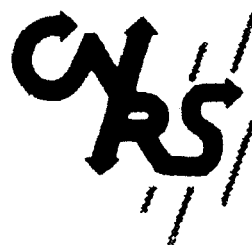


Université des Sciences
et Technologies de Lille
Villeneuve d'Ascq



THÈSE

présentée par

Guy DUBREUCQ

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Spécialité : Biochimie

Contribution à l'étude structurale d'un polysaccharide
excrété par la bactérie *Alteromonas sp.* 1644
isolée du milieu hydrothermal profond

soutenue le 19 Décembre 1996 devant la commission d'examen

Président :	Pr. A. VERBERT
Rapporteurs :	Pr. E. DE HOFFMANN Dr. J.C. PROMÉ
Examineurs :	Dr. G. BARBIER Dr. J.C. MICHALSKI
Directeur de thèse :	Pr. B. DOMON

A mes parents,

à Yves

Ce travail est dédié à la mémoire du Professeur Bernard Fournet



Je garderai de lui un très grand souvenir, celui d'un homme chaleureux qui m'a enthousiasmé par son professionnalisme, ses qualités pédagogiques, sa modestie et sa grande gentillesse.

Je tiens en premier lieu à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur André Verbert pour m'avoir accueilli dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille et pour avoir accepté la présidence de mon jury de thèse.

Je remercie le Professeur Edmond De Hoffmann et le Docteur Jean-Claude Promé d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que les Docteurs Georges Barbier et Jean-Claude Michalski qui ont eu l'amabilité de bien vouloir examiner ce travail.

Je remercie le Professeur Bruno Domon pour avoir encadré cette thèse.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité Mixte de Recherche n° 111 du CNRS, Directeur : Monsieur le Professeur André VERBERT, sous la direction de Monsieur le Professeur Bruno DOMON.

Publications et Communications

1. Brevet :

Brevet européen n° 93011687, déposé le 15 février 1993 au nom de l'IFREMER pour les bactéries du type *Alteromonas*, polysaccharides produits par ces bactéries, ose contenu dans ces polysaccharides et applications.

2. Publication :

Dubreucq G., Domon B. and Fournet B., 1996.

Structure determination of a novel acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents.

Carbohydrate Research, **290**, 185-187.

3. Prix 1996 de la Fondation Bernard Fournet

4. Communication orale :

Dubreucq G., De Hoffmann E., Domon B.

Nouvelle stratégie d'analyse structurale d'oligosaccharides contenant des acides uroniques.

XVIèmes Journées Méditerranéennes des Glucides. L'Isle sur Sorgue, 20-24 Mai 1996.

5. Communications écrites :

Dubreucq G., Domon B., Fournet B.

Structure determination of a novel acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents.

7th Joint Meeting of the Nederlandse vereniging voor de bestudering van glycoconjugaten, the studienngruppe glykokonjugate der Gesellschaft für chemie and the groupe lillois de glycobiologie. Nuland, Pays-Bas, 20-21 novembre 1995.

Dubreucq G., Domon B., Fournet B.

Caractérisation d'un nouvel acide uronique présent dans l'exopolysaccharide produit par une bactérie du milieu hydrothermal profond.

Atelier "Dorsales" biologie 95, Adaptations liées aux contraintes de l'environnement hydrothermal, Banyuls, 13-15 décembre 1995.

Dubreucq G., De Hoffmann E., Domon B.

A new method for structural analysis of uronic acid containing oligosaccharides based on tandem mass spectrometry.

XVIII International carbohydrate symposium. Milan, July 21-26, 1996.

Dubreucq G., De Hoffmann E., Domon B.

Methylation analysis of oligosaccharides revisited : CI MS/MS of permethylated ethylglycosides.

ASMS, Portland, Mai 1996.

ABREVIATIONS

AC	: acétate
ATFA	: acide trifluoroacétique
CERMAV	: Centre d'étude et de Recherche des macromolécules Végétales
DEAE	: diéthyl amino éthyl
DMSO	: diméthylsulfoxyde
ES	: électrospray
eV	: électron Volt
FAB	: fast atom bombardment (bombardement par atomes accélérés)
Gal	: galactose
GalUA	: acide galacturonique
GC/MS	: couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse
GC/MS/MS	: couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse en tandem
Glc	: glucose
GlcUA	: acide glucuronique
Hex	: hexose
HexUA	: acide hexuronique
IFREMER	: Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la MER
MALD	: désorption-ionisation par laser assistée par matrice
Man	: mannose
MHDP	: méta-hydroxydiphényle
Me	: méthyle
MOPS	: acide 3-[N-morphopholino]propanesulfonique
MS	: spectrométrie de masse
MS/MS	: spectrométrie de masse en tandem
RMN	: résonance magnétique nucléaire

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
GENERALITES	
1. LE MILIEU HYDROTHERMAL.	2
1.1. Historique.	2
1.2. Localisation.	2
1.3. Processus de l'hydrothermalisme et caractéristiques physico-chimiques de l'écosystème.	4
1.4. La macrofaune associée.	6
1.5. La microfaune associée.	8
2. LES POLYSACCHARIDES BACTERIENS.	10
2.1. Localisation et composition des polysaccharides bactériens.	10
2.1.1. <i>Les polysaccharides de la paroi cellulaire.</i>	10
2.1.2. <i>Polysaccharides capsulaires et ''slime''.</i>	12
2.2. Exopolysaccharides et bactéries marines.	14
2.2.1. <i>Introduction.</i>	14
2.2.2. <i>Mécanisme d'adhésion des bactéries marines.</i>	14
2.3. Propriétés et intérêts industriel des polysaccharides bactériens.	15
2.3.1. <i>Introduction.</i>	15
2.3.2. <i>Propriétés rhéologiques.</i>	15
2.3.3. <i>Polysaccharides utilisés pour leurs propriétés épaississantes.</i>	17
2.3.4. <i>Polysaccharides utilisés pour leurs propriétés gélifiantes.</i>	18
2.3.5. <i>Conclusion.</i>	19
3. ANALYSE STRUCTURALE DES POLYSACCHARIDES CONTENANT DES ACIDES URONIQUES.	20
3.1. Caractérisation des acides uroniques.	20
3.1.1. <i>Identification.</i>	20
3.1.2. <i>Quantification.</i>	21

