DBU) réalise la transformation du 6-iodo-6-deoxyhexopyranoside en hexéno-5-pyranoside facilement hydrolysable en milieu acide (Lindberg et al., 1975; Aspinall et Rosell, 1977). Aspinall (1986) utilise le zinc pour dégrader le 6-iodo-6-deoxy-hexopyranoside qui s'accompagne de la rupture de la liaison glycosidique. La réduction en présence d'un borodutérure permet l'obtention d'un hexénitol sur lequel restent fixés les différents substituants de l'acide uronique initial.

L'application de cette technique à l'étude d'un polysaccharide de plante (Khaya ivorensis) a permis de le séquencer (Aspinall et al., 1988) (Fig. 10). Les différents oligosaccharides alkylés obtenus sont séparés par HPLC sur une colonne de silice en utilisant le benzène contenant 6% de méthanol comme éluant. Puis ils sont analysés par spectrométrie de masse et par RMN du proton (Mc Neil et al., 1982).



↓

Méthylation (ICH₃)
Amidation (NH₃/Méthanol)
Oxydation par NaOCl
Hydrolyse ménagée
Réduction (BH₄Na)
Méthylation (ICD₃)



+

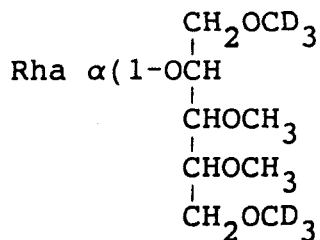
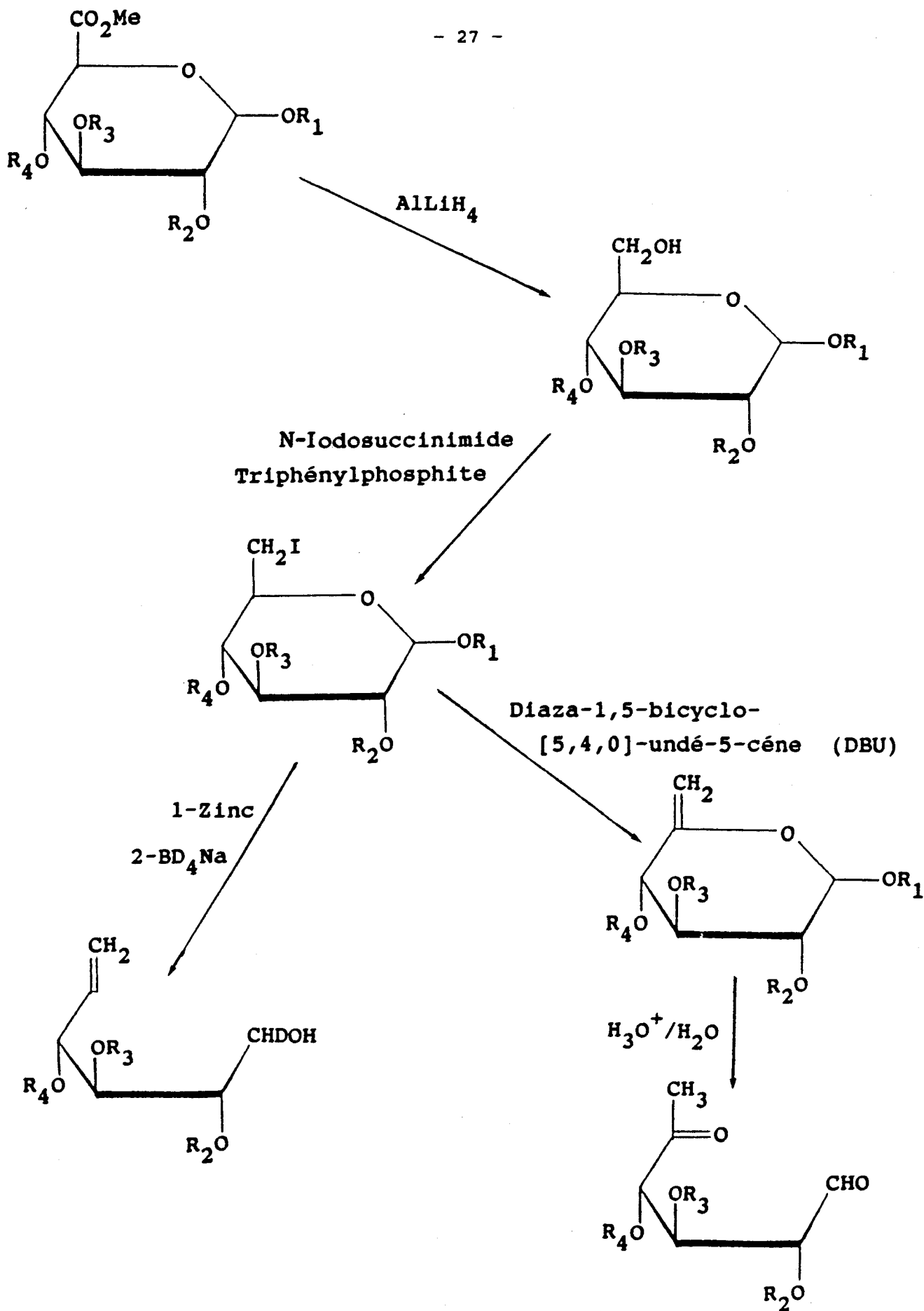
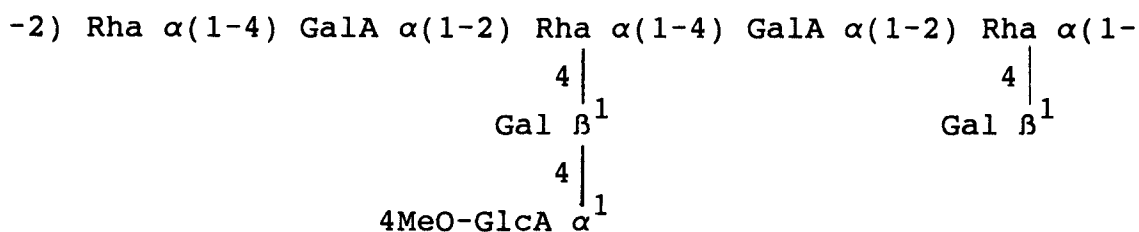


Figure 8 : Application de la réaction de Hoffman à l'étude de l'unité de répétition de l'exopolysaccharide de Klébsiella pneumoniae type K47 (Aspinall et Rosell, 1978).

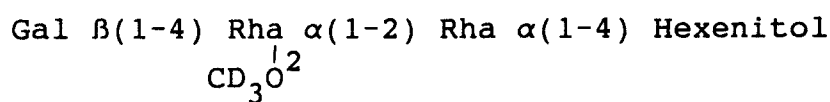


$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4$: sucre ou groupement méthyle

Figure 9 : Schéma réactionnel de la dégradation hex-5-énose des acides uroniques (Lindberg et al., 1975; Aspinall, 1976).



Méthylation
 Réduction LiAlH_4
 N-iodosuccinimide/triphénylphosphite
 Dégradation en présence de zinc
 Réduction BD_4Na
 Méthylation (ICD_3)



+

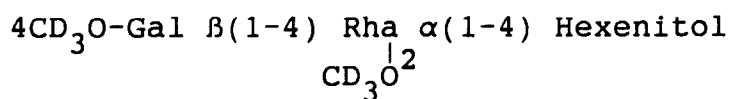


Figure 10 : Application de la dégradation hex-5-énoise des acides uroniques à l'étude d'un polysaccharide végétal isolé de Khaya ivorensis (Aspinall et al., 1988).

Conclusions

Un acide uronique contenu dans un polysaccharide représente un point de rupture sélective de ces polymères. La dégradation par le lithium solide dans l'éthylénediamine, qui s'effectue sur le polymère natif constitue une méthode simple pour obtenir des fragments oligosaccharidiques facilement analysables par les techniques classiques. Les différentes méthodes de dégradation des acides uroniques sur le polysaccharide modifié consistent à rendre la liaison uronosidyle très labile en milieu acide. Ces dégradations peuvent conserver les substituants de l'acide uronique (tétraacétate de plomb, Hofmann, hex-5-énose) ou les éliminer (β -élimination).

Ces méthodes sont complémentaires d'autres techniques telles que les hydrolyses ménagées. En effet, la stabilité de la liaison uronosidyle permet d'isoler facilement le disaccharide : acide uronique-X, appelé acide aldobiouronique, de déterminer sa composition et de caractériser cette liaison osidique.

TRAVAUX PERSONNELS

I - ETUDE DE L'EXOPOLYSACCHARIDE PRODUIT PAR BACILLUS CIRCULANS.

Ce travail a été effectué en collaboration avec la société Roquette Frères (Lestrem, France). En effet, cette amidonnerie utilise ce Bacillus circulans pour la production d'un enzyme : la cyclodextrine glucosyl transférase (EC 2.4.1.19). Cet enzyme réalise à partir d'un substrat amylicé, la synthèse de cyclodextrines.

Dans certaines conditions de culture, cette souche bactérienne excrète une macromolécule glucidique qui augmente considérablement la viscosité du moût de fermentation. Ceci engendre des problèmes de purification et d'utilisation de l'enzyme.

Notre but a donc été d'isoler ce polymère, et d'en déterminer sa structure afin éventuellement de pouvoir contrôler la viscosité des mouts de fermentation par attaque enzymatique du polymère.

Exopolysaccharide structure from *Bacillus circulans*

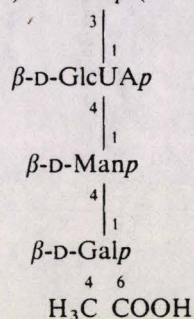
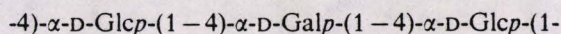
Thierry FONTAINE¹, Jean-Michel WIERUSZESKI¹, Frank TALMONT¹, Marie-Hélène SANIEZ², Pierrick DUFLOT², Jean-Bernard LELEU² and Bernard FOURNET¹

¹ Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, France

² Roquette Frères, Lestrem, France

(Received July 24/August 30, 1990) – EJB 90 0894

The exopolysaccharide harvested from the liquid culture medium after *Bacillus circulans* fermentation consists of the following hexasaccharide repeating unit:



Bacillus circulans is used for the production of enzymes, particularly cyclodextrin glucanotransferase [1] and some amylases [2]. However, during the fermentation process using particular conditions, this bacteria is able to excrete into the culture medium a polysaccharide responsible for the increase in viscosity. In this paper, we report the isolation and structure determination using chemical techniques, mass spectrometry, ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy of the exopolysaccharide from *B. circulans*.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria and cultivation

Bacillus circulans was obtained from Roquette Frères (Lestrem, France) and grown in a fermentor at pH 7.5 and 37 °C in 20-l batches containing 15% crushed potatoes, 1.5% CaCO₃ and 0.36% bio-soyase (bioMerieux, Marcy l'Etoile).

Isolation and purification of the polysaccharide

The bacterial cells were eliminated from the liquid cultures by centrifugation for 10 min (2000 × g). The polysaccharide was precipitated from the supernatant by addition of 0.08 vol. aqueous 3% cetyltrimethylammonium bromide (Cetavlon) at room temperature. The polysaccharide was extracted from

the precipitate with 500 mM sodium sulfate, precipitated by addition of 3 vol. ethanol, and dialysed against distilled water. Pure exopolysaccharide was obtained by anion-exchange chromatography on a column (35 × 3.4 cm) of DEAE-trisacryl (IBF France) equilibrated with 0.05 M Tris/HCl pH 8.6. The column was fed with the same buffer (600 ml) followed by a step gradient of sodium chloride (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 and 1 M) in the same buffer (600 ml); 4-ml fractions were collected.

Gel filtration was performed on a Sepharose 2B column (Pharmacia Fine Chemicals; 110 × 1.8 cm) using 0.5% acetic acid as the eluant.

Analytical methods

Uronic acid was determined directly on the polysaccharide with the carbazol reagent [3]. Neutral monosaccharides were analysed by GLC as their trimethylsilylated methyl glycosides obtained after methanolysis (0.5 M HCl in methanol, 24 h, 80 °C) and trimethylsilylation and alditol acetates obtained after hydrolysis (4 M trifluoroacetic acid, 6 h, 100 °C), reduction and peracetylation [4]. Identifications were confirmed by GLC/MS applying the same gas chromatographic conditions as for GLC. The configuration of glycosides was established by capillary GLC of these trimethylsilylated (–)-2-butylglycosides [5].

Methylation analysis

In the first step, the polysaccharide (10 mg) dissolved in formamide (4 ml) was peracetylated by the mixture of pyridine/acetic anhydride (1:1, by vol.; 4 ml) at room temperature during 24 h. After dialysis and freeze-drying, the

Correspondence to B. Fournet, Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du CNRS n 111, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Abbreviations. p, pyranose; GlcUA, glucuronic acid; GLC/MS, gas-liquid chromatography/mass spectrometry.

Enzyme. Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19).

peracetylated polysaccharide was methylated with dimethylsulfoxide/lithium methylsulfinyl carbanion/methyl iodide according to the procedure described by Paz-Parente et al. [6]. The methyl ethers were obtained either (a) after hydrolysis (4 M trifluoroacetic acid, 6 h, 100 °C) and analysed as partial polyol acetate by GLC/MS or (b) after methanolysis (0.5 M MeOH/HCl, 24 h, 80 °C) and analysed as partially methylated methyl glycosides by GLC/MS [7] or (c) after reductive cleavage with trimethylsilyltrifluoromethane sulfonate/CaH₂ in CH₂Cl₂ [8] and analysed as partially methylated anhydroalditol acetates by GLC/MS.

Carboxyl reduction of the polysaccharide

The reduction of the carboxyl groups in the permethylated polysaccharide was performed by lithium borohydride in tetrahydrofuran after partial methanolysis (MeOH/0.5 M HCl, 6 h, 80 °C). The methyl ethers were analysed after methanolysis and hydrolysis by GLC/MS.

Periodate oxidation

Periodate oxidation of the polysaccharide (8 mg) was performed according to Goldstein et al. [9]. After reduction, the carbohydrate composition of the resulting material was obtained by GLC after methanolysis and hydrolysis.

Partial acid hydrolysis

Oligosaccharides (aldobiouronic acid) were isolated by partial acid hydrolysis of the polysaccharide with 2 M trifluoroacetic acid for 2.5 h at 100 °C. An acidic oligosaccharide was isolated by gel filtration chromatography on Sephadex G-10 (Pharmacia 90 × 1.2 cm) using water as eluant. The carbohydrate composition of the oligosaccharide was performed after hydrolysis (4 M trifluoroacetic acid, 4 h, 100 °C) by ion-exclusion chromatography on Aminex HPX 87H (BioRad, 300 × 7.8 mm, H⁺ form) using 5 mM H₂SO₄ as eluant. The sequence of the aldobiouronic acid was obtained by GLC/MS of the permethylated oligosaccharide alditol and by ¹H- and ¹³C-NMR analysis.

Uronic acid degradation

β-Elimination of permethylated polysaccharide (10 mg) was performed using lithium methylsulfinyl carbanion [10]. After partial hydrolysis (50% aqueous acetic acid, 100 °C, 1 h) the resulting material was ethylated and analysed as described above.

Selective degradation of the glycosyluronic acid residues of the native polysaccharide was performed with lithium in ethylenediamine as described by Lau et al. [11]. The lithium-resistant polysaccharide was isolated by ethanol precipitation (10 vol.). The resulting oligosaccharides in the supernatant were isolated by gel-filtration on TSK HW40 (S) (Merck) and structural determinations were carried out by methylation, GLC/MS and ¹H-NMR spectroscopy. The degraded polysaccharide contained in the ethanol precipitate was also analysed for carbohydrate composition and methylation analysis.

Oxidation with chromium trioxide

Chromic oxidation was performed during 1 h and 2 h at 50 °C in an ultrasonic bath according to Hoffman et al. [12]. The resistant monosaccharides were analysed by GLC.

¹H- and ¹³C-NMR analysis

400-MHz ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker AM-400WB spectrometer (Centre commun de mesure, USTL-FA). The polysaccharide was dissolved in ²H₂O (99.96 atom% ²H). The spectra were recorded at a probe temperature of 80 °C. Resolution enhancement was achieved by Lorentzian to Gaussian transformation [13]. Chemical shifts (δ) were expressed in ppm downfield from internal sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3-²H₄)propionate.

100-MHz ¹³C-NMR spectra were recorded with a Bruker AM-400WB spectrometer. The sample (60 mg in 1 ml ²H₂O) was analysed at 80 °C with the standard program POWGATE (¹H broadband with composite-pulse decoupling, D₁ 1 s; PW = 90° = 4.8 μs; S₁ = S₂ = 1 W). Spectral width was 25 kHz for the 32 K frequency-domain and time-domain data points.

Mass spectrometry

Analyses of oligosaccharides obtained from native polysaccharide after partial acid hydrolysis and lithium degradation were performed after reduction and permethylation by GLC/MS in the following conditions: Girdel 300 or Delsi apparatus, capillary column (25 m × 0.2 mm) filled with DB-1, column temperature 150–250 °C with a temperature gradient of 4 °C/min, helium pressure 40 kPa. Mass spectra were recorded on a Nermag 10-10S mass spectrometer (Rueil-Malmaison, France) using an electron energy of 70 eV and an ionizing current of 0.2 mA.

RESULTS

Isolation and characterization of the polysaccharide

From 100 g liquid culture, 270 mg pure polysaccharide was isolated by Cetavlon precipitation and chromatography on DEAE-trisacryl (elution by 200 mM NaCl). The polysaccharide was shown to be homogeneous by gel-permeation chromatography on Sepharose 2 B.

The analysis of the polysaccharide using a colorimetric assay and GLC of the derived alditol acetates and of the trimethylsilylated(–)-2-butyl glycosides showed D-glucose, D-galactose, D-mannose and D-glucuronic acid in the molar ratio 1.95:1.73:1:1.03 (Table 1).

The presence of pyruvic acid was detected by ¹³C-NMR analysis of the native polysaccharide (Fig. 1) and by the characterization by GLC/MS of methyl 4,6-O-(1-carboxymethylester-ethylidene)-2,3-O-trimethylsilyl-D-galactoside obtained after methanolysis of the native polysaccharide and trimethylsilylation of the resulting methyl glycosides [14].

Methylation analysis

The polysaccharide was methylated according to Paz-Parente et al. [6]. After methanolysis, or hydrolysis, or reductive cleavage of permethylated polysaccharide, the methylated products were analysed by GLC/MS [7, 15, 16]. The results are shown in Table 2. The methylated polysaccharide contains 2,3,6 tri-O-methyl-D-glucose, 2,3,6-tri-O-methyl-D-mannose, 2,3-di-O-methyl-4,6-O-(1-carboxymethylester-ethylidene)-D-galactose (identified after methanolysis and after reductive cleavage), 2,6-di-O-methyl-D-galactose (which is not released by methanolysis but identified after hydrolysis, or reductive cleavage) and 2,3-di-O-methyl-D-glucuronic acid

(identified as methyl-L-gulonate after reductive cleavage [16]) in the molar ratio 2.1:1.0:1.2:1.1:0.4 (Table 2).

As can be seen in Table 2, analysis of methyl ethers, obtained after methanolysis and reductive cleavage, by GLC/MS allows the methyl ether of galactose, substituted by a pyruvic acid residue, to be characterized directly. Methyl 2,3-di-*O*-methyl-4,6-*O*-(1-carboxymethylester-ethylidene)-*D*-galactoside can be deduced from the chemical ionization spectrum (Fig. 2A) due to the ions at m/z 324 ($M + 18$), 292 ($M - 32 + 18$), 275 (A_1 ion) and 247 (B ion) and from the electron impact spectrum (Fig. 2A') due to the ions at 247 (B ion) and 88 (C ion). Methyl 2,3-di-*O*-methyl-4,6-*O*-(carboxymethylester-ethylidene)-1,5-anhydro-*D*-galactitol can be deduced from the chemical ionization spectrum (Fig. 2B) due to the ions at m/z 294 ($M + 18$), 277 ($M + 1$), 217 (B ion) and from the electron impact spectrum (Fig. 2B') by the ion at m/z 217 (B ion).