3.2. Préparation des oligosaccharides.	24
3.2.1. <i>Hydrolyse partielle.</i>	24
3.2.2. <i>La photolyse.</i>	25
3.2.3. <i>Dégradation par le lithium dissous dans l'éthylène diamine.</i>	25
3.2.4. <i>Réaction de β-élimination des acides uroniques.</i>	26
3.2.5. <i>La décarboxylation oxydative.</i>	28
3.2.6. <i>La Dégradation de Hofmann.</i>	30
3.3. RMN des oligosaccharides.	32
3.4. Spectrométrie de masse des oligosaccharides.	33
3.4.1. <i>Les techniques d'ionisation.</i>	33
3.4.2. <i>Les analyseurs.</i>	38
3.4.3. <i>La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).</i>	40
3.5. La perméthylation .	43
3.5.1. <i>La réaction de perméthylation.</i>	43
3.5.2. <i>Les méthodes de clivage de la liaison glycosidique.</i>	45
3.5.3. <i>Le couplage GC/MS (EI-CI).</i>	

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. CULTURE DES BACTERIES ET ISOLEMENT DU POLYSACCHARIDE

1644.	54
-------	----

2. PURIFICATION DU POLYSACCHARIDE.

2.1. Chromatographie d'échange d'ions.	57
2.2. Chromatographie de gel filtration.	59

3. CARACTERISATION PRELIMINAIRE DU POLYSACCHARIDE.

3.1. Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.	61
3.2. Détermination de la configuration absolue des monosaccharides.	63

4. DETERMINATION STRUCTURALE DU MONOSACCHARIDE INCONNU.	65
4.1. Isolement.	65
4.2. Etude structurale.	65
5. CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDES ISSUS DE L'HYDROLYSE PARTIELLE.	
5.1. Préparation des oligosaccharides.	73
<i>5.1.1. Hydrolyse partielle.</i>	73
<i>5.1.2. Séparation des oligosaccharides.</i>	75
5.2. Analyse des oligosaccharides.	77
<i>5.2.1. Analyse par spectrométrie de masse.</i>	77
<i>5.2.2. Détermination de la composition en monosaccharides.</i>	78
6. MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE POUR L'ANALYSE STRUCTURALE D'OLIGOSACCHARIDES COMPOSES D'ACIDES URONIQVES.	80
6.1. Dérivation.	81
<i>6.1.1. Dérivation par amination réductive.</i>	81
<i>6.1.2. Conversion des acides uroniques en hexoses.</i>	83
6.2. Analyse des dérivés perméthylés par spectrométrie de masse en tandem.	86
6.3. Détermination des liaisons interglycosidiques.	93
6.4. Analyse RMN des oligosaccharides.	110
6.5. Conclusion.	118
7. D'ANALYSE DES ETHYLGLYCOSIDES PERMETHYLES.	121
7.1. Méthodologie.	121
7.2. Analyse.	125
<i>7.2.1. CI/MS des éthylglycosides perméthylés.</i>	125
<i>7.2.2. Analyses MS/MS des mono(tridéutéroéthyl)-tris-méthyl-éthylglycosides.</i>	127
<i>7.2.3. L'additivité.</i>	133
<i>7.2.4. Application à l' oligosaccharide E issus du polysaccharide 1644.</i>	135
<i>7.2.5. Analyse du monosaccharide en position terminale réductrice.</i>	139

7.3. Conclusion.	143
CONCLUSION GENERALE	145
MATERIEL ET METHODES	
1. CULTURE DES BACTERIES ET ISOLEMENT DU POLYSACCHARIDE	
1644.	147
1.1. Matériel Biologique.	147
1.2. Production d'exopolysaccharide.	147
1.3. Extraction du polysaccharide.	147
1.4. Purification du polysaccharide.	147
<i>1.4.1. Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE Trisacryl.</i>	147
<i>1.4.2. Chromatographie de gel filtration.</i>	148
2. SPECTROMETRIE DE MASSE.	148
2.1 Analyse des monosaccharides dérivés par GC/MS.	148
2.2. Analyse des oligosaccharides dérivés par GC/MS/MS.	149
2.3. Analyse des oligosaccharides natifs par spectrométrie de masse en mode d'ionisation FAB.	149
2.4. Analyse des oligosaccharides dérivés par MALDMS.	149
2.5. Analyse des oligosaccharides dérivés par ESMS/MS.	150
3. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES OLIGOSACCHARIDES.	150
4. CARACTERISATION DES MONOSACCHARIDES.	151
4.1. Identification et dosage des monosaccharides par colorimétrie.	151
<i>4.1.1. Dosage des oses neutres selon la méthode à l'orcinol sulfurique de Tillmans et Philippi (1929) modifiée par Rimington (1931).</i>	151
<i>4.1.2. Dosage des acides uroniques.</i>	152
4.2. Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.	153
<i>4.2.1. Identification et dosage des monosaccharides sous forme de méthylglycosides triméthylsilylés.</i>	153

4.2.2. <i>Identification et dosage des monosaccharides sous forme de polyols acétates.</i>	154
4.3. Détermination de la configuration absolue des monosaccharides.	154
5. CONVERSION DES ACIDES URONIQUES EN HEXOSES.	155
5.1. Conversion des acides uroniques présents dans un oligosaccharide.	155
5.2. Conversion des acides uroniques présents dans le polysaccharide 1644.	155
6. METHYLATION.	156
6.1. Méthylation des oligosaccharides.	156
6.2. Méthylation du polysaccharide 1644 réduit.	156
6.3. Analyse des produits de méthylation.	157
7. CARACTERISATION DU MONOSACCHARIDE DE STRUCTURE INCONNUE.	157
7.1. Isolement du monosaccharide de structure inconnue.	157
7.2. Désalkylation du disaccharide contenant le monosaccharide de structure inconnue.	158
7.3. Synthèse du 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucose et du 3-O-[(S)-1-carboxyéthyl]-D-glucose (Kochetkov <i>et al.</i>, 1979).	159
8. ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES ISSUS DU POLYSACCHARIDE 1644.	159
8.1. Isolement des oligosaccharides.	159
8.2. Amination réductive des oligosaccharides et conversion des acides uroniques en hexoses deutérés.	160
9. PREPARATION DES ETHYLGLYCOSIDES PERMETHYLES, SELECTIVEMENT DEUTEROMETHYLES.	161
BIBLIOGRAPHIE	162

INTRODUCTION

L'écosystème hydrothermal profond découvert en 1977 représente par ses caractéristiques particulières (températures et pressions hydrostatiques élevées, milieu acide, forte concentration en métaux lourds) un champ d'investigation privilégié pour la découverte de souches bactériennes productrices de nouvelles substances, notamment de polysaccharides originaux.

L'expédition «Hydronaute» de décembre 1987 organisée par l'IFREMER (Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer) afin d'étudier un site hydrothermal profond du Pacifique a permis d'isoler la bactérie *Alteromonas sp.* 1644. Cette bactérie produit un polysaccharide possédant des propriétés rhéologiques originales. Notamment, il forme en présence de calcium des gels visco-élastiques extrêmement résistants (Bozzi *et al.*, 1996 a et b).

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du Groupement De Recherche BACTOCEAN du CNRS dont l'une des thématiques est la valorisation de polysaccharides microbiens provenant du milieu hydrothermal profond. Etant donnée la valorisation potentielle du polysaccharide produit par la bactérie 1644, son étude structurale a été initiée au laboratoire.

Dans la première partie de ce mémoire, nous présenterons les caractéristiques du milieu hydrothermal ainsi que les polysaccharides bactériens. Les méthodes d'investigation structurale des polysaccharides possédant des acides uroniques seront ensuite discutées.

Les résultats obtenus concernant l'étude structurale du polysaccharide produit par la bactérie 1644 seront exposés dans la seconde partie. Nous présenterons tout d'abord la caractérisation d'un nouveau monosaccharide présent dans le polysaccharide : l'acide 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucuronique. Nous décrirons une nouvelle stratégie d'analyse des oligosaccharides contenant des acides uroniques obtenus après hydrolyse partielle du polysaccharide 1644. Enfin, nous proposerons une méthode de détermination des liaisons glycosidiques basée sur la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) des monosaccharides perméthylés comme alternative à l'analyse des alditols acétates partiellement méthylés.

GENERALITES

1. LE MILIEU HYDROTHERMAL.

1.1. Historique.

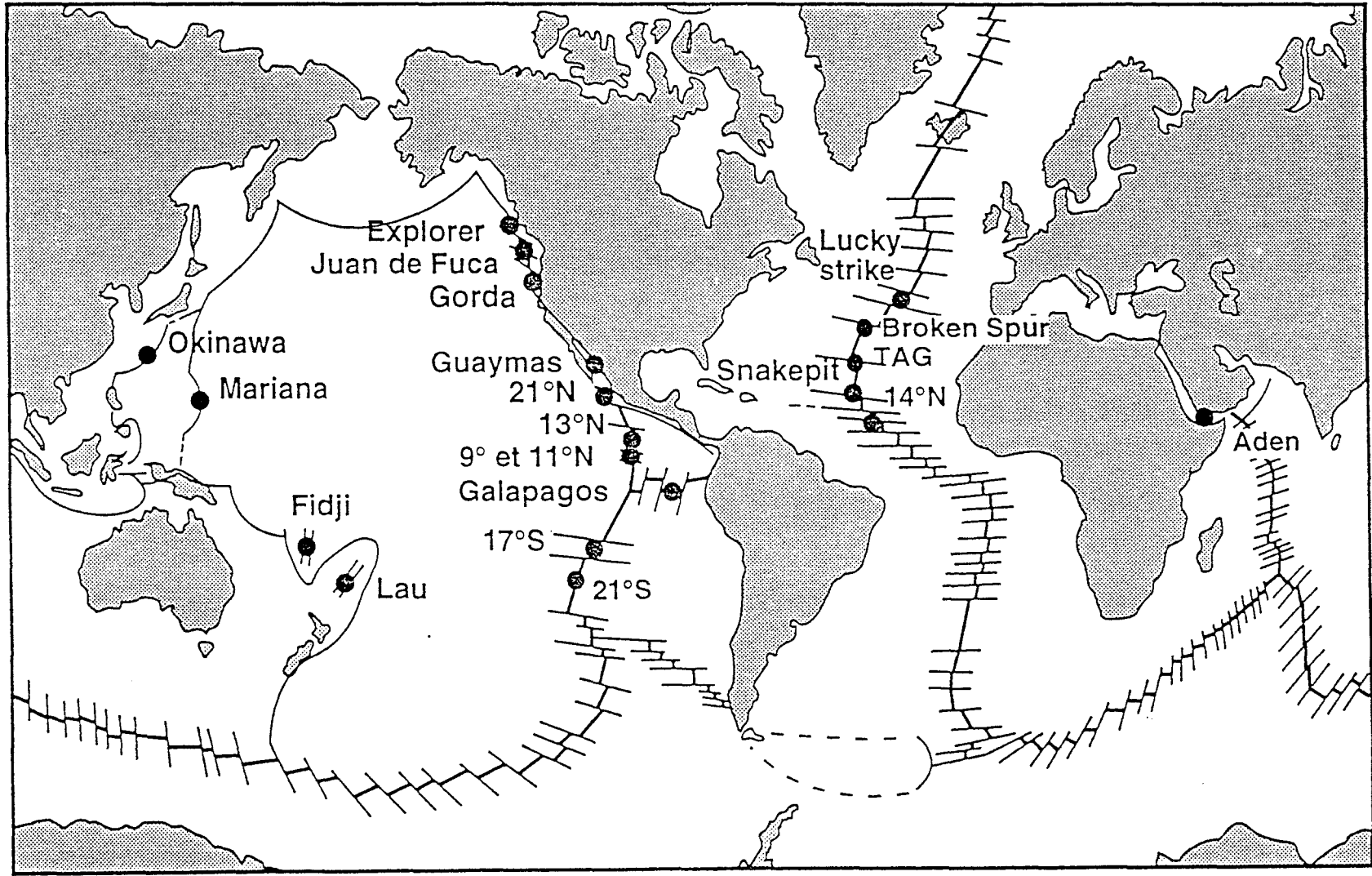
C'est au cours des années 1970 que des équipes de géologues mettent en évidence des anomalies de température au dessus des axes de propagation de la faille océanique des Galapagos, anomalies attribuées aux panaches d'eau chaude émis par les sources hydrothermales (Williams *et al.*, 1974 ; Klitgord et Mudie, 1974). Il faudra attendre les photographies prises lors de l'expédition des Pléiades (Lonsdale, 1977) pour révéler près des sources d'eau chaude, des peuplements particuliers (« gros coquillages de couleur blanchâtre ») en contraste avec les fonds océaniques inhabités. Un an plus tard, une équipe américaine (Corliss *et al.*, 1979), dotée du sous-marin Alvin effectue une série de plongées et rapporte les premiers échantillons de faune hydrothermale en particulier les spécimens des bivalves *Calytogenia magnifica* et *Bathymodiolus thermophilus* (les « coquillages blancs »), ainsi que de nombreuses photographies de sites au noms évocateurs : le Four aux Coquillages (Clam Bake), la roseraie (Rose Garden) et le Banc de Moules (Mussel Bed).