When the permethylated polysaccharide was carboxyl-reduced with $LiBH_4$, 0.8 residue 2,3-di-*O*-methyl-*D*-glucose was obtained, indicating that the glucuronic acid was substituted in position 4 in the native polysaccharide. In addition the

transformation of glucuronic acid to glucose allowed us to identify methyl 2,6-di-*O*-methyl-*D*-galactoside after methanolysis (Table 2). This result shows that the glucuronic acid is linked to galactose in the native polysaccharide. Furthermore, the carboxyl reduction of the methylated polysaccharide followed by either methanolysis or hydrolysis released the pyruvyl substituent or galactose as indicated by the identification of 2,3-di-*O*-methyl-*D*-galactose (Table 2).

Table 2. Analysis of methyl ethers obtained from *B. circulans* exopolysaccharide and derived products

I, polysaccharide, permethylated; II, polysaccharide, permethylated and reduced with $LiBH_4$; III, polysaccharide, permethylated, base-degraded [10] and ethylated; IV, polysaccharide, lithium-degraded [11] and permethylated; M, methanolysed and acetylated; H, hydrolysed, reduced and acetylated; RC, reductive cleaved and acetylated [8]. 2,3,6-Glc indicates: M, methyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-4-*O*-acetyl-*D*-glucoside; H, 2,3,6-tri-*O*-methyl-1,4,5-tri-*O*-acetyl-*D*-glucitol; RC, 2,3,6-tri-*O*-methyl-4-*O*-acetyl-1,5-anhydro-*D*-glucitol. 2,3-(4,6-X)-Gal: M, methyl 2,3-di-*O*-methyl-4,6-*O*-(1-carboxymethylester-ethylidene)-*D*-galactoside; RC, 2,3-di-*O*-methyl-1,5-anhydro-4,6-*O*-(1-carboxymethylester-ethylidene)-*D*-galactitol. 2,3-GlcUA: RC, methyl 2-*O*-acetyl-3,6-anhydro-4,5-di-*O*-methyl-L-gulonate [16]

Methyl ethers	Molar ratios of methyl ethers							
	I			II		III		IV
	M	H	RC	M	H	M	H	M
2,3,6-Man	1	1	1	1	1	0.1	0.1	0.4
2,3,6-Glc	1.8	2.2	2.3	1.9	2.2	2	2	2
2,3-Gal	—	1.2	—	0.9	1.1	—	—	—
2,3-(4,6-X)-Gal	1.2	—	1.1	—	—	—	—	0.1
2,6-Gal	—	1.2	1.0	1.2	1.1	—	—	—
2,3-GlcUA	—	—	0.4	—	—	—	—	—
2,3-Glc	—	—	—	0.8	0.7	—	—	—
3-Et-2,6-Gal	—	—	—	—	—	0.7	0.9	—
2,3,6-Gal	—	—	—	—	—	—	—	0.6
2,3,4,6-Gal	—	—	—	—	—	—	—	0.2

Table 1. Sugar analysis of native polysaccharide, periodate-resistant product, lithium-resistant polysaccharide and chromium-trioxide-resistant product

Hexoses were determined by GLC of the alditol acetate, hexuronic acid by the carbazol reagent

Monosaccharide	Amount in carbohydrate				
	native	IO_4Na -resistant	Li-resistant	CrO ₃ -resistant	
				1 h	2 h
Mannose	1	0.14	0.35	0.52	0.33
Glucose	1.95	0.4	2.0	2.0	2.0
Galactose	1.73	1	1	1.03	0.9
Glucuronic acid	1.03	—	—	—	—

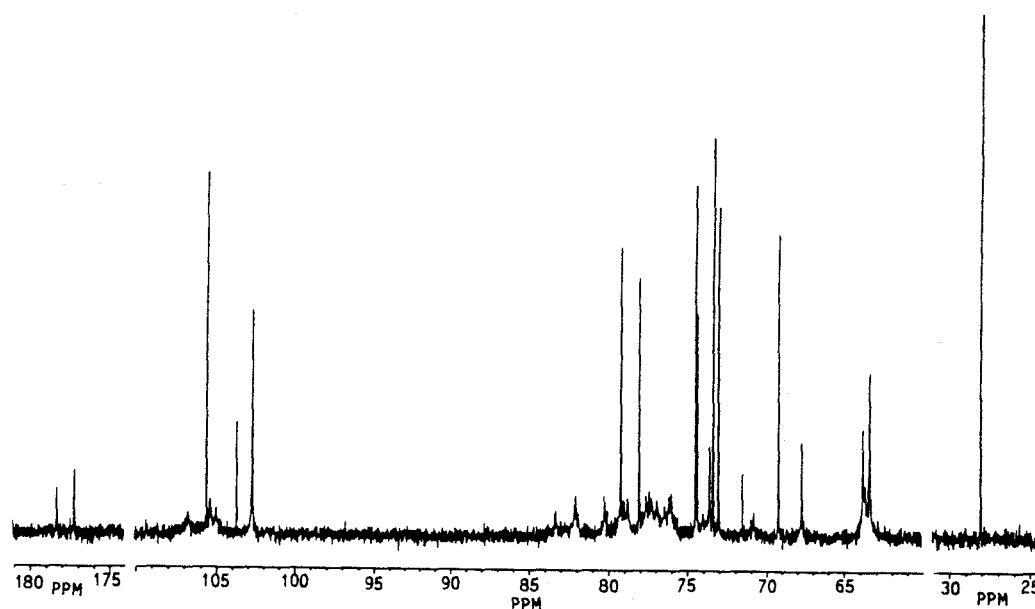
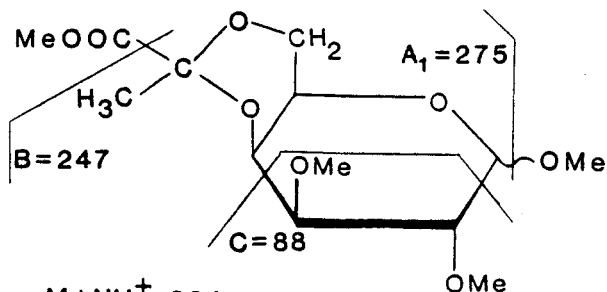
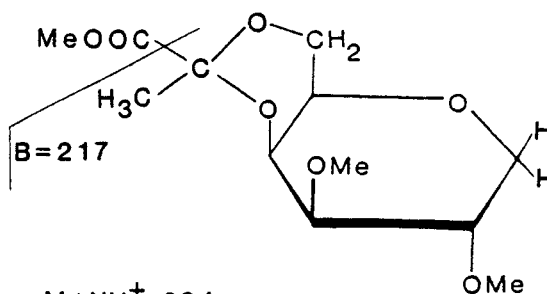


Fig. 1. ^{13}C -NMR spectra of native polysaccharide from *B. circulans*

110



$M+NH_4^+=324$
 $M+H^+=307$
 $M-MeOH+NH_4^+=292$



$M+NH_4^+=294$
 $M+H^+=277$

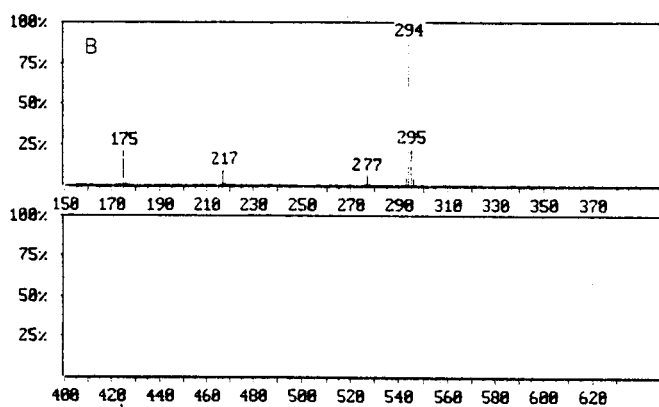
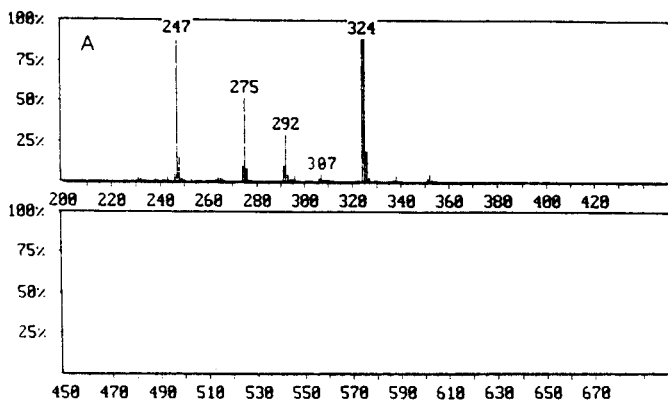


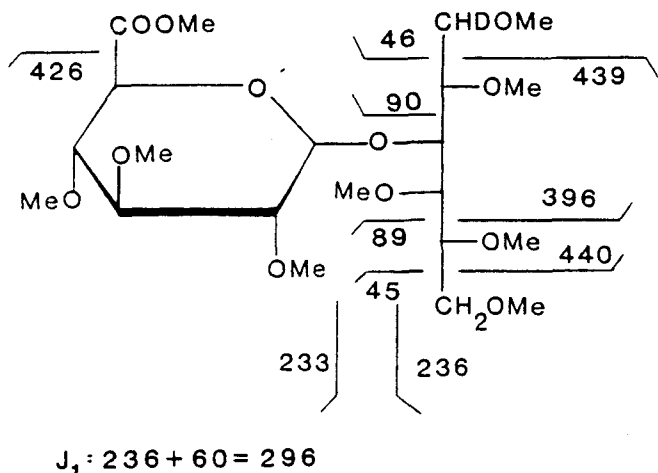
Fig. 2. Chemical ionization (A) and electron impact (A') mass spectra of methyl 2,3-di-O-methyl-4,6-O-(1-carboxymethylester-ethylidene)-D-galactoside and chemical ionization (B) and electron impact (B') mass spectra of 2,3-di-O-methyl-4,6-O-(1-carboxymethylester-ethylidene)-1,5-anhydro-D-galactitol

Table 3. Proton chemical shifts and coupling constants of the aldobiouronic acid obtained after mild hydrolysis of *B. circulans* exopolysaccharide. Shifts were measured at 300 K with acetone as internal reference ($\delta = 2.215$ ppm). n.d. = not determined

3)- α/β Galp				β -D-GlcUAp-(1-			
proton	δ	H,H	$J_{H,H}$	proton	δ	H,H	$J_{H,H}$
	ppm		Hz		ppm		Hz
H-1 α/β	5.275/4.624	1,2	1.46/8.04	H-1	4.682/4.669	1,2	7.86/7.86
H-2 α/β	3.967/3.637	2,3	1.28/8.04	H-2	3.416/3.420	2,3	1.46/1.46
H-3 α/β	4.245/3.777	3,4	1.11/3.20	H-3	n.d.		
H-4 α/β	3.546/4.183	4,5	9.87/0.73	H-4	n.d.		

Periodate oxidation

The polysaccharide was oxidized with sodium metaperiodate and then reduced with sodium borohydride. As shown in Table 1, only galactose remains intact, confirming the methylation results.



Partial acid hydrolysis

Partial acid hydrolysis using 2 M trifluoroacetic acid (100°C, 2.5 h), followed by purification of the resulting product by Sephadex G-10 gel filtration yielded a disaccharide. The hydrolysis of this disaccharide by 4 M trifluoroacetic acid at 100°C followed by ion-exclusion chromatography of free monosaccharides allowed us to identify galactose and glucuronic acid. The disaccharide was reduced with sodium borodeuteride and then methylated according to Paz-Parente et al. [6]. GLC/MS analysis of the permethylated compound gave a mass spectrum fragmentation pattern (Fig. 3) indicating that the disaccharide is GlcUA-(1-3)-Gal. In order to complete the structure, and especially to establish the anomeric configuration, the disaccharide was analysed by ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy. Assignments of the proton resonances of the aldobiouronic acid were made by correlated spectroscopy (COSY). The ¹H chemical shifts with coupling constants and the ¹³C chemical shifts are given in Tables 3 and 4, respectively. Four major anomeric proton resonances were found corresponding to a Gal residue in the reducing position with α and β configuration and to a β-GlcUA residue linked to α-Gal and β-Gal respectively. The anomeric configuration of the GlcUA residue can also be deduced by the ¹³C-NMR data (Table 4 and Fig. 4). Overall, these findings indicated that the aldobiouronic acid consists of a β-anomeric glucuronic acid

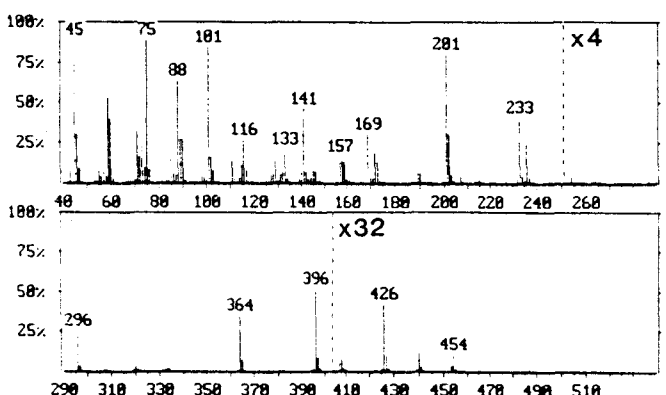


Fig. 3. Electron impact mass spectrum of reduced (*NaBD₄*) methylated disaccharide obtained by partial acid hydrolysis of native polysaccharide

Table 4. ¹³C chemical shifts of the aldobiouronic acid
Values were measured at 300 K with acetone as internal reference (δ = 31.55 ppm)

3)-α/βGalp		β-D-GlcUAp-(1-	
Carbon	δ	Carbon	δ
	ppm		ppm
C-1 α/β	92.94/96.93	C-1	104.39
C-2 α/β	68.13/71.68	C-2	73.93
C-3 α/β	80.52/83.54	C-3	72.51
C-4 α/β	69.56/69.00	C-4	76.84
C-5 α/β	71.01/75.64	C-5	76.10
C-6 α/β	61.95/61.77	C-6	176.49/175.71

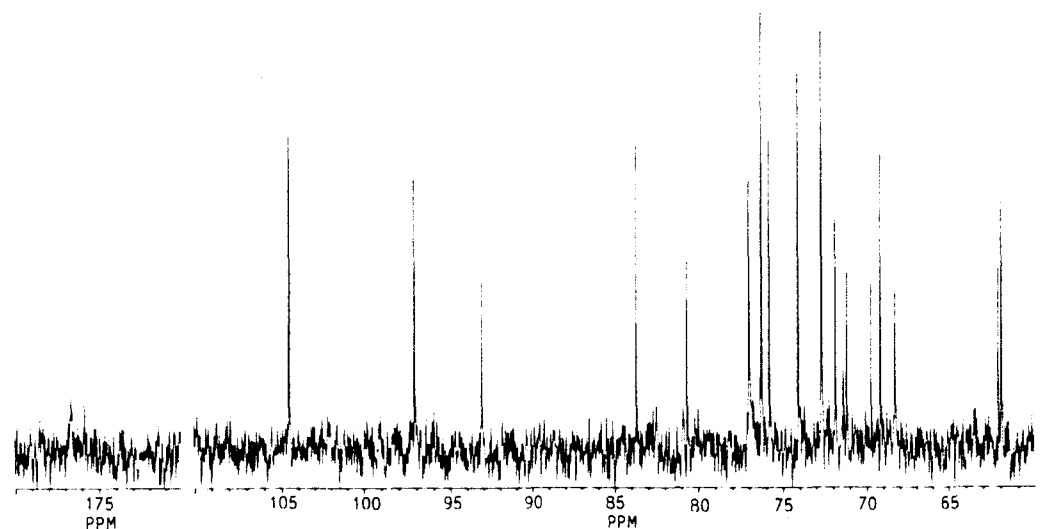
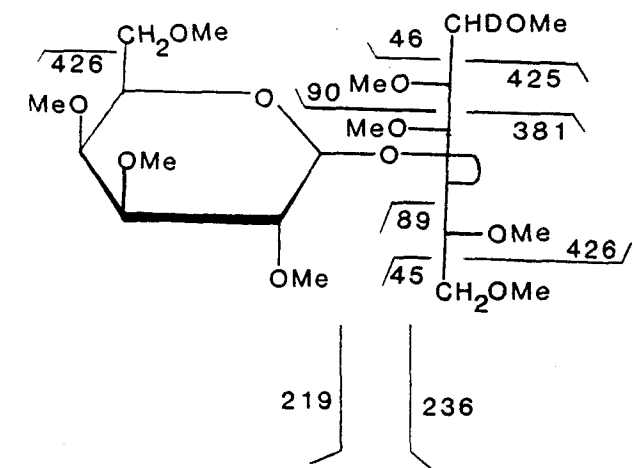


Fig. 4. ¹³C-NMR spectrum of the disaccharide obtained by partial acid hydrolysis of native polysaccharide



$$J_1: 236 + 60 = 296$$

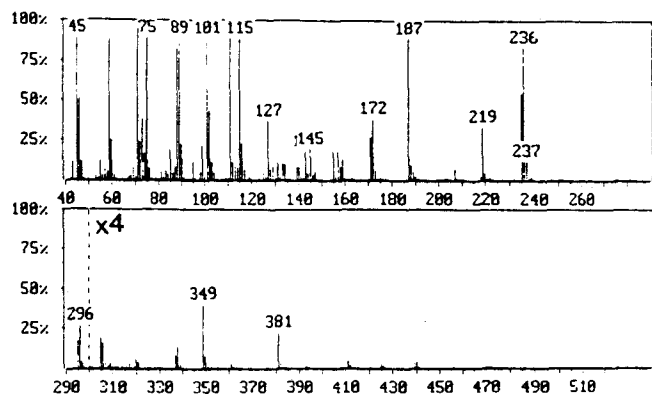


Fig. 5. Electron impact mass spectrum of permethylated oligosaccharide alditol obtained by permethylation of resulting oligosaccharide from lithium degradation of native polysaccharide

linked to a β - and α -galactose residue. From the proton and carbon spectra, it is known that the β -glucuronic acid residue is linked to position 3 of the galactose residue according to the downfield shift of H-3 and H-4 of galactose and also the two C-3 of the same residue.

Uronic acid degradation

The methylated polysaccharide was subjected to base degradation [10]. After partial hydrolysis and ethylation (Table 2), the resulting product contained 2,3,6-tri-*O*-methyl-mannose, 2,3,6-tri-*O*-methyl-glucose and 3-ethyl-2,6-di-*O*-methyl-galactose in the molar ratio 0.1:2.0:0.8. The results showed that β -elimination caused the loss of 2,3,6-tri-*O*-methyl-mannose and 2,3-di-*O*-methyl-4,6-*O*-(1-carboxymethyl ester-ethylidene)-galactose and that a Gal-Man disaccharide is linked to glucuronic acid in C-4 position. The identification of 3-*O*-ethyl-2,6-di-*O*-methyl-galactose confirms that the glucuronic acid is linked to galactose in the C-3 position. The β -elimination reaction further indicated that the glucuronic acid formed part of the branch constituted by the Gal-Man-GlcUA trisaccharide.

These results are confirmed by the analysis of carbohydrate compounds obtained after lithium degradation [11]. The native polysaccharide treated with lithium in ethylenediamine gave two fractions: the supernatant oligosaccharide and the lithium-resistant polysaccharide. The supernatant oligosaccharide was chromatographed by gel filtration on TSK HW40(S). One oligosaccharide, containing galactose and mannitol in molar ratio 0.8:1.0, was isolated. The permethylated oligosaccharide alditol was analyzed by GLC/MS. The mass spectrum fragmentation pattern (Fig. 5) is consistent with the sequence Gal-(1-4)-mannitol. These results are confirmed by the analysis of monosaccharide methyl ethers (2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galactose and 1,2,3,5,6-penta-*O*-methyl-mannitol in molar ratio 1:1.1). The $^1\text{H-NMR}$ data of this disaccharide alditol exhibited one anomeric resonance at δ 4.481 with a coupling constant $J_{\text{H1}, \text{H2}}$ at 7.68 Hz, indicating the β configuration of the linkage between galactose and mannitol. From these results we concluded that the lithium-eliminated disaccharide was β -Gal-(1-4)-mannitol. The lithium-resistant polysaccharide in the ethanol precipitate contains galactose, glucose and mannose in the molar ratio 1:2.0:0.35 (Table 1). The presence of 0.35 residue mannose allows us to estimate the yield of lithium degradation to approximately 65%.

The methylation data of this lithium-resistant polysaccharide (Table 2) confirm the β -elimination results showing that the lateral chain in the polysaccharide was linked to galactose in C-3 (identification of 2,3,6-tri-*O*-methyl-galactose) and that the main chain was constituted by the repeating unit: $-(4)\text{Glc-(1-4)-Gal-(1-4)-Glc-(1-4)}$. The presence of permethylgalactose confirms that lithium in ethylenediamine removes the pyruvate group from the galactose residue in the non-reducing terminal position [11].

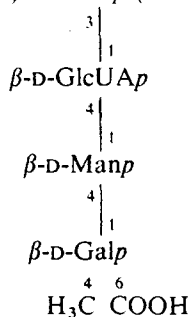
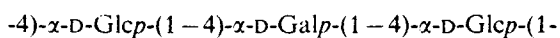
Chromic oxidation

To determine the anomeric configuration of the various sugar residues, the polysaccharide was oxidized with chromium oxide during 1 h and 2 h. This treatment degraded all mannose and glucuronic acid, indicating the β -configuration, and half of the galactosyl residues, indicating that half these residues have the β -configuration and half the α -configuration. These results are in accordance with the $^{13}\text{C-NMR}$ data.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectral analysis

The $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of the native polysaccharide (Fig. 1) revealed in the anomeric region two equally intense resonances at δ 102.63 and δ 105.54 which correspond to two residues of α -Glc and one residue of α -Gal for the first one, and to β -Man, β -Gal and β -GlcUA for the second one. The 39 ^{13}C resonances of the native polysaccharide suggest that the repeating unit is very regular and seems to consist of two subunits: the backbone α -chain and lateral β -chain. The presence of pyruvic acid in the lateral branch is confirmed by the three resonances at δ 27.98 (methyl group), δ 103.64 (C-2) and δ 178.24 (carboxyl group). On the basis of these different intensities of the ^{13}C resonance, the two small ones at δ 67.62 and δ 73.55 can be attributed to the C-4 and C-3 of the branching α -galactose residue.

From the results discussed above, it was concluded that the *Bacillus circulans* polysaccharide consists of hexasaccharide repeating units having the following structure:



This investigation was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche N 111, Directeur: Prof. J. Montreuil)*, by the *Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois* and by a grant (to T.F.) from Roquette. The authors thank Yves Leroy and Guy Ricart for frequent help in MS analysis and the *Conseil régional du Nord/Pas de Calais*, the *Centre National de la Recherche et de la Technologie*, the *Ministère de l'Éducation* and the *Association pour la Recherche contre le Cancer* for their contribution in the acquisition of the 400-MHz NMR and Kratos concept II HH apparatus.

REFERENCES

1. Kitahata, S., Okada, S. (1982) *J. Jap. Soc. Starch Sci.* 29, 13-18.

2. Sata, H., Taniguchi, H. & Maruyama, Y. (1987) *Agric. Biol. Chem.* 51, 1521-1527.
 3. Dische, Z. (1962) *Methods Carbohydr. Chem.* 1, 477-514.
 4. Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G. & Strecker, G. (1986) in *Carbohydrate analysis, a practical approach* (Chaplin, M. F. & Kennedy, J. F., eds) pp. 143-204 IRL Press, Oxford.
 5. Gerwig, G. J., Kamerling, J. P. & Vliegthart, J. F. G. (1978) *Carbohydr. Res.* 62, 349-357.
 6. Paz Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B. & Ricart, G. (1985) *Carbohydr. Res.* 141, 41-47.
 7. Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 489-502.
 8. Gray, G. R. (1987) *Methods Enzymol.* 138, 26-38.
 9. Goldstein, J. J., Hay, G. W., Lewis, B. A. & Smith, F. (1965) *Methods Carbohydr. Chem.* 5, 361-370.
 10. Lindberg, B., Lönngren, J. & Thompson, J. L. (1973) *Carbohydr. Res.* 21, 351-357.
 11. Lau, J. M., McNeil, M., Darvil, A. G. & Albersheim, P. (1987) *Carbohydr. Res.* 168, 219-243.
 12. Hoffman, J., Lindberg, B. & Svensson, S. (1972) *Acta Chem. Scand.* 26, 661-666.
 13. Ernst, R. R. (1966) *Adv. Magn. Res.* 2, 1-135.
 14. Dudman, W. F. & Lacey, M. J. (1986) *Carbohydr. Res.* 145, 175-191.
 15. Langenhove, A. V. & Reinhold, V. N. (1985) *Carbohydr. Res.* 143, 1-20.
 16. Vodonik, J. A. & Gray, G. R. (1988) *Carbohydr. Res.* 175, 93-102.

Conclusions

Cette étude nous a permis d'élucider la structure d'un nouveau polysaccharide bactérien.

Ce travail a nécessité le développement au laboratoire de méthodes de rupture sélective au niveau des acides uroniques, en particulier la dégradation au lithium.

D'autre part, la stabilité du groupement pyruvyle lié en C-4 et C-6 du galactose de la chaîne latérale vis-à-vis des réactifs de méthanolyse et du clivage réductif nous a conduit à étudier le comportement de ce substituant lié sur d'autres monosaccharides et présent dans différents polymères glucidiques. Cette étude fait l'objet du deuxième chapitre.

II - ETUDE DU COMPORTEMENT DE L'ACIDE PYRUVIQUE PRESENT DANS CERTAINS POLYSACCHARIDES LORS DE LA METHANOLYSE ET LORS DU CLIVAGE REDUCTIF.

Au cours de l'étude de l'exopolysaccharide du Bacillus circulans, nous avons identifié, après perméthylation du polymère et méthanolyse ou clivage réductif, le galactose terminal substitué en C-4 et C-6 par un groupement pyruvate. Cette observation nous a conduit à étudier le comportement de ce substituant pyruvyle en liaison acétalique sur d'autres monosaccharides vis-à-vis de ces mêmes techniques d'analyses.

La méthanolyse est une technique classique de coupure des liaisons osidiques très utilisée pour l'étude de glycannes de glycoprotéines ou de glycolipides notamment des glycannes sialylés (Zanetta et al., 1972; Kamerling et al., 1975). La rupture réductive est une technique moins connue et plus particulièrement utilisée dans l'étude des polysaccharides.

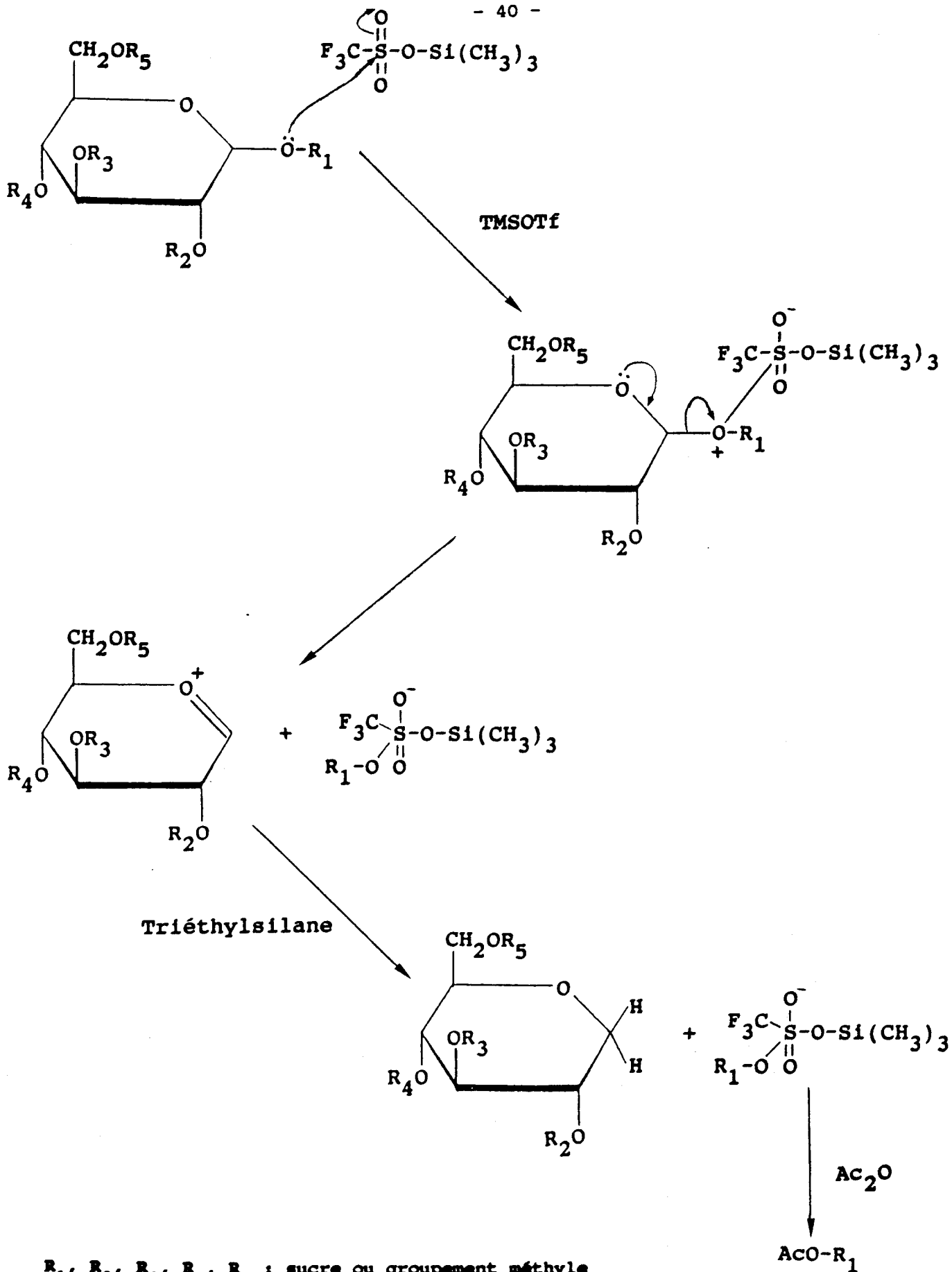
La rupture réductive fut décrite pour l'étude de structures glucidiques de type α -cyclodextrine perméthylée par Rolf et Gray en 1982. Cette technique réalise le clivage de la liaison osidique en réduisant les monosaccharides sous forme d'anhydrosucre. Le principe de cette réaction (Fig. 11) est le même que tout autre type de solvolysse : il y a attaque nucléophile du doublet électronique de l'oxygène de la liaison osidique sur un acide de Lewis. La rupture de la liaison fait intervenir l'oxygène du cycle. Ensuite un hydrure porté par le triéthylsilane permet la formation de l'anhydrosucre.

L'acide de Lewis utilisé comme catalyseur peut être le boron trifluoride (BF_3) ou le triméthylsilyl trifluorométhane sulfonate (TMSOTf) ou l'association de ces deux réactifs.

Cette technique présente les avantages suivants :

- elle permet de conserver la configuration pyrannique ou furannique des monosaccharides (Rolf et Gray, 1982; Gray, 1987; Juan et Gray, 1987; Heims et al., 1989).

- elle réalise la rupture des liaisons uronosidyles stables à l'hydrolyse et à la méthanolyse, permettant l'identification des éthers méthyliques des acides uroniques (Vodonik et Gray, 1988a, 1988b).



$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4, \text{R}_5$: sucre ou groupement méthyle

Figure 11 : Principe de la coupure réductive en utilisant le TMSOTf comme catalyseur (Rolf et Gray, 1982).

- elle effectue la libération de monosaccharides instables en milieu acide comme les cétooses, sans les dégrader (Rolf et Gray, 1982; Simms et al., 1990).

Nous avons choisi le TMSOTf comme catalyseur car il agit indépendamment de l'anomérisation de la liaison osidique (Rolf et al., 1983). Ainsi l'utilisation de cette technique nous a permis de caractériser la configuration pyranique du galactose du point de branchement de l'unité de répétition de l'exopolysaccharide de Bacillus circulans.

L'étude de la stabilité des groupements pyruvyle vis-à-vis de la méthanolyse et du clivage réductif est décrite dans la publication ci-après. Elle a été effectuée sur différents exopolysaccharides bactériens qui nous ont été fournis par le Prof. G.G.S. Dutton (Vancouver, Canada).

Analysis of pyruvic acid acetal containing polysaccharides by methanolysis and reductive cleavage methods.

Thierry FONTAINE¹, Franck TALMONT¹, Guy G.S. DUTTON² and Bernard FOURNET^{1*}

1- Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche n°111 du CNRS, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex France.

2- Department of Chemistry University of British Columbia, 2036 Main Mall, Vancouver British Columbia, V6T 1Y6 Canada.

* To whom correspondance should be addressed

Abbreviations used : glc, gas-liquid-chromatography; ms, mass spectrometry.

The mass spectra of permethylated methyl 4,6-O-(1-carbomethoxyethylidene)-D-hexopyranosides and 1,5-anhydro-D-hexitol of glucose, galactose and mannose and permethylated methyl 5,6-O-(1-carbomethoxyethylidene)-D-galactofuranoside and 1,4-anhydro-D-galactitol have been determined. The stability of each compound toward methanolysis and reductive cleavage is discussed. These techniques permit the identification of the acetalic linkages of pyruvic acid present in polysaccharides.

Many bacterial polysaccharides possess a pyruvyl group as a substituent in their repeating units. When present in polysaccharides, pyruvate acetals are determinant groups in regards to tridimensional conformation, rheological properties (1) and immunological specificity. So, their removal leads to weaker precipitin reactions in homologous antisera (2-4). In antigenic polysaccharides, these pyruvate acetals have three structural features that affect immunological specificity: the configuration of the monosaccharide residue that bears the acetal, the positions of the two hydroxyl groups that are bridged by the acetal and the configuration of the methyl- and carboxyl- groups at the asymmetric acetal carbon atom (5).

Pyruvyl groups in polysaccharides can be easily identified and quantified by colorimetric (6), enzymatic (7), chromatographic (8, 9), and H^1 -n.m.r methods (10). The size of the acetal ring and configuration of the carbon atom can be established by ^{13}C -n.m.r techniques (11-14). Comparison of the methylation analysis made on native and depyruvylated polysaccharides permit the localization of the acetalic linkages. Except for 3,4-O-(1-carboxyethylidene)-L-rhamnose, which was particularly labile, the pyruvic acid substituents were largely retained during

methanolysis and the trimethylsilyl derivatives of the products could be identified by glc/ms (15). Recently, by studying the stability of methyl 4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl- α -D-glucopyranoside under reductive cleavage conditions ($\text{Me}_3\text{SiOMs-BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ or $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ or $\text{Me}_3\text{SiSO}_2\text{CF}_3$), Zeller and Gray (16) proposed that the identity of the substituted monomer and the positions of substitution by the acetal can be determined by sequential permethylation, ester reduction and reductive cleavage. In the same way, Fontaine et al. (17) identified the 4,6-O-(1-carboxyethylidene)-D-galactopyranose present in the exopolysaccharide from Bacillus circulans after permethylation and methanolysis and after permethylation and reductive cleavage using $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$.

In order to complete these studies, we describe the results concerning the stability of acetal group and the glc/ms characterization of pyruvic acid acetal (1-carboxyethylidene) substituents present in six polysaccharides after permethylation/methanolysis and permethylation/reductive cleavage.

MATERIALS AND METHODS

Polysaccharides

Polysaccharides from Klebsiella pneumoniae serotype K3 (18), K12 (13), K21 (19, 20), K32 (21, 22) and K36 (23) were those previously studied. The exopolysaccharide from Bacillus circulans was prepared according to Fontaine et al. (17). The structures of repeating units of these exopolysaccharides are given in Table 1.

Permethylation

In the first step, the polysaccharides (5 mg) dissolved in formamide (2 ml) were peracetylated by a mixture of pyridine/acetic anhydride (1:1, v/v, 2 ml) at room temperature during 24h. After dialysis and freeze drying the peracetylated polysaccharides were methylated with dimethylsulfoxide/lithium methylsulfinylcarbanion/methyl iodide according to the procedure described by Paz Parente et al. (24) with a modification concerning the reaction time of lithium sulfinylcarbanion on the peracetylated polysaccharide (overnight). The permethylated products were purified by gel filtration on a Sephadex LH20 column using chloroform/methanol (1:1, v/v) as eluent.

Methanolysis and acetylation

Samples (0.5 mg) of permethylated polysaccharides were methanolysed with 0.5M hydrogen chloride in anhydrous methanol (1 ml) for 24h at 80°C in screw-capped tubes (Sovirel, France) closed with teflon-lined caps. After evaporation to dryness in a stream of nitrogen, the methyl glycoside methyl ethers were per-O-acetylated using acetic anhydride in pyridine (4:1, v/v, 0.25 ml) overnight at room temperature. After evaporation in the presence of toluene in a stream of nitrogen, the partially methylated and acetylated methyl glycosides and methylated methyl (1-carbomethoxy-ethylidene) glycosides were analysed by glc-ms according to Fournet et al. (25).

Reductive cleavage and acetylation (26)

A vial (20 ml) was treated with 10% Me₂SiCl₂ in toluene during 24h

and, after washing with anhydrous methanol, was dried at 150°C, 2h and cooled 24h in a desiccator. A stock solution of Et₃SiH and TMSOTf in CH₂Cl₂ was prepared by sequential addition, to a vial filled with argon, of CaH₂ (0.2 g), CH₂Cl₂ (9.0 ml), Et₂SiH (0.8 ml), and TMSOTf (1.0 ml). Vials were closed with teflon lined caps and kept in an argon saturated desiccator during one hour. Vials were stored under argon at 4°C.

Freeze dried permethylated polysaccharide (3 mg) in a screw-capped tube (Sovirel, France) with a small stirring bar was treated under argon by 0.3 ml of reagent. The tube was closed and the mixture was stirred during 20h at room temperature and 13 µl of Ac₂O was added. Stirring was continued for a further 20h at room temperature. The reductive cleavage was stopped by addition of saturated aqueous NaHCO₃ (0.5 ml) and the biphasic mixture was stirred for 1h. The aqueous phase was removed and the organic phase was washed by stirring with 0.5 ml of saturated aqueous NaHCO₃ during 30 min. After separation of the aqueous phase, the partially methylated and acetylated anhydrohexitols were analysed by glc-ms (27-29).

Gas-liquid-chromatography

G.l.c. was performed on a Spectra Physics SP7100 instrument (San Jose, CA, U.S.A.) with a flame ionisation detector using capillary columns (25 m x 0.2 mm id) filled with DB-1 and Carbowax 20M; helium pressure 0.4 bar; column temperature : DB-1, 110 - 240°C at 2°C per min followed by 180 - 240°C at 4°C per min; Carbowax 20M, 120 - 210°C at 3°C per min. The retention times of the methyl glycoside methyl ethers and methylated anhydro-sugars were calculated relative to the C17:0 fatty acid methyl ester.

Mass spectrometry

Mass spectra were recorded using a Nermag R10-10S mass spectrometer (Rueil-Malmaison, France), interfaced with a Delsi gas-chromatograph. Electron ionisation (e.i.) spectra were recorded using an ionisation energy of 70 eV and an ionisation current of 0.2 mA. Positive ion chemical ionisation (c.i.) spectra were obtained at 70 eV (ionisation energy) using ammonia as reagent gas.

RESULTS AND DISCUSSION.

Gas-liquid chromatography and molar ratio of methylated methyl glycosides and anhydro-sugars.