Depuis, de nombreuses expéditions sont régulièrement organisées par des équipes américaines, françaises, japonaises, russes et canadiennes afin d'étudier la microfaune et la macrofaune associées à cet écosystème hydrothermal (Laubier, 1989 ; Childress et Fisher, 1992). L'une de ces expédition nommée « Hydronaute » et organisée par l'IFREMER en 1987 est à l'origine de la découverte de la bactérie *Altéromonas sp.* 1644 qui excrète le polysaccharide constituant l'objet d'étude de ce travail.

1.2. Localisation.

Deux régions de l'océan sont principalement connues pour donner naissance à des phénomènes d'hydrothermalisme (Fig 1). La première est localisée dans le Pacifique Est. Elle a été explorée par plusieurs équipes américaines (Corliss *et al.*, 1979), françaises (Desbruyères *et al.*, 1982) et canadiennes (Tunnicliffe *et al.*, 1985). Les différents sites sont localisés du

Figure 1: Localisation des sites hydrothermaux.



large de Vancouver jusqu'au large de Lima : la faille de Fucas, le Bassin des Guayamas dans le golfe du Californie, les sites 13°N et 21°N, le site des Galapagos. La seconde localisation géographique se situe au niveau de la dorsale médio-atlantique (Rona *et al.*, 1986). D'autres sources hydrothermales profondes ont également été découvertes dans le Pacifique Ouest, comme le bassin des Mariannes (Hessler *et al.*, 1988) et le Bassin Nord-Fidjien. (Auzende *et al.*, 1989).

1.3. Processus de l'hydrothermalisme et caractéristiques physico-chimiques de l'écosystème.

Géochimie.

L'activité hydrothermale est une conséquence directe de la formation de la croûte océanique nouvelle. Là où deux plaques s'écartent, le magma remonte à une température de 1200°C et s'élève au niveau du plancher océanique. Il forme alors une croûte très perméable à travers laquelle l'eau de mer s'infiltré jusqu'à atteindre le basalte chaud, à plusieurs kilomètres de profondeur. Cette eau s'acidifie, s'enrichit en éléments métalliques et forme des précipités minéraux avant de remonter vers le plancher océanique. Au contact de l'eau de mer froide environnante à 2°C, les fluides hydrothermaux émis entraînent des précipitations de sulfures métalliques et de sulfate de calcium, formant des cheminées d'où ils s'échappent (Edmond *et al.*, 1982 ; Edmon et Von Damm, 1983). Selon le degré de mélange avec l'eau de mer avant leur émission, les fluides hydrothermaux présentent des caractéristiques physico-chimiques différentes d'une source à l'autre, et ce pour un même site. Cependant, ils se distinguent nettement de l'eau de mer environnante par un pH faible, de fortes concentrations en gaz dissous (H₂S, CH₄, CO, CO₂, H₂) et en métaux (Si, Fe, Mn, Zn).