The results of the separation of partially methylated and acetylated methyl glycosides and anhydro-sugars obtained by methanolysis and reductive cleavage from several polysaccharides are given in Table 2. It can be observed that all pyruvic acid substituted methyl ether methyl glycosides and anhydro-hexitols stable in conditions of methanolysis and reductive cleavage, are separated on silicone DB-1 and carbowax 20M capillary columns. Two pyruvic acid substituted methyl ether methyl glycosides : methyl 4,6-O-(carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactopyranoside (K21, B. circulans) and methyl 5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactofuranoside (K12) are quantitatively recovered after methanolysis of the permethylated polysaccharides. However, the methyl 4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene) 2,3-di-O-methyl from mannose (K3) and glucose (K36) were partially degraded (50% and 80% respectively). As reported by Dudman and Lacey (15) for the 3,4-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-L-rhamnose, no carboxy-ethylidene derivative was identified but a peracetylated methyl

rhamnoside was detected (K32) indicating that the acetalic linkages in the 3,4 positions are completely cleaved. Comparison of the stability of these pyruvic acid substituted monosaccharide methyl ethers obtained after methanolysis and reductive cleavage shows that the latter technique is more drastic for the acetalic bonds. The 1,5-anhydro-4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactitol (B. circulans) is only quantitatively recovered when the pyruvylated 4,6-galactose is linked β in the polysaccharide. When the same substituted monosaccharide is present in the α -configuration (K21), 80% of this derivative is degraded during the reductive cleavage procedure. The 2,3-di-O-methyl-5,6-pyruvylated-galactitol and the 2,3-di-O-methyl-4,6-pyruvylated mannitol and glucitol are partially degraded (60%, 90% and 60% respectively). As observed by methanolysis, the 3,4-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-L-rhamnitol can not be identified by reductive cleavage. Recently, Zeller and Gray (30) observe no degradation of 1,5-anhydro-4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-mannitol by the treatment of permethylated Xanthan during 24h in the reductive cleavage conditions. So, this result in addition with our results allow to postulate that the stability of the pyruvic acid acetal anhydroalditol depends of the nature, of the anomeric configuration of pyruvylated monosaccharide and of the type of pyruvic acid acetal linkage.

The identification of four isomers for the methyl 5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactoside obtained by methanolysis of permethylated K12 polysaccharide and two isomers for the 1,4-anhydro-5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactitol obtained by reductive cleavage of permethylated K12 polysaccharide suggest the presence of two enantiomers (R and S) of the acetal carbon atom of the pyruvic acid in this polysaccharide.

Mass spectrometry of pyruvic acid substituted methylated methyl glycosides and anhydro-hexitols.

Figure 1 gives the mass spectra in E.I. mode of the methyl 4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactoside, D-glucoside, and D-mannoside, and of methyl 5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactoside. According to the scheme proposed by Zolotarev et al. (31) the formation of some ions can be interpreted. All spectra give fragment at m/z 43 ($\text{CH}_3\text{-C=O}$) from acetal and methyl carbons of pyruvic acid, and m/z 45 from F1 ion (m/z 101). J1 fragment (m/z 75), H1 fragment (m/z 88) and F1 fragment (m/z 101) are also present in all spectra indicating the presence of methyl group in positions C_1 , C_2 and C_3 . However, the comparison of the spectra of 4,6- and 5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene) monosaccharide methyl ethers (Fig.1) shows the increase in the intensity of the F1 ion (m/z 101) and the decrease of fragment (m/z 88) in the case of pyruvylated furanosidic monosaccharide methyl ethers. The fragment at m/z 127 is only present in mass spectrum of methyl α and β 4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactoside. All compounds present the fragment at m/z 247 ($M - 59$) corresponding to the loss of the carboxymethyl group from pyruvic acid. By loss of methanol this latter ion give fragment at m/z 215 ($247 - 32$) and m/z 183 ($247 - 2 \times 32$). Some fragments with a low intensity can be identify : the D1 ion (m/z 220), the B1 ion (m/z 161), and from the A serie, the ion A2 at m/z 141. The equality in the intensity of the ions at m/z 155 and 247 seems characteristic of the methyl α and β 5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactosides. The figure 2 illustrates the proposed structure of the main ions from methyl 4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-glucopyranoside.

All compounds give the same C.I. spectra obtained with ammonia as

ionising gas with pseudomolecular ions at m/z 324 ($M + NH_4$)⁺, 307 ($M + H$)⁺, and fragments at m/z 292 ($M - MeOH + NH_4$)⁺, 275 (A1 ion) and 247 ($M - 59$) (Fig. 3).

The figure 4 gives the mass spectrum in E.I. mode of anhydro-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-hexitol. All compounds exhibit a fragment at m/z 217 corresponding to the loss of the carboxymethyl group from pyruvic acid. The E.I. mass spectra of 4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactitol, -glucitol, and -mannitol are similar to the mass spectra described by Zeller et al. (16). The 1,4-anhydro-5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactitol give a particular spectrum with ions at m/z 71, 101 and 157 with approximatively the same intensity with the ion at m/z 217.

As methyl glycoside forms, the C.I. spectra for all anhydrohexitol compounds are identical with the pseudomolecular ions at m/z 294 ($M + NH_4$)⁺, m/z 277 ($M + H$)⁺ and fragments at m/z 217 ($m - 59$) (Fig. 3).

This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche N°111, Directeur : Prof. A. Verbert), by the Université des Sciences et Technique de Lille Flandres-Artois. The authors thank Yves Leroy and Philippe Timmerman for frequent help.

REFERENCES

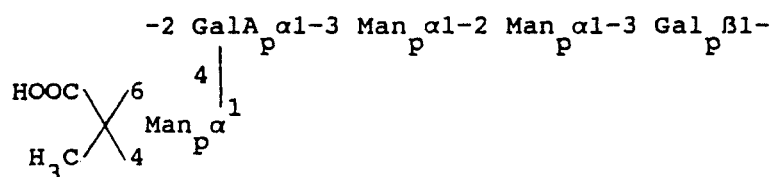
1. Cheetham, N.W.H. and Norma, N.M.N. (1989) Carbohydr. Polym., **10**, 55-60.
2. Dudman, W.F. and Heildelberger, M. (1969) Sciences, **164**, 954-955.

3. Heidelberger, M., Dudman, W.F. and Nimmich, W. (1970) J. Immunol., **104**, 1321-1328.
4. Bennett, L.G. and Bishop, C.T. (1977) Immunochemistry, **14**, 693-696.
5. Bishop, C.T. and Jennings, H.J. (1982) in The Polysaccharides (Aspinall, G.O., ed.), Vol. 1, 291-330.
6. Soneker, J.H. and Orentas, D.G. (1962) Nature, **194**, 478-479.
7. Duckworth, M. and Yaphe, W. (1970) Chem. Ind., (London) 747-748.
8. Cardon, P. (1986) Contribution à l'étude structurale d'un exopolysaccharide produit par une nouvelle souche de bactérie du sol. Thèse, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, pp. 128.
9. Edelkraut, F. and Brockmann, U. (1990) Chromatographia, **30**, 432-435.
10. Bebault, G.M., Choy, Y.M., Dutton, G.G.S., Funnell, N.A., Stephen, A.M. and Yang, M.T. (1973) J. Bacteriol., **113**, 1345-1347.
11. Garegg, P.J., Jansson, P.-E., Lindberg, B., Lindh, F., Lönngrén, J., Kyarnström, I. and Nimmich, W. (1980) Carbohydr. Res., **78**, 127-132.
12. Gorin, P.A.J. Mazurek, M., Duarte, H.S., Iacomini, M. and Duarte, J.H. (1982) Carbohydr. Res., **100**, 1-15.
13. Beurret, M., Joseleau, J.-P., Vignon, M., Dutton, G.G.S. and Savage, A.V. (1989) Carbohydr. Res., **189**, 247-268.
14. Jones, C., (1990) Carbohydr. Res., **198**, 353-357.
15. Dudman, W.F. and Lacey, M.J. (1986) Carbohydr. Res., **145**, 175-191.
16. Zeller, S.G. and Gray, G.R. (1990) Carbohydr. Res., **198**, 285-303.
17. Fontaine, T., Wieruszkeski, J.-M., Talmont, F., Saniez, M.-H., Duflot, P., Leleu, J.-B. and Fournet, B. (1991) Eur. J. Biochem., in press.
18. Dutton, G.G.S., Parolis, H., Joseleau, J.-P. and Marais, M.-F. (1986) Carbohydr. Res., **149**, 411-423.
19. Dutton, G.G.S. and Choy, Y.M. (1972) Carbohydr. Res., **21**, 169-172.

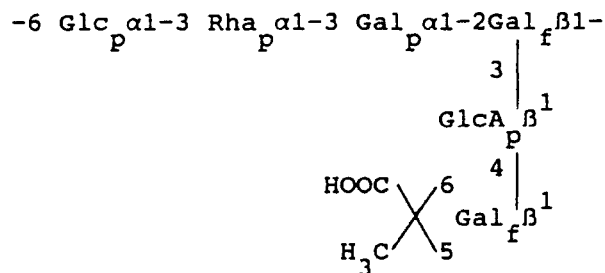
20. Choy, Y.M. and Dutton, G.G.S. (1973) Can. J. Chem., **51**, 198-207.
21. Bebault, G.M., Dutton, G.G.S., Funnell, N.A. and Mackie, K.L. (1978) Carbohydr. Res., **63**, 183-192.
22. Dutton, G.G.S., Mackie, K.L., Savage, A.V., Rieger-Hug, D. and Stirm, S. (1980) Carbohydr. Res., **84**, 161-170.
23. Dutton, G.G.S. and Mackie, K.L. (1977) Carbohydr. Res., **55**, 49-63.
24. Paz-Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B. and Ricart, G. (1985) Carbohydr. Res., **141**, 41-47.
25. Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. and Montreuil, J. (1981) Anal. Biochem., **116**, 489-502.
26. Rolf, D., Bennek, J.A. and Gray, G.R. (1985) Carbohydr. Res., **137**, 183-196.
27. Van Langenhove, A. and Reinhold, V.N. (1985) Carbohydr. Res., **143**, 1-20.
28. Vodonik, S.A. and Gray G.R. (1988) Carbohydr. Res., **172**, 255-266.
29. Rolf, D. and Gray, G.R. (1986) Carbohydr. Res., **152**, 343-349.
30. Zeller, S.G., and Gray G.R. (1991) Carbohydr. Res., **211**, 309-316.
31. Zolotarev, B.M., Ott, A.Y. and Chizhov, O.S. (1978) Advan. Mass. Spectrom., **7B**, 1371-1375.

TABLE 1 : Structure of repeating units of pyruvylated polysaccharides used in the present study.

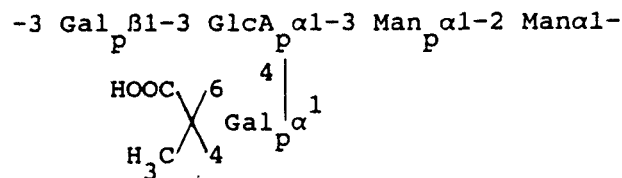
Exopolysaccharide from Klebsiella serotype K3.



Exopolysaccharide from Klebsiella serotype K12.



Exopolysaccharide from Klebsiella serotype K21.



Exopolysaccharide from Klebsiella serotype K32.

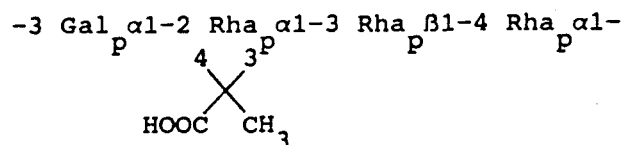


TABLE 2 : Analysis of methyl ethers obtained from Klebsiella pneumoniae K3, K12, K21, K32, K36 and from B. circulans exopolysaccharides.

Methyl ethers	Molar ratios of methyl ethers												Retention times		
	K3		K12		K21		K32		K36		B. cir.		M	RC	
	M	RC	M	RC	M	RC	M	RC	M	RC	M	RC	α	β	
2,3-Rha	-	-	-	-	-	-	1.0	1.0	-	-	-	-	0.41	0.44	0.82
2,4-Rha	-	-	0.7	1.0	-	-	0.6	0.6	0.9	0.7	-	-	0.37	0.36	0.59
3,4-Rha	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	1.1	-	-	0.31	0.33	0.47
4-Rha	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	1.2	-	-	0.49	-	0.84
PerAc-Rha	-	-	-	-	-	-	1.2	0.8	-	-	-	-	0.60	-	0.96
3,4,6-Man	1.2	1.0	-	-	1.0	1.0	-	-	-	-	-	-	0.49	-	1.01
2,4,6-Man	1.0	1.0	-	-	0.7	1.0	-	-	-	-	-	-	0.57	-	0.90
2,3,6-Man	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	1.0	0.60	-	1.23
2,3-Man	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.75	-	-
2,4,6-Gal	0.9	0.8	1.0	1.3	1.0	0.9	1.3	1.0	1.0	1.0	-	-	0.62	0.58	0.99
5,6-Gal	-	-	0.5	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.66	0.67	1.19
2,6-Gal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	1.28
2,3,4-Glc	-	-	1.0	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.60	0.55	0.93
2,3,6-Glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	2.3	0.59	0.55	0.94
2,3-Glc	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	0.74	0.70	-
2,3-GlcA	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	0.4	-	0.4	-	-	1.35
2-GlcA	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	1.55
3-GalA	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.56
(4,6-X)-2,3-Glc	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0.4	-	-	0.71	0.68	1.12
(4,6-X)-2,3-Man	0.5	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.70	-	1.37
(4,6-X)-2,3-Gal	-	-	-	-	1.1	0.2	-	-	-	-	1.1	1.2	0.79	0.78	1.47
(5,6-X)-2,3-Gal	-	-	1.1	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	0.76	0.96	1.38
(R/S)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.80	0.99	1.43
C17:0 fatty acid methyl ester (min)													45.19	34.0	

M, methanolysed and acetylated (DB-1); RC, reductively cleaved and acetylated (Carbowax 20M); (4,6-X)-2,3-Glc : M, methyl 4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-glucoside; RC, 1,5-anhydro-4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-glucitol.

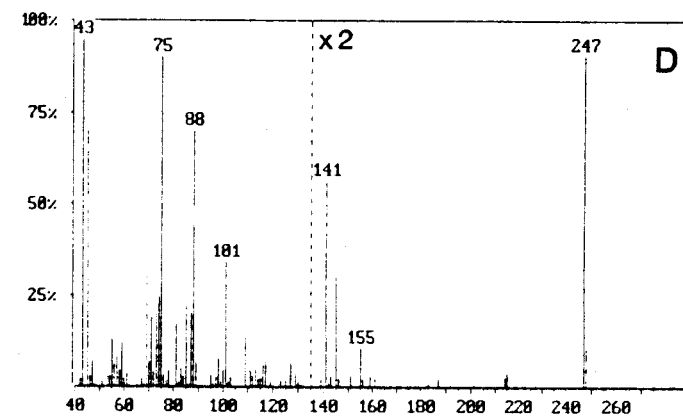
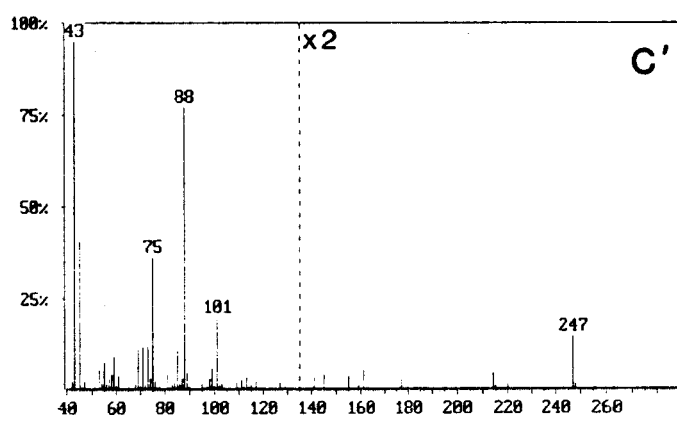
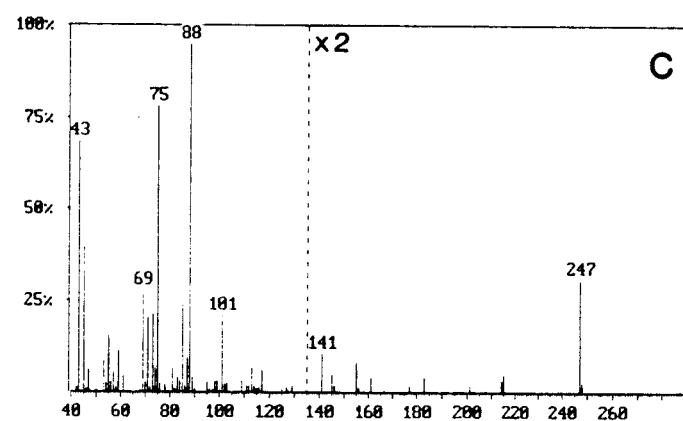
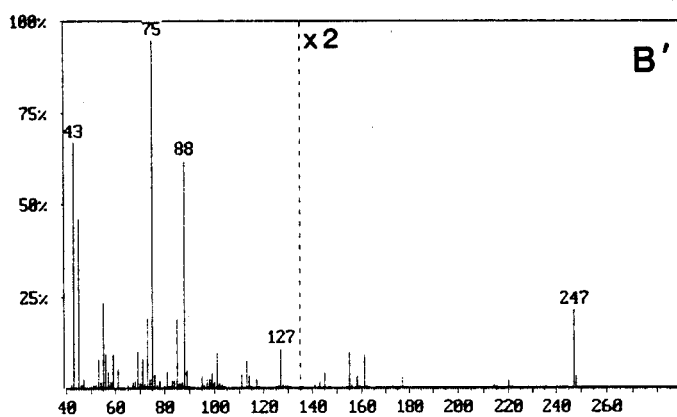
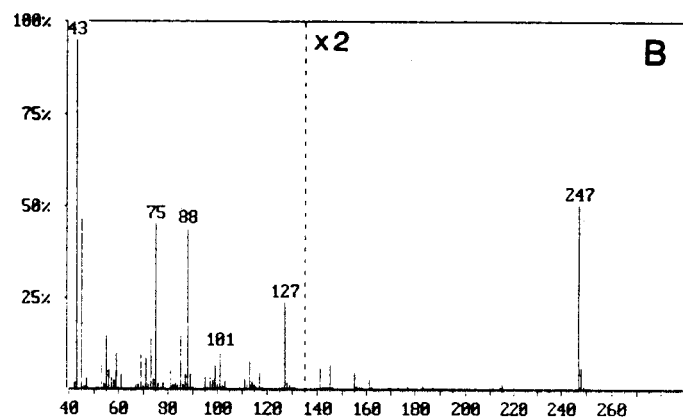
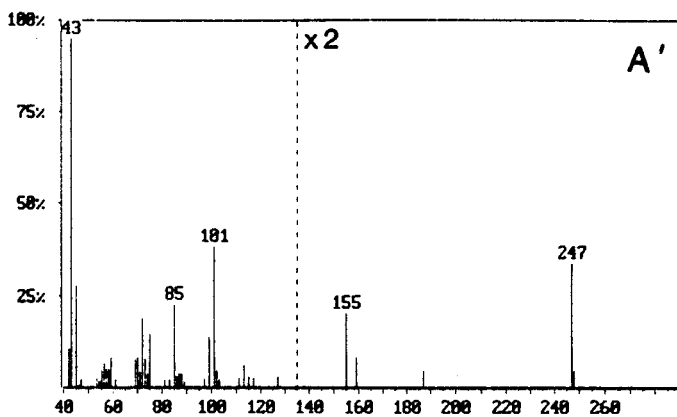
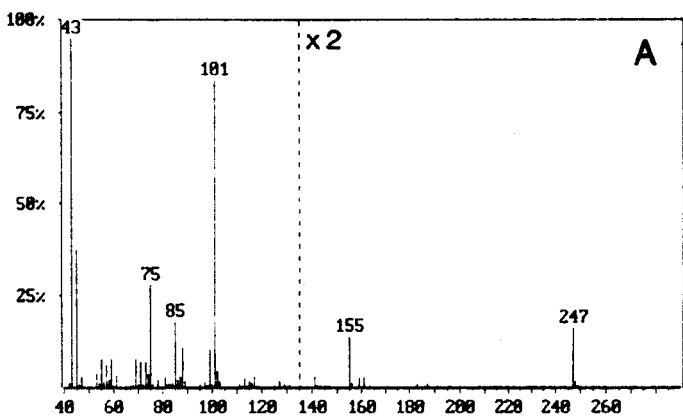
legends to figures.

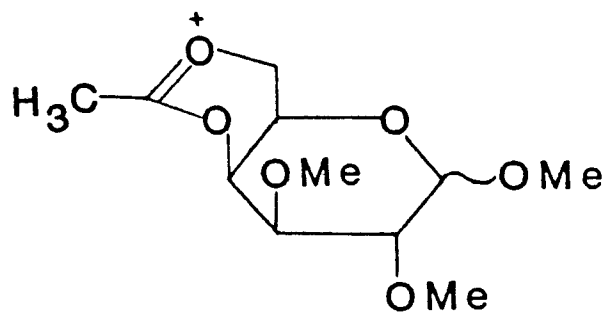
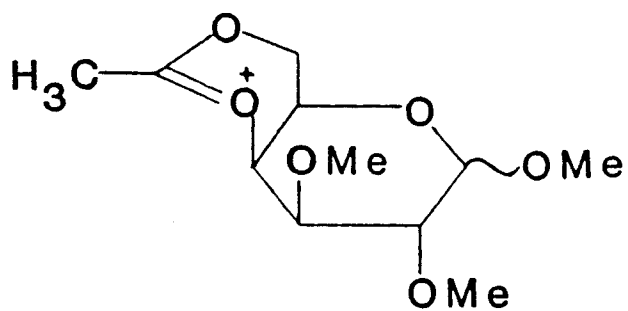
Fig. 1 : E.I. Mass spectra of the methyl 5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactoside, α -anomer (A), β -anomer (A'), methyl 4,6-O-(carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactoside, α -anomer (B), β -anomer (B'), -glucoside α -anomer (C), β -anomer (C') and -mannoside α -anomer (D).

Fig. 2 : Structure of the main ions in the mass spectra of methyl 4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene) 2,3-di-O-methyl-D-glucoside.

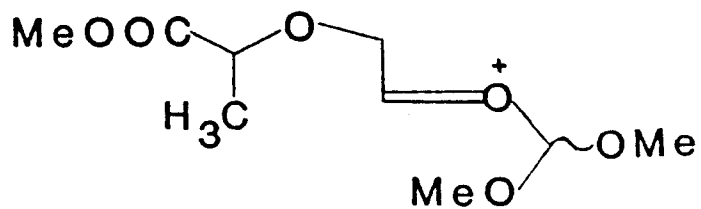
Fig. 3 : C.I. mass spectra of the methyl 4,6-O-(1-O-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactoside (A) and 1,5-anhydro-4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactitol (B).

Fig. 4 : E.I. mass spectra of the 1,4-anhydro-5,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactitol (A), 1,5-anhydro-4,6-O-(1-carbomethoxy-ethylidene)-2,3-di-O-methyl-D-galactitol (B), -glucitol (C) and -mannitol (D).

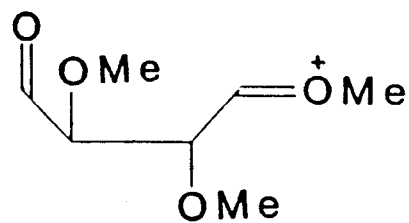




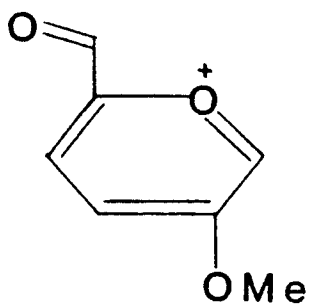
Ions m/z 247



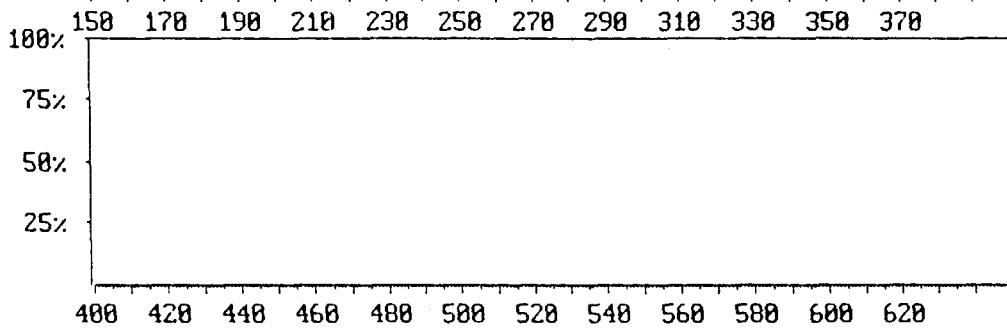
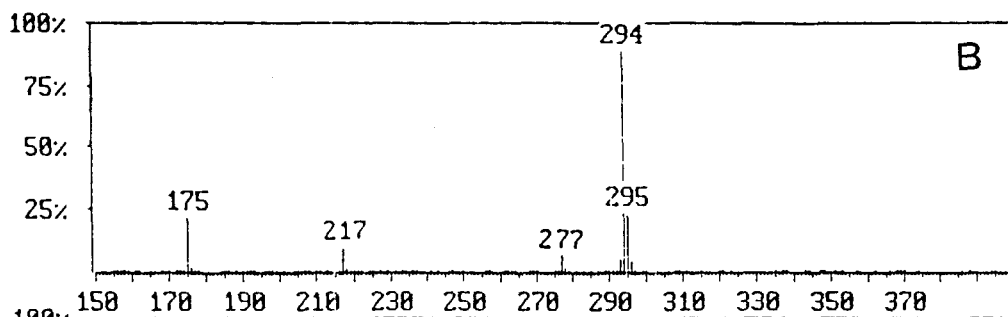
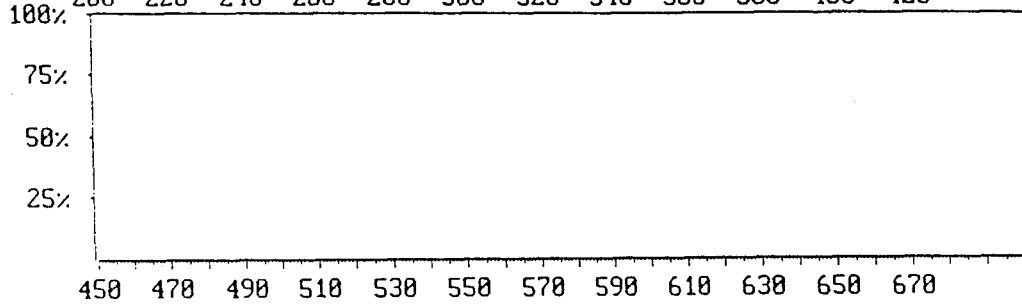
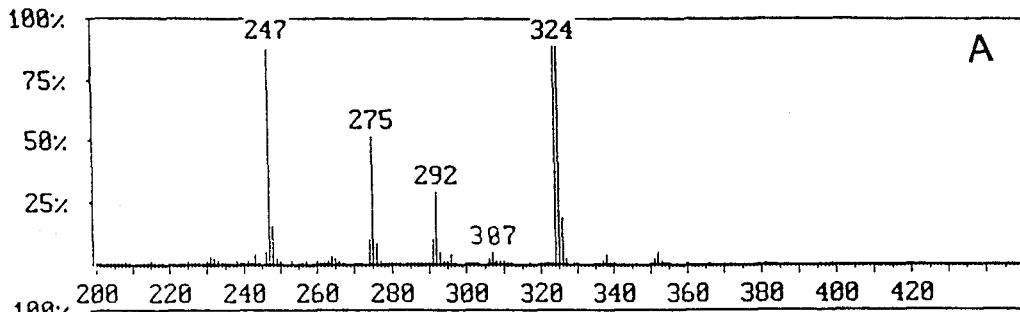
D1 ion m/z 220

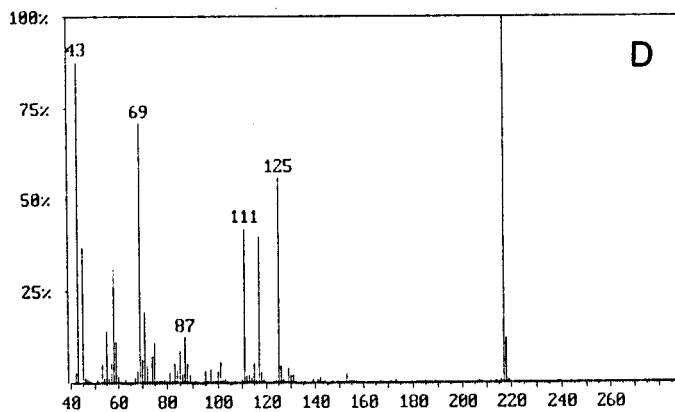
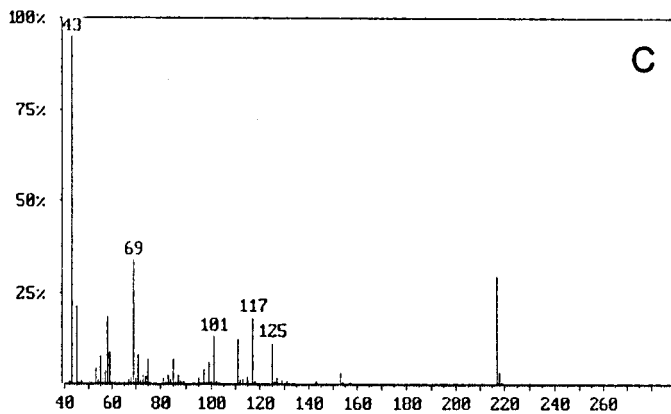
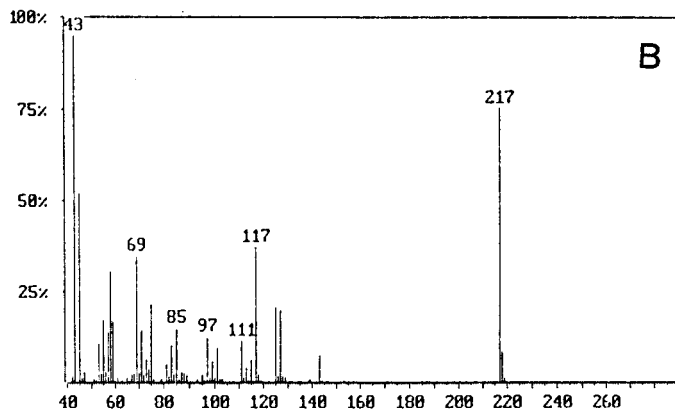
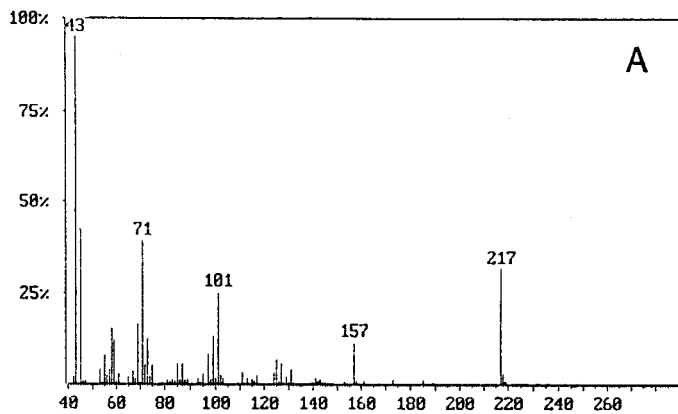


B1 ion m/z 161



A2 ion m/z 141





Conclusions

A partir d'un polysaccharide perméthylé, la méthanolyse et la coupure réductive permettent l'identification des hexoses pyruvatés en C-4 et C-6 ou en C-5 et C-6. Le temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse (CPG) et le spectre de masse en mode d'ionisation électronique caractérisent le monosaccharide substitué ainsi que les hydroxyles engagés dans la liaison acétalique. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Zeller et Gray (1990 et 1991) sur le méthyl 4,6-O-(carbométhoxy-éthylidène)-2,3-di-O-méthyl α -D-glucopyrannoside et sur le polysaccharide de Xanthomonas campestris, qui possède un résidu de mannose substitué en position 4 et 6 par un pyruvate.

Toutefois, ces méthodologies ne permettent pas l'analyse quantitative des monosaccharides pyruvatés. En effet, la stabilité de la liaison acétalique vis-à-vis des réactifs de méthanolyse et du clivage réductif dépend du monosaccharide, des hydroxyles engagés mais aussi de l'anométrie de la liaison osidique.

En outre, par ces techniques, il est possible de séparer les énantiomères R et S dus au carbone asymétrique C-2 du pyruvate. Ces configurations étaient, jusqu'à présent, analysées par R.M.N. du proton et du carbone 13 (Garegg et al., 1980; Gorin et al., 1982; Jones, 1990).

III - APPLICATION DE DIFFERENTES TECHNIQUES A L'ETUDE DE POLYSACCHARIDES CONTENANT DES ACIDES URONIQUES

A. Introduction

L'identification et le dosage des acides uroniques nécessitent parfois la réduction de la fonction carboxylique en alcool (Voir chapitre II, généralités). Les méthodes classiques au carbodiimide sont peu quantitatives et obligent à effectuer plusieurs cycles de réduction. De plus, l'addition considérable de BH_4K lors de la réduction de la lactone à $\text{pH}=7$ rend difficile le maintien du pH à la neutralité. Nous avons voulu adapter la méthode de réduction des fonctions méthyl esters par le BH_4K , utilisées récemment par Maness et al. (1990) pour quantifier les méthoxyyles présents dans les pectines. Pour ce faire, il est nécessaire d'activer la fonction carboxylique des acides uroniques sous forme de méthylester. Nous avons utilisé la méthode au diazométhane que nous avons modifiée (Fales et al., 1973).

D'autre part, la présence d'un acide glucuronique dans l'unité de répétition du polysaccharide excrété par Bacillus circulans nous a conduit à utiliser deux techniques au niveau des acides uroniques : la β -élimination sur le polymère perméthylé et la dégradation par le lithium solide dans l'éthylène diamine.

A partir de cet exopolysaccharide, nous nous proposons de comparer ces techniques à d'autres méthodologies : la décarboxylation oxydative au tétraacétate de plomb et la dégradation de Hofmann.

B. Matériels et méthodes

1. Réduction des acides uroniques

Nous avons utilisé comme polymère contenant des acides uroniques l'acide hyaluronique excrété par Streptococcus zooepidemicus (Sigma).

- Méthyl estérification de l'échantillon

Le polysaccharide est rendu acide par chromatographie d'échange de cations sur résine de Dowex 50 x 2 (200-400 mesh, forme

H⁺). Après lyophilisation, 10 mg de polymère acide sont dissous ou dispersés dans 5 ml de DMSO, puis sont placés dans le tube externe de l'appareil à diazométhane (Aldrich, Fig. 12). 0.5 ml de méthanol (Karamanos, communication personnelle) sont ajoutés et le mélange est placé sous agitation magnétique dans un bain d'eau à 15°C. 200 mg de 1-méthyl-3-nitro-1-nitroso-guanidine (Aldrich) sont déposés au fond du tube interne de l'appareil, puis 0.4 ml d'eau y sont ajoutés. Le système est fermé, et la production de diazométhane est déclenchée par l'addition, goutte à goutte, de 0.45 ml de soude 5N à l'aide d'une seringue. La réaction est maintenue pendant 2 heures à 15°C. Le polysaccharide, ainsi méthylestérifié, est dialysé à 4°C contre de l'eau, puis lyophilisé.

- Réduction des méthyl esters (Maness et al., 1990)

5 mg de polysaccharide méthylestérifié sont dissous ou dispersés dans 1 ml de tampon imidazole/HCl 1M à pH=7,0. Le mélange est placé sous agitation magnétique dans un bain de glace. Après addition de 1 à 2 gouttes d'octanol, la réduction est effectuée par 200 mg de BH₄K pendant 2 heures dans un bain de glace. L'excès de BH₄K est détruit par 0.5 ml d'acide acétique.

Après dialyse et lyophilisation, la réduction est quantifiée par le dosage des monosaccharides par CPG des méthyl glycosides triméthylsilylés obtenus par méthanolyse/N-réacétylation/triméthylsilylation, et par CPG des alditols acétates obtenus par hydrolyse/réduction/ acétylation.

2. Dégradation au lithium dans l'éthylène diamine (Lau et al., 1987a)

Préparation des réactifs

- Lithium : Le lithium solide est conditionné sous forme de fil de 3.2 mm de diamètre en immersion dans de l'huile minérale. Avant utilisation, le lithium est découpé en morceaux de 2 à 5 mm de longueur et est délipidé par des lavages à l'heptane anhydre. Le lithium ainsi préparé, est séché sous courant d'argon. Cette préparation doit être effectuée extemporanément.

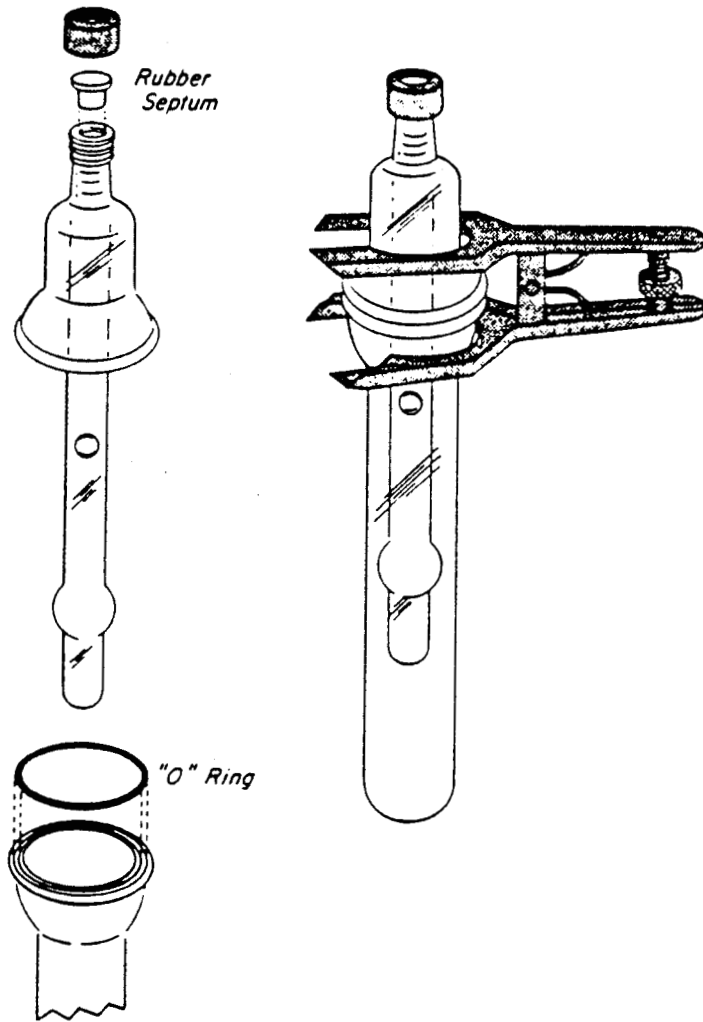


Figure 12 : Appareil de préparation du diazométhane (Aldrich).

- Ethylène diamine : L'éthylène diamine est séché en présence de tamis moléculaire 3A (Labosi) pendant 48 heures minimum.

Protocole opératoire

10 mg de polysaccharide sont lyophilisés en présence d'un barreau magnétique dans un tube de diamètre de 15 mm (Sovirel, France), puis sont placés 4 heures dans une étuve à 40°C sous vide. Le polymère anhydre est solubilisé ou dispersé dans 3 ml d'éthylène diamine pendant 2 heures au bain ultrasonique.