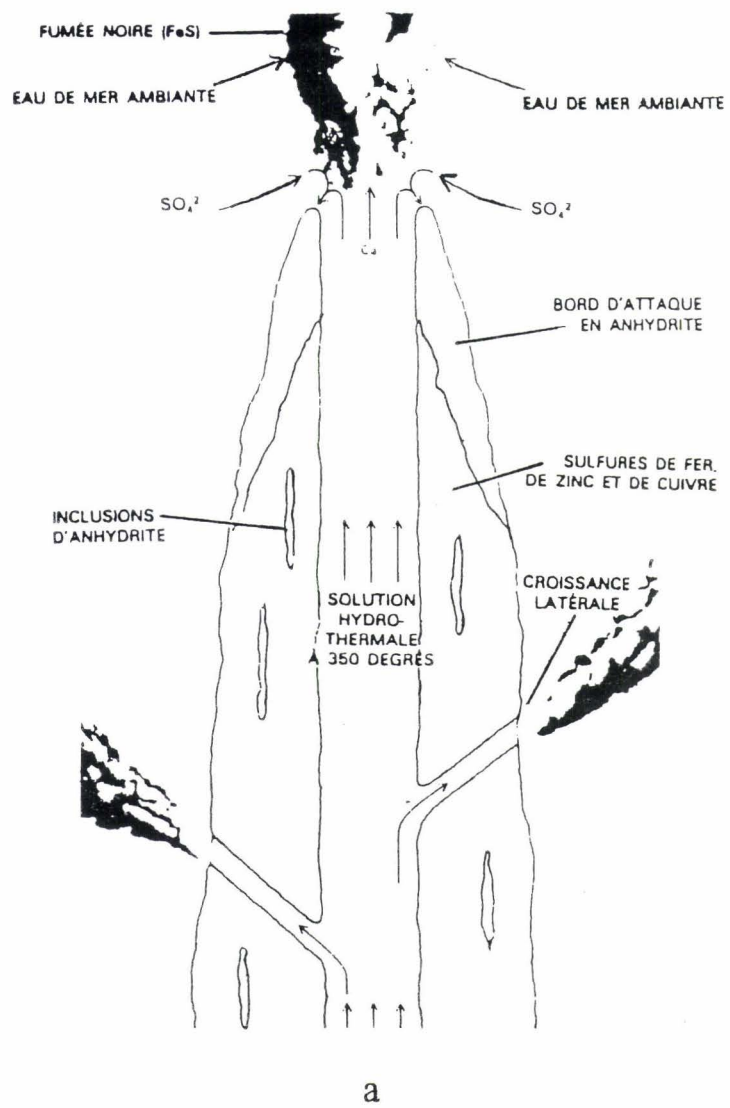


Figure 2: (a) Schéma d'un fumeur noir (Edmon et Von Damm, 1983). (b) Photographie d'un fumeur noir (cliché IFREMER).

Deux types de formations minérales (cheminées) peuvent être distinguées. Les fumeurs noirs sont des cheminées de sulfure de cuivre d'où s'échappe le fluide à une température de 350°C (Fig. 2). Les fumeurs blancs sont des diffuseurs de sulfure de zinc, qui émettent le fluide à une température inférieure à 100-150°C.

La pression.

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

La température.

Le fluide hydrothermal est émis au niveau des cheminées à une température voisine de 350°C et se mélange à l'eau de mer à 2°C. Le mélange induit la formation d'un gradient de température sur quelques dizaines de mètres, et différentes catégories d'organismes se développent de façon concentrique autour des cheminées, en fonction de leur tolérance vis-à-vis de la composition et de la température de l'eau.

1.4. La macrofaune associée.

A l'approche d'un site hydrothermal, on rencontre des peuplements animaux remarquables par leur taille mais aussi par leur biomasse qui peut atteindre 10 kg par m² (Hessler et Smithey, 1983), alors que ces valeurs varient de 0,1 à 10 g par m² à des profondeurs équivalentes au niveau de la plaine océanique.

Deux assemblages faunistiques peuvent être distingués au niveau des sites d'hydrothermalisme.

Les vestimentifères (*Riftia pachyptila*) et les bivalves (*B. thermophilus*) dominent avec des biomasses de l'ordre de 8.5 Kg par m², dans un habitat froid inférieur à 20°C. *R. pachyptila* est une espèce qui forme de véritables buissons dont la hauteur peut atteindre 1,50 m et la densité de 100 à 200 individus/m² (Desbruyères, 1984). L'animal vit dans un tube d'où émerge un panache branchial très vascularisé.

La famille des Alvinellidae domine quant-à elle au niveau des sites à haute température avec des biomasses de l'ordre de 2,4 kg par m² (Fustec *et al.*, 1988). Elle comprend le genre *Paralvinella* et le genre *Alvinella* qui possède deux espèces : *caudata* et *pompejana*. Ces deux espèces vivent dans un habitat relativement chaud (20° à 40°C) à l'intérieur des tubes sur les parois des fumeurs blancs, et parfois celle des fumeurs noirs. La température aux deux orifices du tube est généralement d'environ 20°C alors qu'à 10 cm dans la paroi du fumeur, où se situe le point d'attachement du tube, elle est de 100°C (Desbruyères et Laubier, 1986). Au fur et à mesure que l'édifice à haute température se construit, les vers colonisent spécifiquement les parois suffisamment épaisses et colmatées pour réduire la température du fluide de surface vers 40°C. Lorsque la minéralisation réduit l'approvisionnement en fluide hydrothermal à des niveaux critiques, les vers quittent leurs tubes et en construisent un à un autre endroit de l'édifice.

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

Lonsdale (1977) a proposé deux hypothèses pour répondre à cette question :

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

La seconde fait intervenir, étant donnée l'impossibilité de photosynthèse à des profondeurs de 2500 m, des bactéries chimiosynthétiques comme premier maillon de la chaîne alimentaire.

Les travaux de Rau (1981), passent par l'analyse des isotopes stables du carbone et montrent que les vestimentifères se nourrissent de bactéries produites localement ; ils étayent la seconde hypothèse.

1.5. La microfaune associée.

Localisation de la population bactérienne.

La concentration en cellules bactériennes dans l'eau peut varier de 10^1 à 10^6 cellules par ml (Wirsen *et al.*, 1986). Mais cette biomasse d'eau libre est sans doute insuffisante pour assurer la nutrition de tout l'écosystème (Prieur *et al.*, 1987). En fait, toutes les surfaces du milieu hydrothermal sont colonisées par la flore bactérienne. Cette colonisation peut se présenter sous la forme d'un tapis blanchâtre recouvrant les surfaces inertes. Mais elle se retrouve aussi associée à pratiquement tous les invertébrés des milieux hydrothermaux. Cette association est claire dans le cas du vestimentifère *Riftia pachyptila* qui est dépourvu de tractus digestif (Prieur, 1988). En ce qui concerne l'annélide polychète *Alvinella pompejana*, pourvu d'un tractus digestif, la microfaune associée interviendrait dans un processus de détoxification, car elle est adaptée à la forte concentration en métaux lourds que l'on retrouve au niveau des fumeurs noirs (Prieur *et al.*, 1990).

Caractéristiques métaboliques des bactéries hydrothermales.