La dégradation est effectuée par addition d'un morceau de lithium. Le mélange est placé sous agitation magnétique, et une coloration bleue se développe. L'ajout de lithium est nécessaire pour conserver cette coloration. Ainsi, la réaction est maintenue pendant 2 heures.

Ces manipulations se font sous atmosphère d'argon et en l'absence de composé protonique qui limite la réaction en détruisant le lithium. Ainsi, en présence de traces d'eau, on observe la formation d'un anneau blanc d'hydroxyde de lithium.

Après congélation de l'échantillon, la réaction est arrêtée par addition d'eau. Les produits sont transvasés dans un ballon rond de 250 ml et l'éthylène diamine est éliminé par un grand nombre de codistillations en présence de toluène (jusqu'à l'obtention d'un résidu blanc de LiOH). Après addition d'eau, le mélange est amené à pH 4,5 à l'aide d'acide acétique. Une chromatographie d'échange de cations sur résine de Dowex 50 x 12 (15 x 1,8 cm, 200-400 mesh, forme H⁺) permet l'élimination des sels de lithium.

Analyse des produits de dégradation

Les produits de dégradation sont fractionnés selon leur taille par précipitation par 9 volumes d'éthanol. Les oligosaccharides présents dans le surnageant sont réduits par du BD₄Na, puis analysés à l'aide des techniques de CPG, de R.M.N. du proton et de spectrométrie de masse. La fraction macromoléculaire, précipitée par l'éthanol est analysée par dosage en CPG des monosaccharides (Kamerling et al., 1975) et par méthylation (Paz Parente et al., 1985).

3. β -élimination (Lindberg et al., 1973).

10 mg de polysaccharide perméthylé sont lyophilisés, puis dissous dans 1 ml de solvant (DMSO/2,2 diméthoxypropane, 19/1) par agitation au bain ultrasonique pendant 30 min. 0,5 ml de base (méthylsulfinyl de lithium) sont ajoutés et la β -élimination est effectuée pendant 2 heures au bain ultrasonique, puis une nuit à température ambiante.

La réaction est arrêtée par addition d'acide acétique 50% jusqu'à pH neutre. Après dilution à l'eau, les produits méthylés sont extraits par 3 fois 0,5 ml de chloroforme, la phase chloroformique est séchée par Na_2SO_4 , puis chromatographiée sur une colonne de Sephadex LH20 (solvant : méthanol/chloroforme, 1/1), et évaporée à siccité. Le résidu sec est soumis à une hydrolyse ménagée par de l'acide acétique 30% pendant une heure à 100°C. L'agent d'hydrolyse est éliminé par codistillations en présence de méthanol. Une réduction est effectuée dans le mélange p-dioxane/éthanol (8/3) par du borodeutérure de sodium pendant une nuit à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition de Dowex 50 x 8 (20-50 mesh, forme H^+) jusqu'à pH 5-6. Les sels de borates formés sont éliminés par codistillations en présence de méthanol.

Les produits résistants à la β -élimination sont éthylés par les réactifs méthylsulfinyl de lithium/iodure d'éthyle afin de marquer les hydroxyles libres apparus pendant la réaction. Les éthers méthyliques sont analysés après méthanolyse/acétylation et après hydrolyse/réduction/acétylation par couplage CPG/SM.

4. Décarboxylation oxydative au tétraacétate de plomb (Aspinall et al., 1989).

Cette réaction est effectuée sur le polysaccharide perméthylé et acide. La première étape consiste à saponifier les fonctions méthylesters.

- Saponification

10 mg de polysaccharide perméthylé sont dissous dans 0,2 ml d'acétone, puis 1 ml d'eau est ajouté. De la soude molaire est ajoutée

jusqu'à pH 12, et le mélange est maintenu 2 heures à 0°C, puis 15 heures à température ambiante.

Les fonctions carboxyliques sont régénérées sous forme acide (COOH) par addition de Dowex 50 x 2 (200-400 mesh, forme H⁺) jusqu'à pH 6. Après filtration, le produit est lyophilisé.

- Décarboxylation oxydative au tétraacétate de plomb.

Le résidu sec est dissous dans 1,6 ml de benzène anhydre contenant 50 µl de pyridine. La dégradation est effectuée par l'addition de 10 mg de Pb(OAc)₄ pendant 15 heures à 80°C. Cette réaction est effectuée sous atmosphère inerte d'argon.

Après filtration et lavages du précipité par du benzène, le solvant organique est évaporé. Le résidu sec est repris par 0,5 ml de dichlorométhane et lavé par 3 fois 2 ml d'eau.

- Analyse des produits de dégradation

La phase organique est séchée par du Na₂SO₄, filtrée et éliminée sous courant d'azote. Le résidu sec est chromatographié sur colonne de Sephadex LH20. Les composés hydrosolubles, extraits lors des lavages sont désalés sur Dowex 50 x 8 (20-50 mesh, forme H⁺), puis concentrés à siccité. Chaque fraction obtenue subit une réduction par du BH₄K dans le mélange p-dioxane/éthanol (8/3) pendant 15 heures. La réaction est arrêtée par addition de Dowex 50 x 8 (20-50 mesh, forme H⁺). Après élimination des borates formés par codistillations en présence de méthanol, et lyophilisation, les différentes fractions sont méthylées en présence de ICD₃ et analysées par couplage CPG/SM.

5. Dégradation de Hofmann (Kochetkov et al., 1975).

10 mg de polysaccharide perméthylé sont lyophilisés, puis placés sous vide à 65°C pendant 10 heures, la transformation des fonctions méthyl esters en amide est effectuée par 5 ml de méthanol/NH₃ 2N (Aldrich) à 20°C pendant 24 heures sous atmosphère anhydre. Après évaporation sous courant d'azote, le résidu sec est repris par 2 ml de méthanol. La dégradation de Hofmann est assurée par 2 ml de NaOCl 2N (Aldrich) pendant 4 heures à température ambiante

sous agitation magnétique. L'excès d'hypochlorite de sodium est détruit par addition de BH_4K jusqu'à arrêt de dégazement. Puis la solution est amenée à pH 5 à l'aide d'acide acétique. L'hydrolyse ménagée est effectuée pendant 10 heures à température ambiante.

Les produits méthylés sont extraits par 3 fois 0,5 ml de chloroforme. Les phases organiques réunies sont lavées à l'eau, puis séchées au Na_2SO_4 et évaporées sous azote. Le résidu sec est chromatographié sur colonne de Sephadex LH20. La fraction hydrosoluble après hydrolyse ménagée, est désalée sur Dowex 50 x 8 (20-50 mesh, forme H^+), puis concentrée à siccité. Les différentes fractions sont réduites par du BH_4K dans le mélange p-dioxanne/éthanol (8/3), puis méthylées en présence de ICD_3 , et analysées par couplage CPG/SM.

C. Résultats Discussion

1. Réduction des acides uroniques

A partir de l'acide hyaluronique, nous avons effectué la méthylestérification selon le protocole au diazométhane que nous avons modifié, puis la réduction par le BH_4K dans un tampon imidazole/HCl 1M à pH 7 pendant 2 heures.

L'analyse des monosaccharides du polymère réduit obtenus après méthanolyse/triméthylsilylation et après hydrolyse/réduction/acétylation est donnée dans les tableaux suivants :

Méthanolyse/triméthylsilylation

	GlcUA	GlcNAc	Glc	Rendement %
Acide hyaluronique natif	0.6	1	-	23.2
Acide hyaluronique réduit	-	1	1.07	85.3

Hydrolyse/réduction/acétylation

	GlcNAc	Glc	Rendement %
Acide hyaluronique natif	1	-	31.5
Acide hyaluronique réduit	1	1.15	77.8

Après réduction au BH_4K , nous observons la disparition d'acide glucuronique, que nous analysons sous forme de méthyl glycoside triméthylsilylé, et l'apparition de glucose en rapport molaire équivalent à la glucosamine. Nous n'identifions pas de O-méthylation sur le glucose ou sur la glucosamine. Nous obtenons également de bons rendements de libération des monosaccharides, après réduction du polymère.

2. Dégradation au lithium dans l'éthylène diamine

A partir du polysaccharide de Bacillus circulans, nous avons obtenu deux fractions après dégradation par le lithium solide :

- une fraction macromoléculaire, précipitée à l'éthanol.
- une fraction oligosaccharidique, qui a subi une réduction au BD_4Na , et a été purifiée par chromatographie de gel filtration sur TSK HW40S.

La composition en monosaccharides des différentes fractions est donnée dans le tableau suivant :

	Glc	Man	Gal	GlcUA	Mannitol
Polysaccharide natif	1.95	1	1.73	1.03	-
Fraction précipitée	2	0.35	1	+	-
Fraction surnageante	-	-	1	-	1.2

Le disaccharide obtenu a été analysé par R.M.N. du proton et par spectrométrie de masse après perméthylation. Il est caractérisé par l'enchaînement suivant (Voir chapitre 1, résultat) :

Gal β 1-4 mannitol

L'analyse des éthers méthyliques obtenus après méthanolyse/ acétylation de la fraction macromoléculaire perméthylée est donnée dans le tableau suivant :

Ethers méthyliques	Polysaccharide natif	Fraction macromoléculaire
2,3,6 Man	1	0.4
2,3,6 Glc	1.8	2
2,3 Gal	-	-
2,3-(4,6X) Gal	1.2	0.1
2,6 Gal	-	-
2,3,6 Gal	-	0.6
2,3,4,6 Gal	-	0.2

Cette dégradation nous a permis, avec la β -élimination d'établir la structure définitive du polysaccharide. De plus, l'analyse par R.M.N. du proton du disaccharide, Gal 1-4 mannitol, nous a permis d'établir l'anomérisation β du galactose.

La quasi-disparition du pyruvate et l'apparition de perméthyl-galactose caractérisent la labilité de ce substituant pendant la réaction (Lau *et al.*, 1987a).

L'étude de la fraction macromoléculaire indique que le rendement de dégradation est de l'ordre de 60 - 65%, valeur obtenue par dosage du mannose résiduel.

3. β -élimination

A partir de l'exopolysaccharide de Bacillus circulans perméthylé, nous avons obtenu après β -élimination en présence de méthylsulfinyl de lithium, une fraction macromoléculaire, exclue sur Sephadex LH20. Après éthylation, les éthers méthyliques obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

Ethers méthyliques	Polysaccharide natif		produit de β -élimination	
	M	H	M	H
2,3,6 Man	1	1	0.1	0.1
2,3,6 Glc	1.8	2.2	2	2
2,3 Gal	-	1.2	-	-
2,3-(4,6X) Gal	1.2	-	-	-
2,6 Gal	-	1.2	-	-
3-Et 2,6 Gal	-	-	0.7	0.9

M : Méthanolyse/acétylation; H : Hydrolyse/réduction/acétylation

L'apparition du 3-O-éthyl-2,6-di-O-méthyl galactose et l'absence de monosaccharide en position externe non réductrice et réductrice, nous permet de conclure que l'acide glucuronique n'est pas dans la chaîne principale et qu'il est lié en 3 sur le galactose du point de branchement.

Le rendement obtenu est de l'ordre de 80%.

L'absence dans cette fraction de 4,6-O-(1-carbométhoxy-éthylidène)-2,3-di-O-méthyl galactose et de 4,6-di-O-éthyl-2,3-di-O-méthyl galactose doit être due à une réaction de β -élimination au niveau du pyruvate comme l'a décrit Lindberg et al. (1979) sur le polysaccharide de Klebsiella pneumoniae type 33. Ceci peut expliquer pourquoi nous n'avons pas retrouvé le disaccharide correspondant à Gal-mannitol.

4. Décarboxylation oxydative au tétraacétate de plomb - Dégradation de Hofmann

Nous avons suivi les mêmes protocoles pour analyser les produits de dégradation obtenus à partir du polysaccharide de Bacillus circulans lors de ces deux méthodologies.

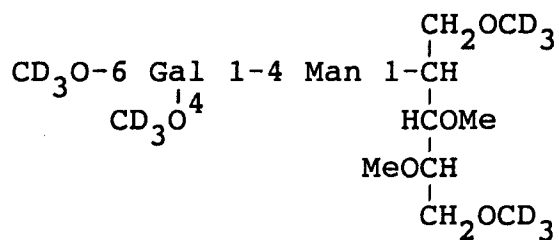
Les fractions macromoléculaires, exclues sur gel de Sephadex LH20, ont été méthylées par l'iodure de méthyle deutéré. Les éthers méthyliques obtenus après méthanolyse sont analysés par CPG/SM et sont consignés dans le tableau suivant :

	Ethers méthyliques				
	2,3,6 Man	2,3,6 Glc	2,3 Gal	2,3(4,6X) Gal	2,3,6 Gal
Polys. natif	1	1.8	-	1.2	-
tétraacétate de plomb	0.26	2	0.25	-	0.54
Hoffman	0.14	2	0.11	0.11	0.67

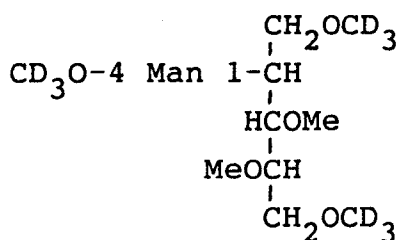
Les fractions oligosaccharidiques, incluses dans le gel de Sephadex LH20 ou isolées des phases aqueuses, sont analysées après méthylation en présence de ICD_3 par couplage CPG/SM. Nous avons caractérisé différents oligosaccharides.

Après décarboxylation oxydative au tétraacétate de plomb, nous avons obtenus deux oligosaccharides :

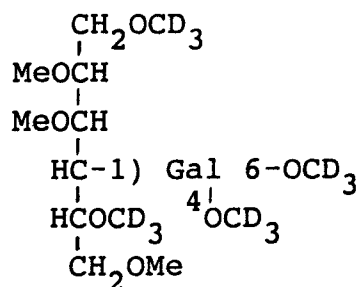
- Un trisaccharide alditol, isolé de la fraction incluse dans le gel de Sephadex LH20, et qui fournit un spectre de masse exploitable malgré un bruit de fond important dû à la faible quantité de produit obtenu (Fig. 13) : Gal 1-4 Man 1-4 xylitol

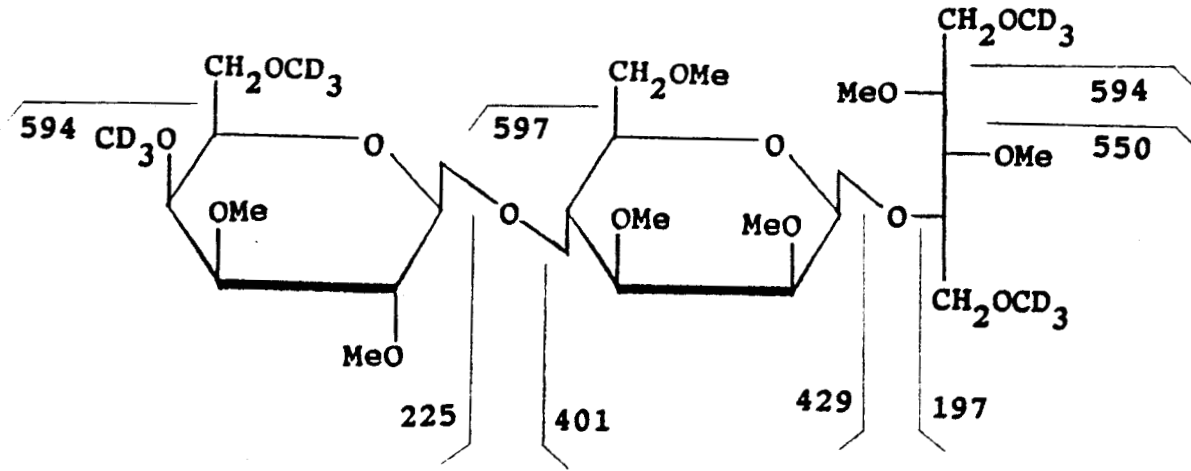


- Un disaccharide alditol, isolé de la phase aqueuse (Fig. 14) : Man 1-4 xylitol



Après dégradation de Hofmann, nous avons obtenu un disaccharide alditol isolé de la fraction incluse sur Sephadex LH20 (Fig. 15) : Gal 1-4 mannitol





$$J_1 : 197 + 60 = 257$$

$$J_1 : 401 + 60 = 461$$

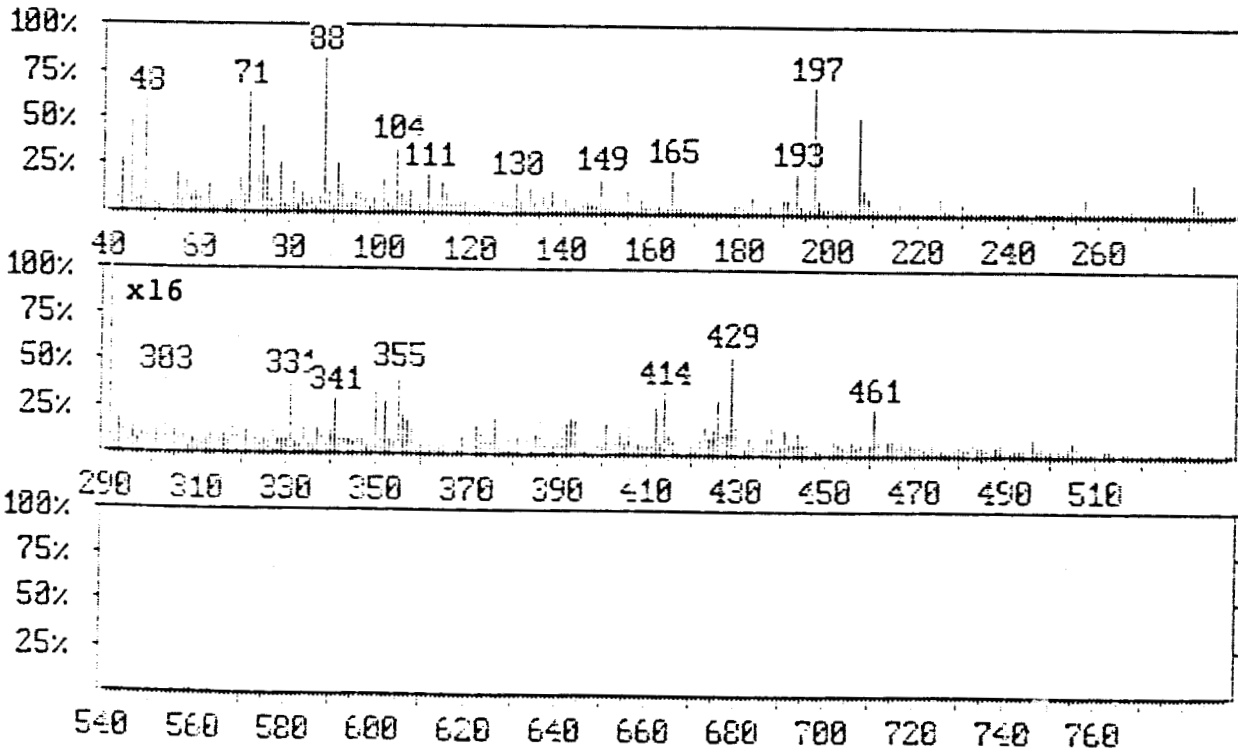
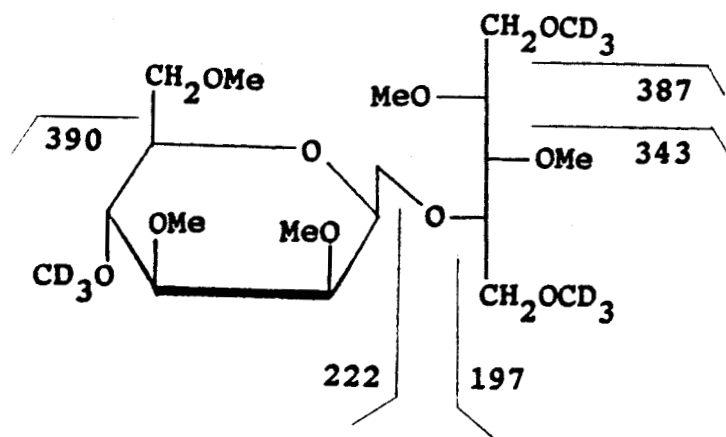


Figure 13 : Spectre de masse en mode d'ionisation électronique de l'oligosaccharide alditol obtenu par décarboxylation oxydative du polysaccharide de Bacillus circulans, inclu sur Sephadex LH20.



$$J_1 : 197 + 60 = 257$$

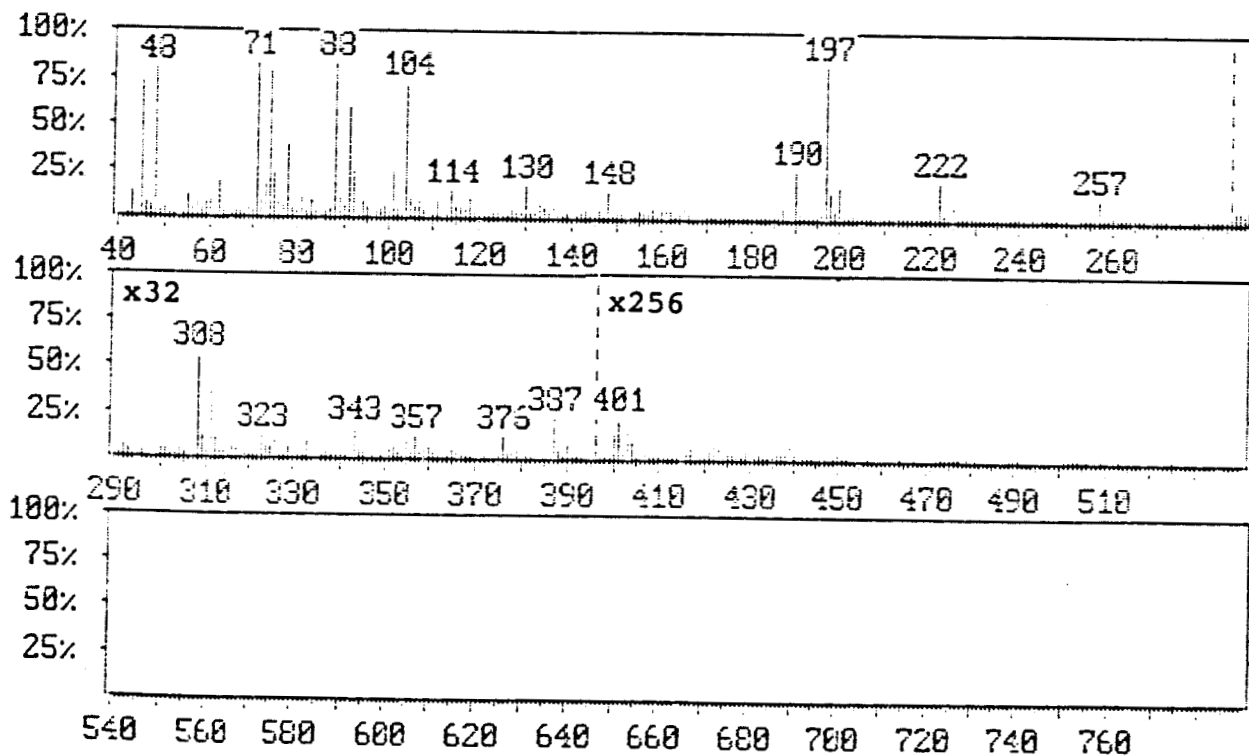
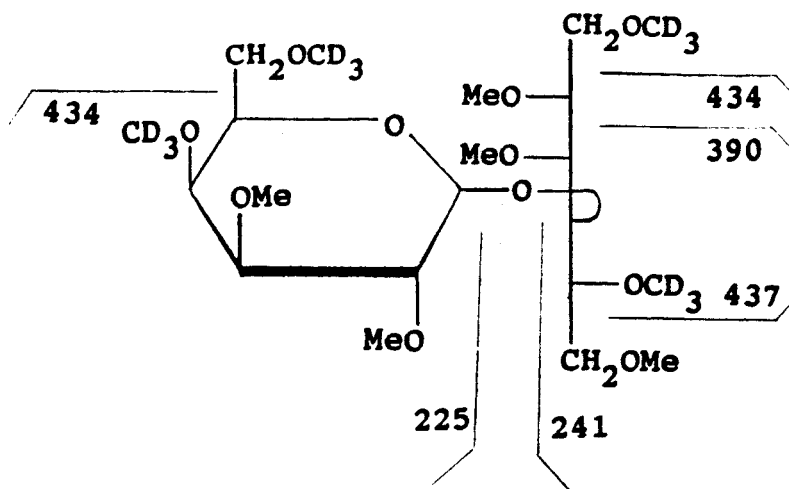


Figure 14 : Spectre de masse en mode d'ionisation électronique de l'oligosaccharide alditol obtenu par décarboxylation oxydative du polysaccharide de Bacillus circulans, isolé de la fraction aqueuse.



$$J_1 : 241 + 60 = 301$$

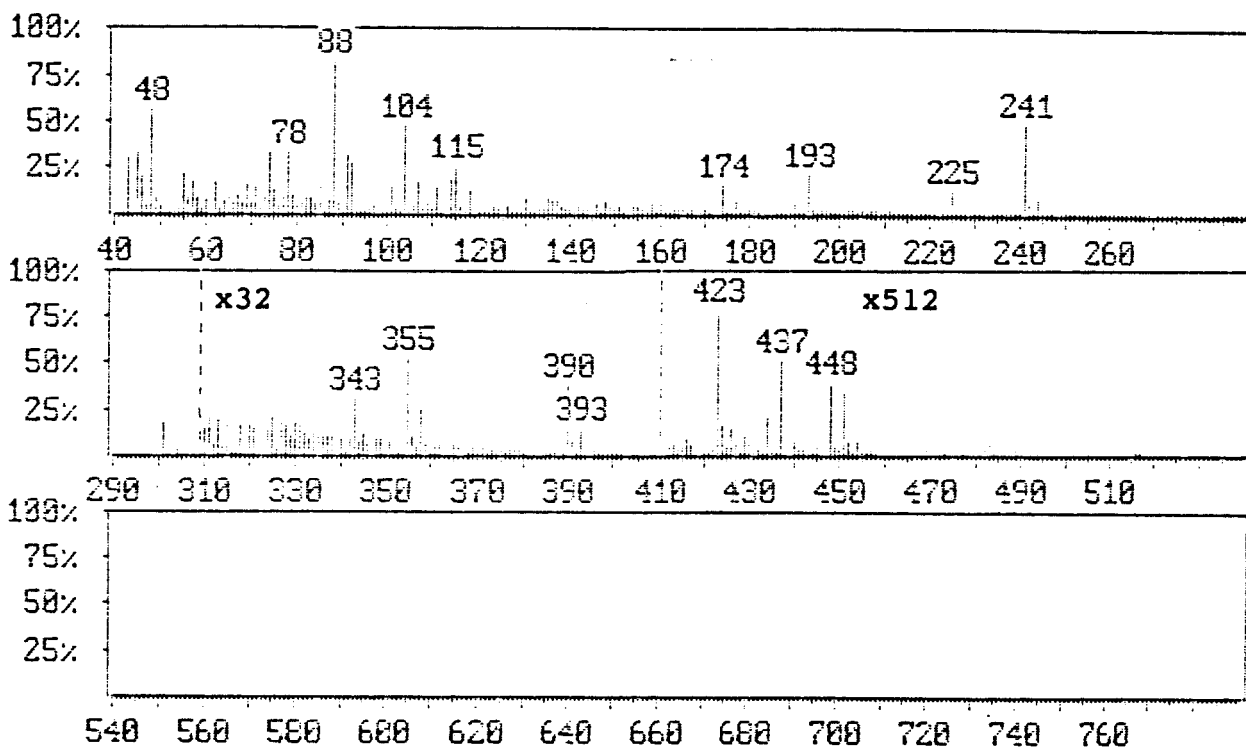


Figure 15 : Spectre de masse en mode d'ionisation électronique de l'oligosaccharide alditol obtenu par dégradation d'Hofmann du polysaccharide de Bacillus circulans.

Les quantités obtenues de ces différents oligosaccharides sont peu importantes au regard de la quantité de polysaccharide utilisé pour ces réactions.

L'analyse des fractions macromoléculaires confirment les résultats obtenus dans le chapitre I (Voir résultats). Il y a élimination de la chaîne latérale et apparition d'un nouvel éther méthylique, le 2,6-di-O-méthyl-3-O-CD₃-galactose correspondant au point de branchement.

Les rendements sont de 74% pour la décarboxylation oxydative et 86% pour la dégradation de Hofmann calculés par dosage du mannose résiduel.

La décarboxylation oxydative fait apparaître un résidu de xylitol qui est le produit de dégradation de l'acide glucuronique (Aspinall et al., 1984). Nous observons que le pyruvate n'est pas stable dans les conditions opératoires de la décarboxylation oxydative. La présence du disaccharide, Man 1-4 xylitol, s'explique par l'élimination du galactose rendu labile par la présence du pyruvate.

La dégradation de Hofmann, effectuée selon notre protocole, ne nous a pas permis d'identifier le xylitol, comme le décrit Kochetkov et al. (1987b). Ce résultat peut s'expliquer par une dégradation de l'aminopentose ou du pentodialdose lors de l'hydrolyse partielle.

Nous observons que le pyruvate n'est que partiellement éliminé; ceci suggère que la fonction carboxylique de l'acide pyruvique se comporte différemment vis-à-vis de la réaction de Hofmann.

Conclusions

Réduction

Plusieurs techniques de réduction des acides uroniques en leur hexose correspondant, ont été décrites. La réaction au carbodiimide de Taylor et Conrad (1972) modifiée par Anderson et Stone (1985) et par York et al. (1985) n'est pas quantitative et nécessite plusieurs cycles de traitement au carbodiimide/BH₄K (Quintero et al., 1989). D'autre part, sa mise en oeuvre est difficile, en particulier lors du maintien du pH à 7 pendant la réduction de la lactone. La technique de Dutton et al. (1986a), qui consiste à effectuer une méthylestérification des acides uroniques à l'aide du réactif au méthanol chlorhydrique suivie d'une réduction par un hydrure alcalin, donne des résultats satisfaisants. Mais elle possède le désavantage de dépolymériser le polysaccharide, et empêche toute étude de séquence du produit réduit. Enfin, la dernière technique que nous avons utilisée, nous a donné entière satisfaction. Elle conjugue une ancienne méthode de méthylestérification des fonctions carboxyliques par le diazométhane à une nouvelle technique de réduction des méthylesters par le BH₄K dans l'imidazole (Fales et al., 1990). Cette technique nous a permis d'effectuer, en un seul cycle de méthylestérification/réduction, la transformation quantitative de l'acide glucuronique contenu dans l'acide hyaluronique, en glucose .

Rupture sélective au niveau des acides uroniques

Nous avons utilisé 4 méthodes différentes de rupture au niveau de l'acide glucuronique contenu dans l'exopolysaccharide de Bacillus circulans.

La méthode au lithium solide dans l'éthylène diamine possède l'avantage d'effectuer une rupture sélective au niveau des acides uroniques sur un polymère non modifié. Elle permet une étude plus facile des oligomères obtenus par les méthodes d'investigation telles que la R.M.N et la spectrométrie de masse. Ainsi, nous avons pu établir très facilement l'anomérie β de la liaison osidique du disaccharide Gal 1-4 mannitol, obtenu à partir du polysaccharide de Bacillus circulans.

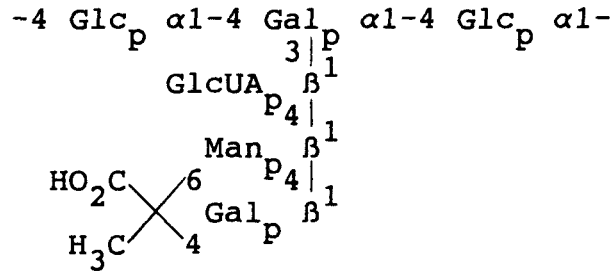
La β -élimination des acides uroniques effectuées sur le polymère perméthylé de Bacillus circulans, fournit un rendement de 80%. Les résultats obtenus sur la fraction macromoléculaire sont similaires à ceux obtenus par la technique au lithium. Par contre, l'oligosaccharide éliminé subit des dégradations qui ne nous ont pas permis de l'analyser.

Deux autres méthodes de séquençage au niveau des acides uroniques ont été utilisées : la décarboxylation oxydative au tétraacétate de plomb et la dégradation de Hofmann à l'hypochlorite de sodium. Ces deux techniques ont donnés des résultats comparables à la β -élimination. Toutefois, la méthode de Hofmann a fourni des rendements supérieurs et présente une grande simplicité de mise en oeuvre comparée à la décarboxylation oxydative.

Toutes ces méthodes dégradent partiellement ou totalement le substituant pyruvate.

CONCLUSIONS GENERALES

A partir d'un moût de fermentation de Bacillus circulans, nous avons isolé une macromolécule glucidique responsable de la viscosité du milieu. Les techniques physico-chimiques de détermination des séquences glucidiques nous ont permis d'établir l'unité hexasaccharidique de répétition de ce polysaccharide :



La présence, dans cet exopolysaccharide, d'un groupement pyruvate nous a conduit à étudier le comportement de ce substituant vis à vis des réactifs de méthanolyse et du clivage réductif. La stabilité du pyruvate dépend de :

- la nature du monosaccharide sur lequel il est lié
- les positions des hydroxyles engagés dans la liaison acétalique
- l'anométrie α ou β de la liaison du monosaccharide substitué.

En outre, nous avons pu décrire les temps de rétention en CPG et les spectres de masse de quatre méthyl carbométhoxy-éthylidène 2,3-di-O-méthyl hexosides et de quatre carbométhoxy-éthylidène 2,3-di-O-méthyl anhydrohexitols.

La présence de l'acide glucuronique dans l'exopolysaccharide de Bacillus circulans nous a amené à adapter et à comparer différentes techniques de modification des acides uroniques.

Nous avons adapté toutes ces méthodologies sur des quantités de polysaccharide de l'ordre de 5 à 10 mg.

Nous décrivons une méthode quantitative de réduction de la fonction carboxylique des acides uroniques en un seul cycle de

méthylestérification par le diazométhane et de réduction par un borohydrure alcalin. Le polymère ainsi réduit, peut ensuite être analysé à l'aide des méthodes physico-chimiques d'analyse des molécules glucidiques.

Nous avons sélectionné trois méthodes de séquençage des polymères au niveau des acides uroniques : la dégradation au lithium solide dans l'éthylène diamine qui présente l'avantage d'être mise en oeuvre sur le produit natif; la β -élimination et la dégradation de Hofmann, effectuées sur le polymère perméthylé qui offrent de bons rendements et une grande simplicité de manipulation.

BIBLIOGRAPHIE

AMINOFF D., GATHMANN W.D., Mc LEAN C.M. and YADOMAE T.

Quantitation of oligosaccharides released by the β -elimination reaction.
Anal. Biochem. 101 (1980) 44-53.

ANDERSON M.A. AND STONE B.A.

A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups
in polysaccharides.

Carbohydr. Polym. 5 (1985) 115-129.

ANGYAL S.J. and JAMES K.

Oxidation of carbohydrates with chromium trioxide in acetic acid.

Aust. J. Chem. 23 (1970) 1209-1221.

ANTONOPOULOS C.A., AXELSSON I., HEINEGARD D. and GARDELL S.

Extraction and purification of proteoglycans from various types of
connective tissue.

B. B. A. 338 (1974) 108-119.

ARCHIBALD A.R. and BADDILEY J.

The teichoic acid.

Adv. Carbohydr. Chem. 21 (1966) 323-375.

ASPINALL G.O.

Reduction of uronic acid in polysaccharides.

Methods in Carbohydr. Chem. V (1965) 397-400.

ASPINALL G.O. and CHAUDHARI A.S.

Base-catalysed degradation of carbohydrates. X. Degradation by
 β -elimination of methylated leiocarpan A.

Can. J. Chem. 53 (1975) 2189-2193.

**ASPINALL G.O., KRISHNAMURTHY T.N., MITURA W. and FUNABASHI
M.**

Base-catalysed degradation of carbohydrates. IX. β -elimination of
O-substituted hexopyranosiduronates.

Can. J. Chem. 53 (1975) 2182-2188.

ASPINALL G.O., IGARASHI O., KRISHNAMURTHY T.N., MITURA W. and FUNABASHI M.

Action of Grignard reagents on hexuronic esters and attempted dehydration of tertiary alcohols to give hex-5-enopyranosides.

Can. J. Chem. 54 (1976) 1708-1713.

ASPINALL G.O. and ROSELL K-G.

The formation of hex-5-enopyranosides and their selective hydrolysis in methylated polysaccharides.

Can. J. Chem. 56 (1978a) 680-684.

ASPINALL G.O. and ROSELL K-G.

The selective cleavage of glycopyranosiduronamide linkage in methylated polysaccharides.

Can. J. Chem. 56 (1978b) 685-690.

ASPINALL G.O., FANOUS H.K., KUMAR N.S. and PUVANESARAJAH V.

The selective cleavage of permethylated glycopyranosiduronic acid linkages by oxidative decarboxylation with lead tetraacetate.

Can. J. Chem. 59 (1981) 935-940.

ASPINALL G.O., PUVANESARAJAH V., REUTER G. and SHAUER R.

Selective cleavage of β -D-glycopyranosiduronic acid linkages in methylated polysaccharide acids from Drosera species.

Carbohydr. Res. 131 (1984) 53-60.

ASPINALL G.O.

Chemical modification and selective fragmentation of polysaccharide.

Acc. Chem. Res. 20 (1987) 114-120.

ASPINALL G.O., KHONDO L. and KINNEAR J.A.

The hex-5-enose degradation : cleavage of modified glycosiduronic acid linkages in methylated Khaya ivorensis gum.

Carbohydr. Res. 179 (1988) 211-221.

ASPINALL G.O., KHONDO L. and PUVANESARAJAH V.

Selective fragmentation of methylated tobacco extracellular arabinoglucurmannan by cleavage of β -D-glycopyranosiduronic acid units.

Carbohydr. Res. 188 (1989) 113-120.

BALAZS E.A., LAURENT T.C., HOWE A.F. and VARGA L.

Irradiation of mucopolysaccharides with ultraviolet light and electrons.
Radiation Res. 11 (1959) 149-242.

BANOUB J.H. and SHAW D.H.

Structural investigations on the core oligosaccharide of Aeromonas hydrophila (chemotype III) lipopolysaccharide.
Carbohydr. Res. 98 (1981) 93-103.

BARRY and GOEBEL

Colimonic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid.
Nature 179 (1957) 206.

BERKELEY R.C.W., LYNCH J.M., MELLING J., RUTLER P.R. and VINCENT B.

Microbial adhesion to surfaces.
Ellis Horwood, Chischester (1980).

BJORNDAL H., LINDBERG B., LONNGREN J., MESZAROS M., THOMPSON J.L. and NIMMICH W.

Structural studies of polysaccharide of Klebsiella type 52.
Carbohydr. Res. 31 (1973) 93-100.

BLAKENEY A.B. and STONE B.A.

Methylation of carbohydrates with lithium methylsulfinyl carbanion.
Carbohydr. Res. 140 (1985) 319-324.

BLUMENKRANTZ N. and ASBOE-HANSEN G.

New method for quantitative determination of uronic acids.
Anal. Biochem. 54 (1973) 484-489.

BRADBURY A.G.W. AND VON SONNTAG C.

On the mechanism of the scission of the glycosidic linkage of the methyl (methyl D-glucopyranosid) uronate induced by photolysis.
Carbohydr. Res. 60 (1978) 183-186.

BURGSTAHLER A.W., WORDEN L.R. and LEWIS T.B.

Direct reduction of carboxylic acids to aldehydes by lithium in ethylamine.
J. Org. Chem. 28 (1963) 2918-2919.

CARDON P.

Contribution à l'étude structurale d'un exopolysaccharide produit par une nouvelle souche de bactérie du sol.