De façon générale, la population bactérienne est caractérisée par sa barophilie. Elle comprend en majorité des bactéries autotrophes sulfo-oxydantes qui utilisent les composés soufrés réduits en tant que source d'énergie. Elle présente aussi une population bactérienne hétérotrophe associée aux invertébrés dont la présence peut s'expliquer par le fait qu'une

biomasse animale importante produit de la matière organique susceptible d'être dégradée (Prieur, 1988).

Bactéries mésophiles et thermophiles.

Les températures permettant la croissance des différents souches bactériennes sont en rapport avec les températures des sites hydrothermaux. On retrouve des souches mésophiles souvent associées aux invertébrés et qui semblent adaptées aux brusques gradients thermiques (5 à 50°C) (Prieur, 1988). On trouve également une communauté bactérienne thermophile avec des optimum de croissance de 100°C à pression atmosphérique normale. Celle-ci est alors associée aux particules du fluide hydrothermal (Prieur, 1992).

2. LES POLYSACCHARIDES BACTERIENS.

2.1. Localisation et composition des polysaccharides bactériens.

Indépendamment de la souche bactérienne, les polysaccharides sont classés en fonction de leur localisation au sein de la cellule (Sutherland, 1972) :

- Les polysaccharides intracellulaires
- Les polysaccharides faisant partie de l'enveloppe bactérienne
- Les polysaccharides exocellulaires, situés à l'extérieur de l'enveloppe bactérienne, sous forme de capsule ou de « slime ».

Dans ce chapitre, nous présenterons uniquement les polysaccharides faisant partie de l'enveloppe de la bactérie et les polysaccharides exocellulaires.

2.1.1. Les polysaccharides de l'enveloppe bactérienne.

En fonction de la capacité des bactéries à fixer le violet de gentiane, celles-ci sont classées en deux grands groupes : bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. Cette propriété repose sur la différence de structure de leurs enveloppes.

L'enveloppe des bactéries à Gram positif se caractérise par la présence d'un constituant majeur, le peptidoglycane ou muréine, qui est une molécule complexe formée par la répétition d'une unité de base composée d'un disaccharide (- 4 GlcNac β 1-4 MurNac β 1-) et d'un térapeptide responsable de la réticulation. Chez les bactéries à Gram positif la muréine forme une couche épaisse de 15 à 80 nm et elle est associée à un autre type de polymère, les acides teïchoïques, qui sont constitués de glycérol ou de ribitol reliés par des liaisons phosphodiester. La muréine joue un rôle principal dans le maintien de l'intégrité structurale de la cellule. De par sa rigidité, elle donne sa forme à la cellule et lui permet de résister aux pressions osmotiques.

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif possède quant-à elle une membrane externe qui entoure la fine paroi de peptidoglycane (2nm) (Fig. 3). Bien que présent en moindre

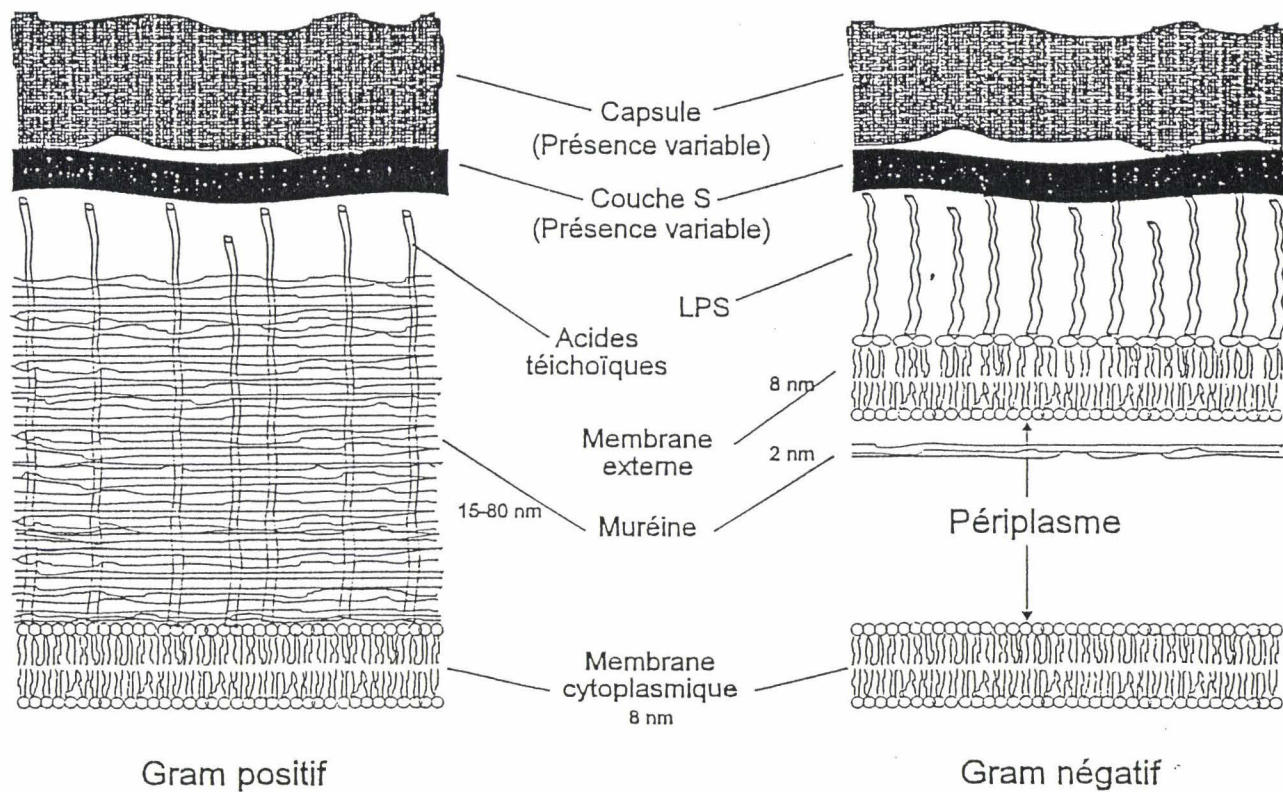


Figure 3: Comparaison de la structure des enveloppes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

quantité, le peptidoglycane joue toujours un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale de la cellule. La membrane externe est en fait une bicouche lipidique asymétrique constituée de protéines, de phospholipides sur la face interne et de lipopolysaccharides sur la face externe (Whitfield et Valvano, 1993). Les lipopolysaccharides (LPS) constituent un autre type de molécule possédant un polymère glucidique. Ces LPS sont constitués de trois régions : La première correspond au lipide A qui renferme un noyau disaccharidique (GlcNac β 1-6 GlcNac) 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 phosphoesters.