Thèse de troisième cycle, Université de Lille (1986).

CARLSON D.M.

Oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucin.

J. Biol. Chem. 241 (1966) 2984-2986.

CIUCANU I. and KEREK F.

A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates.

Carbohydr. Res. 131 (1984) 209-217.

CURVALL M., LINDBERG B. and LONNGREN J.

Modification of polysaccharides containing uronic acid residues.

Carbohydr. Res. 41 (1975) 235-239.

D'AMBRA A.J., RICE M.J., ZELLER S.G., GRUBER P.R. and GRAY G.R.

Analysis of positions of substitution of O-methyl or O-ethyl groups in partially methylated or ethylated cellulose by the reductive-cleavage method.

Carbohydr. Res. 177 (1988) 111-116.

DARVILL A.G., Mc NEIL M. and ALBERSHEIM P.

Structure of plant cell walls.

Plant Physiol. 62 (1978) 418-422.

DISCHE Z.

Color reactions of carbohydrates.

Methods Carbohydr. Chem. I (1962) 475-514.

DUDMAN W.F.

The role of surface polysaccharide in natural environments.

In : Surface carbohydrates of prokaryotic cell, Eds by Sutherland I.W., Academic Press New-York, (1977) 357-414.

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

The structural elucidation of the capsular polysaccharide of Klebsiella K68.

Carbohydr. Res. 152 (1986) 249-259.

DUTTON G.G.S., PAROLIS H., JOSELEAU J-P. and MARAIS M-F.

The use of bacteriophage depolymerization in structural investigation of capsular polysaccharide from Klebsiella serotype K3.

Carbohydr. Res 149 (1986) 411-423.

FALES H.M., JAOUNI T.M. and BABASHAK J.K.

Simple device for preparing ethereal diazomethane without resorting to codistillation.

Anal. Chem. 45 (1973) 2302- 2303.

FAZIO S.A., UHLINGEN D.J., PARKER J.H. and WHITE D.C.

Estimation of uronic acids as quantitative measure of extracellular and cell wall polysaccharides polymers from environmental samples.

Appl. Environ. Microbiol. 43 (1982) 1151-1159.

FINNE J., KRUSIUS T. and RAUVALA H.

Use of potassium tert-butoxide in the methylation of carbohydrates.

Carbohydr. Res. 80 (1980) 336-339.

GACESA P., SQUIRE A. and WINTERBURN P.J.

The determination of the uronic acid composition of alginate by anion-exchange liquid chromatography.

Carbohydr. Res. 118 (1983) 1-8.

GALANOS C., LUDERITZ O., RICTSCHEL E.T. and WESTPHAL O.

Int. Rev. Biochem. 14 (1977) 239-335.

GAREGG P.J., JANSSON P-E, LINDBERG B., LINDH F., LONNGREN J., KVARNSTROM I. and NIMMICH W.

Configuration of the acetal carbon atom of the pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides.

Carbohydr. Res. 78 (1980) 127-132.

GOLDSTEIN I.J., HAY G.W., LEWIS B.A. and SMITH F.

Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxydation, reduction, and hydrolysis.

Methods Carbohydr. Chem. 5 (1965) 361-370.

GORIN P.A.J., MAZUREK M., DUARTE H.S., IACOMINI M. and DUARTE J.H.B

Properties of ^{13}C -N.M.R. β -D-galactopyranoside : models for the determination of pyruvic acid acetal structures in polysaccharides.

Carbohydr. Res. 100 (1982) 1-15.

GOWDA D.C., REUTER G. and SHAUER R.

Structural studies of an acidic polysaccharide from the mucin secreted by Drosera capensis

Carbohydr. Res. 113 (1983) 113-124.

GRAY G.R.

Reductive cleavage of permethylated polysaccharides.

Methods enzymol. 138 (1987) 26-38.

GUNNARSSON A.

N- and O- alkylation of glycoconjugates and polysaccharides by solid base in dimethyl sulphoxide/alkyl iodide.

Glycoconjugate J. 4 (1987) 239-245.

HAKOMORI S-I.

A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide.

J. Biochem. 55 (1964) 205-208.

HAKOMORI S-I.

Chemistry of glycosphingolipids.

In : Handbook of lipids research, Eds. by Hanahan D.J., Plenum press 3 (1983) 1-165.

HEIMS H., STEINHART H. and MISCHNICH P.

Determination of the structure of pentose containing carbohydrates by reductive cleavage method.

Carbohydr. Res. 191 (1989) 343-350.

JONES C.

A novel method for the determination of the stereochemistry of pyruvate acetal substituents applied to the capsular polysaccharide from Streptococcus pneumoniae type 4.

Carbohydr. Res. 198 (1990) 353-357.

JONES J.K.N. and PERRY M.B.

The structure of the type VIII Pneumococcus specific polysaccharide.

J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 2787-2793.

JUAN J-G and GRAY G.R.

A new catalyst for reductive cleavage of methylated glycans.

Carbohydr. Res. 163 (1987) 247-261.

KAMERLING J.P., GERWIG G.J., Vliegenthart J.P.G. and CLAMP J.R.

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

Biochem. J. 151 (1975) 491-495.

KENNE L. and LINDBERG B.

Bacterial polysaccharide.

In : The polysaccharides, Eds. Aspinall G.O., vol. 2 (1983) 287-353.

KITAGAWA I., IKENISHI Y., YOSHIKAWA M. and SHI IM K.

Saponin and sapogenol. XX. Selective cleavage of the glucuronide linkage in saponin by acetic anhydride and pyridine treatment.

Chem. Pharm. Bull. 25 (1977) 1408-1416.

KITAGAWA I. and YOSHIKAWA M.

Selective cleavage of glucuronide linkage in oligoglycoside.

Heterocycle 8 (1977) 783-811.

KITAGAWA I., YOSHIKAWA M. and KADOTA A.

Saponin and sapogenol. XXIII. degradation of methyl glucuronide and methyl galacturonide by lead tetraacetate oxidation followed by alkali treatment.

Chem. Pharm. Bull. 26 (1978) 484-496.

HERHRE E.J.

Production from sucrose of serologically reactive polysaccharide sterile bacterial extract.

Science 93 (1941) 237-238.

HESTRIN S., ASCHNER M. and SHAPIRO S.A.

The enzymatic production of levan.

Biochem. J. 37 (1943) 450-456.

HILLER K. und VOIGT G.

Neue ergebnisse in der erforschung der triterpensaponine.

Pharmazie 32 (1977) 365-393.

HILLER K. und ADLER C.

Neue ergebnisse über triperpensaponine.

Pharmazie 37 (1982) 619-634.

HRANISAVLJEVIC J., SIMPSON D.L. and DAVIDSON E.A.

Properties of cartilage proteoglygans.

Biochemistry 11 (1972) 2983-2990.

HSU D.S., HOFFMAN P. and MASHBURN T.A.

Fractionation of chondroitin sulfate and determination of molecular weight by polyacrylamide gel electrophoresis.

B. B. A. 338 (1974) 254-264.

JAMES D.W., PREISS J. and ELBEIN A.D.

Biosynthesis of polysaccharides.

In : The polysaccharides Eds. Aspinall G.O., vol. 1 (1982) 107-207.

JANN K. and JANN B.

The K antigens of Escherichia coli.

Prog. Allergy. 33 (1983) 217-225.

JANSSON P.E., LINDBERG B. and WIDMALM G.

Structural studies of an extracellular polysaccharide S-53, elaborated by a Klebsiella species.

Carbohydr. Res. 182 (1988) 166-168.

LAWSON C.L., Mc CLEARY C.W., NAKADA H.I., REES D.A., SUTHERLAND I.W. and WILKINSON J.F.

Structural analysis of colanic acid from Escherichia coli by using methylation and base-catalysed fragmentation.

Biochem. J. 115 (1969) 947-958.

LEONTEIN K., LINDBERG B., LONNGREN J. and CARLO D.J.

Structural studies of the capsular polysaccharide from Streptococcus pneumoniae type 12A.

Carbohydr. Res. 114 (1983) 257-266.

LINDBERG A.A.

Bacteriophage receptors.

Annu. Rev. Microbio. 27 (1973) 205-236.

LINDBERG B., LONNGREN J. and THOMPSON J.L.

Degradation of polysaccharides containing uronic acid residues.

Carbohydr. Res. 28 (1973) 351-357.

LINDBERG B., LONNGREN J. and SVENSSON S.

Specific degradation of polysaccharides.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 31 (1975) 185-240.

LINDBERG B., and LONNGREN J.

Specific degradation of polysaccharides containing uronic acid residues.

Methods Carbohydr. Chem. VII (1976) 142-148.

LINDBERG B., LINDH F. and LONNGREN J.

Modification of polysaccharides containing uronic acid residues.

Carbohydr. Res. 61 (1978) 81-87.

LINDBERG L., LINDH F., LONNGREN J. and NIMMICH W.

Structural studies of the capsular polysaccharide of Klebsiella type 33.

Carbohydr. Res. 70 (1979) 135-144.

MANESS N.O., RYAN J.D. and MORT A.J.

Determination of the degree of methyl esterification of pectins in small samples by selective reduction of esterified galacturonic acid to galactose.

Anal. Biochem. 185 (1990) 346-352.

KITAGAWA I., WANG H.K., SAITO M. and YOSHIKAWA M.

Saponin and sapogenol. XXXII. Chemical constituents of the seeds of Vigna angularis (WILD) OHWI and OHASHI. Azukisaponins I, II, III and IV.

Chem. Pharm. Bull. 31 (1983) 674-682.

KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S. and SVIRIDOV A.F.

An approach to the selective degradation of polysaccharide chains.

Carbohydr. Res. 4 (1967a) 362-363.

KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S. and SVIRIDOV A.F.

Selective methods for the cleavage of polysaccharide chains. (cleavage of the amide of L-menthyl- α -D-glucuronic acid).

Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk 10 (1967b) 2316-2320.

KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S. and SVIRIDOV A.F.

Selective cleavage of glycuronosidic linkages.

Carbohydr. Res. 14 (1970) 277-285.

KOCHETKOV N.K., GORIN S.E., SVIRIDOV A.F. CHIZHOV O.S., GOLUBEV V.I., BAD'EVA I.P. and PODEL'KO A.Y.

Polysaccharides of Lipomyces. (Structure of extracellular glucuronomannan of Lipomyces lipofer strain 133).

Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk 10 (1973) 2304-2311.

KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S., SVIRIDOV A.F., GORIN S.E. and BAD'EVA I.P.

Lipomyces polysaccharides. (Structure of extracellular galactoglucromannane of strain 70 L. tetrasporus).

Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk 12 (1975) 2774-2781.

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

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

Carbohydr. Res. 168 (1987a) 219-243.

LAU J.M., Mc NEILM., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P.

Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine.

Carbohydr. Res. 168 (1987b) 245-274.

MANNEL D. and MAYER H.

Isolation and chemical characterization of the enterobacterial common antigen.

Eur. J. Biochem. 86 (1978) 361-370.

MARTENS D.A. and FRANKENBERGER W.T.

Determination of glycuronic acids by high performance anion chromatography with pulsed amperometric detection.

Chromatographia 30 (1990) 651-656.

Mc CLEARY C.W., REES D.A., SAMUEL J.W. and STEELE L.W.

Selective splitting of polysaccharide chains at the linkage involving C-4 of uronic acid residues.

Carbohydr. Res. 5 (1967) 492-495.

Mc DEVITT C.A. and MUIR H.

Gel electrophoresis of proteoglycans and glycosaminoglycans on large-pore composite polyacrylamide-agarose gels.

Anal. Biochem. 44 (1971) 612-622.

Mc NEIL M., DARVILL A.G., AMAN P., FRANZEN L.E. and ALBERSHEIM P.

Structural analysis of complex carbohydrates using high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and mass spectrometry.

Methods Enzymol. 83 (1982) 3-45.

MIAN A.J. and PERCIVAL E.

Carbohydrates of the brown seaweeds Himantalia lorea and Bifurcaria bifurcata (structural studies of the fucans).

Carbohydr. Res. 26 (1973) 147-161.

MOGILEVSKII M. Sh. and LAUFER A.L.

Action of ultraviolet on hyaluronic acid.

Doklady Akad. Nauk. SSSR 76 (1951) 239-242.

MONNERET C., FLORENT J.C., KABORE I. et KHUONG-HUU Q.

Nouvelle méthode de O-déméthylation de méthoxy-sucre.

J. Carbohydrates Nucléosides Nucléotides 1 (1974) 161-168.

MORT A.J. and BAUER W.D.

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

J. Biol. Chem. 257 (1982) 1870-1875.

PAROLIS H., PAROLIS L.A.S. and VENTER R.D.

Escherichia coli serotype 39 capsular polysaccharide : primary structure and depolymerization by a bacteriophage associated glycanase.

Carbohydr. Res. 185 (1989) 225-232.

PAZ PARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B. and RICART G.

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

Carbohydr. Res. 141 (1985) 41-47.

PECINA R., BONN G., BURTSCHER E. and BOBLETER O.

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

J. Chromatogr. 287 (1984) 245-258.

PERRY M.B., ALTMAN E., BRISSON J-R., BEYNON L.M. and RICHARDS J.C.

Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of Actinobucillus (Haemophilus) pleuropneumoniae strains.

Serodiagnosis and immunotherapy in infectious disease 4 (1990) 299-308.

PHILIPPS G.O.

Photochemistry of carbohydrates.

Adv. Carbohydr. Chem. 18 (1963) 9-43.

PHILIPPS L.R. and FRASER B.A.

Methylation of carbohydrates with dimethyl potassium in dimethyl sulfoxide.

Carbohydr. Res. 90 (1981) 149-152.

QUINTERO E., ISHIDA K., GORDON G and GEESEY G.

Comparaison of reduction methods for gas chromatography-mass spectrometric. Identification and quantitation of uronic acids in acidic polysaccharides.

J. Microbiol. Methods 9 (1989) 309-322.

ROLF D. and GRAY G.R.

Reductive cleavage of glycosides.

J. Am. Chem. Soc. 104 (1982) 3539-3541.

ROLF D., BENNEK J.A. and GRAY G.R.

Reductive cleavage of glycosides. Stereochemistry of trapping of cyclic oxonium ions.

J. Carbohydr. Chem. 2 (1983) 373-383.

ROLF D., BENNEK J.A. and GRAY G.R.

Analysis of linkage in D-glucopyranosyl residues by the reductive cleavage method.

Carbohydr. Res. 137 (1985) 183-196.

ROSNER M.R., TANG J-Y., BERZILAY I. and KHORANA H.G.

Structure of the lipopolysaccharide from an Escherichia coli heptose-less mutant.

J. Biol. Chem. 254 (1979) 5906-5917.

SAADY J.J. and BLANKE R.V.

Measurement of glucuronic acid metabolite by high resolution gas chromatography.

J. Chromatogr. Sci. 28 (1990) 282-287.

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

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

Tappi 37 (1954) 336-343.

SCHLEIFER K.H. and KANDLER O.

Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications.

Bacteriol. Rev. 36 (1972) 407-477.

SCHOPKE T. and HILLER K.

Triterpenoid saponins.

Pharmazie 45 (1990) 313-342.

SCOTT J.E.

Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts.

Methods Carbohydr. Chem. V (1965) 38-44.

SIMMS P.J., BOYKO W.J. and EDWARDS J.R.

The structural analysis of a levan produced by Streptococcus salivarius SS2.

Carbohydr. Res. 208 (1990) 193-198.

SMITH H.A., HUFF B.J.L., POWERS W.J. CAINE D.

The reduction-methylation of cyclohexenone derivatives.

J. Org. Chem. 32 (1967) 2851-2856.

SOMME R.

Degradation of glucuronic acid containing exopolysaccharide from Rhizobium by Hakomori methylation procedure.

Carbohydr. Res. 152 (1986) 237-241.

SUTHERLAND I.W.

Bacterial exopolysaccharide.

Adv. in Microbiol. Physiology 8 (1972) 143-213.

SUTHERLAND I.W.

Surface carbohydrates of the procaryotic cell.

Eds. Academic Press, New-York (1975).

SUTHERLAND I.W.

Microbia¹ exopolysaccharides : their role in microbial adhesion in aqueous systems.

Crit. Rev. Microbiol. 10 (1983) 173-202.

SUTHERLAND I.W.

Bacterial surface polysaccharide : structure and function.

In : International review of cytology, Academic Press INC, vol. 113 (1988) 187-231.

TAYLOR R.L. and CONRAD H.E.

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

Biochemistry 11 (1972) 1383-1388.

TSIEN H.C. and SCHMIDT E.L.

Localization and partial characterization of soybean lectin binding polysaccharides of Rhizobium Japonicum.

J. Bacteriol. 145 (1981) 1063-1074.

VANLAEKE G., CUPPENS H., LEYSSENS L. and RAUS J.

Identification of polysaccharides in pharmaceuticals by capillary gas chromatography.

J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 7 (1989) 1641-1649.

VODONIK S.A. and GRAY G.R.

Analysis of linkage positions in a polysaccharide containing non reducing terminal α -D-glucopyranosyluronic group by reductive cleavage method.

Carbohydr. Res. 172 (1988a) 255-266.

VODONIK S.A. and GRAY G.R.

Analysis by reductive cleavage method of linkage positions in a polysaccharide containing 4-linked D-glucopyranosyluronic residues.

Carbohydr. Res. 175 (1988b) 93-102.

WANG P.Y., BOLKER H.I. and PURVES C.B.

Ammonolysis of uronic ester groups in birch xylan.

Can. J. Chem. 42 (1964) 2434-2439.

WHITFIELD D.M., STOJKOVSKI S., PANG H., BAPTISTA J. and SARKAR B.

Diagnostic methods for the determination of iduronic acid in oligosaccharides.

Anal. Biochem. 194 (1991) 259-267.

YORK W.S., DARVILL A.G., Mc NEIL M., STEVENSON T.T. and ALBERSHEIM P.

Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components.

Methods in Enzymol. 118 (1985) 3-40.

ZANETTA J.P., BRENKENRIDGE W.C. and VINCENDON G.

Analysis of monosaccharides by gas liquid chromatography of the O-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids.

J. Chromatogr. 69 (1972) 291-304.

ZELLER S.G. and GRAY G.R.

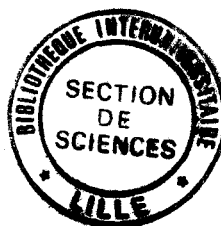
Model studies on the analysis of pyruvic acid acetal-containing polysaccharides by reductive-cleavage method.

Carbohydr. Res. 198 (1990) 285-303.

ZELLER S.G. and GRAY G.R.

Analysis of pyruvic acid acetal-containing polysaccharide by the reductive-cleavage method.

Carbohydr. Res. 211 (1991) 309-316.

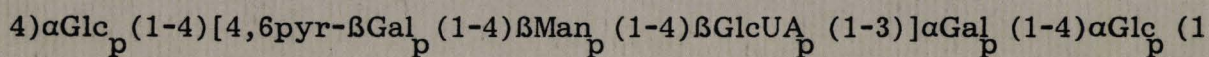


RESUME

De nombreuses espèces bactériennes synthétisent des polysaccharides que l'on retrouve dans le milieu extérieur. Ces polymères possèdent des propriétés particulières dues à leur masse moléculaire élevée et à leur structure.

Dans ce cadre, nous avons étudié le polysaccharide produit par Bacillus circulans, souche productrice d'un enzyme : la cyclodextrine glucosyl transférase. Ce polymère augmente la viscosité du moût de fermentation et limite l'utilisation de l'enzyme.

Nous avons isolé cet exopolysaccharide et déterminé la séquence de son unité de répétition :



La présence du substituant pyruvate nous a conduit à décrire des méthodes d'identification d'éthers méthyliques de monosaccharides pyruvatés.

Différentes techniques d'analyse de polysaccharides contenant des acides uroniques sont développées. Ainsi des méthodes de réduction et de rupture sélective (dégradation au lithium, β -élimination, décarboxylation oxydative et réaction de Hofmann) ont été adaptées à de faibles quantités de polymère.