Le « core » constitue la seconde région. Il est lié au lipide A par l'intermédiaire d'une molécule de KDO ou acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique et se compose d'un enchaînement de monosaccharides dont des heptoses (L-glycéro-D-manno-heptose). On note la présence de groupements phosphates et phosphoéthanolamines. La structure du core est variable d'une souche bactérienne à l'autre.

La troisième région, correspondant à 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 répétitives dont le nombre varie de 1 à 30. Elle comporte des sucres particuliers (paratose, abéquose, tyvélose) mais aussi des substituants non glucidiques (acétates, pyruvates) (Kenne et Lindberg, 1983).

2.1.2. Polysaccharides capsulaires et "slime".

Les polysaccharides exocellulaires peuvent être produits à la fois par des bactéries à Gram positif et par des bactéries à Gram négatif. Il sont liés de façon covalente à la cellule comme une véritable *capsule* ou excrétés à l'état libre dans le milieu de culture sous forme de "slime". Ces polysaccharides sont répertoriés en deux classes selon leur structure (Sutherland, 1972).

Les homopolysaccharides constituent la première. Ils ne renferment qu'un seul type de monosaccharide. Ils sont appelés glucanes lorsqu'ils sont uniquement constitués de glucose et levans s'ils sont uniquement constitués de fructose. Parmi les homopolysaccharides les plus utilisés, il faut citer la cellulose (Glc β 1-4) bactérienne sécrétée par *Acetobacter xylinum* (Lin *et al.*, 1985.), les dextrans (Glc α 1-6) synthétisés par *Leuconostoc mesenteroides* (Sutherland, 1972) et le curdlan (Glc β 1-3) synthétisé par *Agrobacterium radiobacter* (Phillips et Lawford, 1983).

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 et ils forment chez les bactéries à Gram négatif les antigènes K. Outre les hexoses neutres et les acides hexuroniques, leur composition révèle la présence de nombreux monosaccharides particuliers : sucres méthylés, aminés, carboxyéthylés (Kenne et Lindberg, 1983), et aussi des substituants tels que l'acétate, le phosphate, le succinate, le pyruvate. Leur structure est indépendante de celle des LPS. 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 la capacité des polysaccharides à former une barrière entre la bactérie et le milieu extérieur, ainsi que leurs propriétés d'adhésion sur un support (Sutherland, 1983). D'autre part, les séquences de ces polymères sont responsables de phénomènes de reconnaissance spécifique dans les associations *Rhizobium*-légumineuse (Tsien et Schmidt, 1981), et bactérie-bactériophage (Lindberg, 1973).

2.2. Exopolysaccharides et bactéries marines.

2.2.1. Introduction.

Les bactéries marines peuvent se développer en eau libre, sur des surfaces inanimées ou sur des organismes vivants. La colonisation de ces deux derniers biotopes nécessite, de la part de la bactérie, la production de molécules qui vont lui permettre de se fixer. Les molécules permettant ces phénomènes d'adhésion sont en majorité des polysaccharides acides extracellulaires (Corpe, 1970). Ces molécules forment ce que l'on appelle un « glyco-calix » qui est constitué d'un réseau macromoléculaire de fibres de nature polysaccharidique s'allongeant à partir de la surface bactérienne. Cependant, d'autres molécules appartenant à la capsule, aux pilis ou aux flagelles ne sont pas à négliger (Kjelleberg, 1984). La formation d'un « glyco-calix » représente la capacité d'adaptation de la bactérie à son milieu. Le « glyco-calix » pourrait aussi servir de réservoir alimentaire car les fibres polysaccharidiques chargées négativement ont la capacité de fixer des ions et des molécules nutritives qui seront gardés en réserve.

2.2.2. Mécanisme d'adhésion des bactéries marines.

Deux types d'adhésions sont distingués (spécifique / non spécifique).

L'adhésion microbienne non spécifique fait intervenir les macromolécules de nature glucidique à la surface du micro-organisme qui vont interagir avec une surface donnée ou bien avec des macromolécules présentes sur cette surface. Ce phénomène met en jeu de nombreux types de liaisons : ponts hydrogène, liaisons hydrophobes (Marshall et Cruickshank, 1973), liaison de coordination avec des cations (Maroudas, 1975). Uhlinger et White (1983) ont mis en évidence chez *Pseudomonas atlantica* un exopolysaccharide composé de Glc, Gal, Man et GalUA qui lui permettait de s'attacher fermement à des surfaces telles que le verre, le plastique ou le métal. La composition de ce polysaccharide se modifierait en fonction de la croissance de la bactérie. Les auteurs montrent aussi que la colonisation par des organismes comme les

algues filamenteuses est plus rapide quand les surfaces sont imprégnées par le polysaccharide excrété par *P. atlantica* que lorsque les surfaces sont vierges.

Une adhésion spécifique a aussi été démontrée. En effet les bactéries possèdent à leur surface et principalement dans leurs pili, des récepteurs appelés adhésines, qui constituent des lectines endogènes ayant la capacité de se lier de manière spécifique à des molécules glucidiques réceptrices se trouvant dans les membranes de leurs cellules cibles (Jones, 1977).

2.3. Propriétés et intérêt industriel des polysaccharides bactériens.

2.3.1. Introduction.

L'utilisation des polysaccharides microbiens est restée faible en regard de celle des polysaccharides végétaux comme l'amidon ou les dérivés cellulosiques qui ont permis de répondre, par leur abondance et la diversité de leurs propriétés à l'état naturel ou modifié, aux besoins des industries papetières, textiles, alimentaires et autres.

Cependant, les polysaccharides bactériens connaissent actuellement un réel développement comparativement aux polymères végétaux, qui peut s'expliquer par les facteurs suivants :

- Ils sont obtenus de façon reproductible et leur production est indépendante des conditions climatiques ou de récolte, par exemple.
- Leur structure chimique et moléculaire et donc leurs propriétés, peuvent être modifiées par des techniques de sélection de souche ou de génie génétique.
- Ils sont aussi biodégradables.

2.3.2. Propriétés rhéologiques.

L'intérêt industriel des polysaccharides réside précisément dans leurs interactions spécifiques avec l'eau. Ce sont des polymères hydrosolubles qui peuvent épaissir, stabiliser ou gélifier une solution. Tous ont la propriété d'augmenter la viscosité à faible concentration. Suivant leur utilisation, ils peuvent être classés en agents épaississants ou gélifiants.

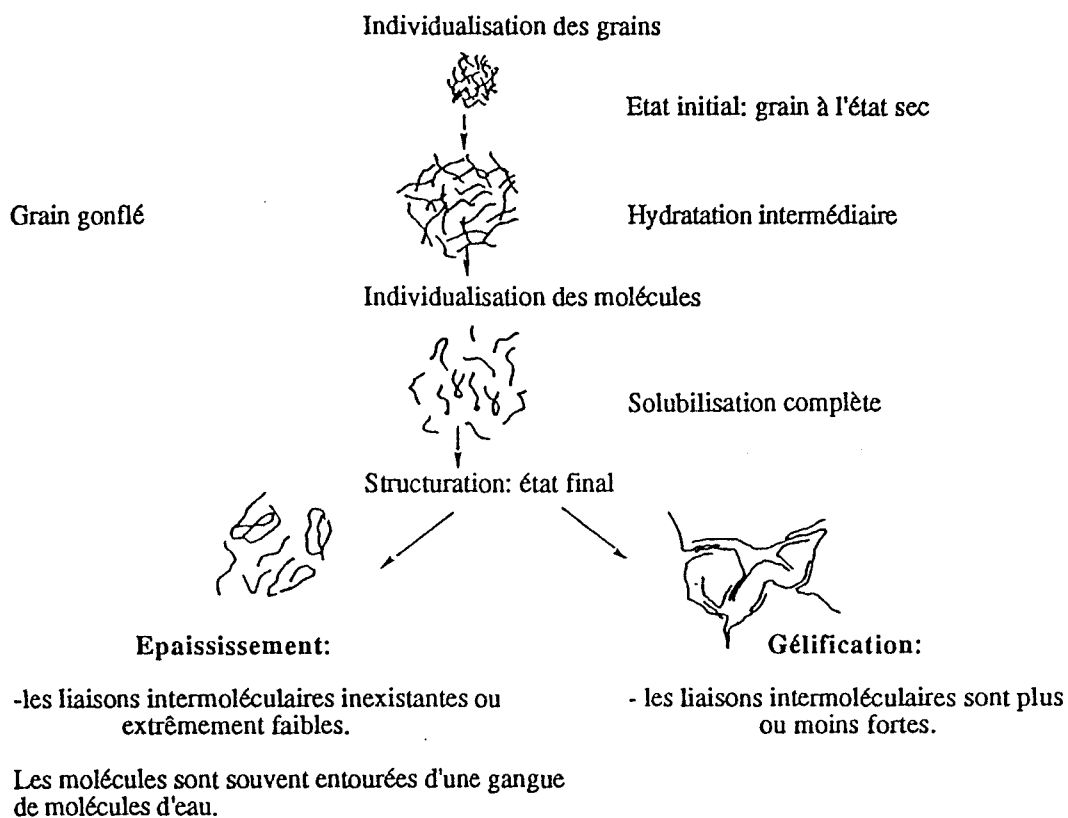


Figure 4: Schéma des mécanismes d'épaississement et de gélification (Maury et Roque, 1986)

Une troisième catégorie regroupe ceux qui ont des applications spécifiques comme les dextrans ou les pullulanes. Dans le cas d'un épaississant, les liaisons intermoléculaires sont quasiment inexistantes et les molécules sont isolées et dispersées dans le solvant (Fig. 4). Dans le cas d'un gel, les liaisons intermoléculaires sont plus ou moins fortes et un réseau tridimensionnel se forme pouvant contenir jusqu'à 99% d'eau (Fig. 4). Des facteurs structuraux influencent l'état du gel. Ainsi, un polysaccharide de structure uniforme présentera de grandes zones de jonction et donnera un gel rigide et cassant, alors que ceux à structure irrégulière donneront des gels élastiques (Maury et Roque, 1986).

2.3.3. Polysaccharides utilisés pour leurs propriétés épaississantes.

Parmi les polysaccharides utilisés pour leurs propriétés épaississantes, le plus connu et le plus développé est le xanthane, produit par *Xanthomonas campestris*, bactérie pathogène du chou. C'est un hétéropolysaccharide constitué de deux résidus de mannose, deux résidus de glucose, d'un résidu d'acide glucuronique et de substituants acétates et pyruvates. Sa masse moléculaire ainsi que le nombre de substituants peuvent varier selon la souche productrice utilisée (Sutherland, 1986). C'est un bon épaississant : il possède une grande viscosité à faible concentration, est compatible avec des solutions de sels à grande concentration et résiste assez bien aux changements de température. C'est un excellent stabilisant des émulsions et des mousses. Le xanthane peut aussi former des gels en synergie avec certains galactomannanes. Ce polymère est largement utilisé dans des secteurs industriels aussi variés que l'alimentaire, la peinture, les explosifs ou les cosmétiques.

Nous pouvons encore citer comme épaississant le zanflo (Cottrell, 1980) qui est utilisé pour l'industrie de teinture en raison de sa compatibilité avec les colorants cationiques.

Le rhamsane est un épaississant qui possède une plus forte stabilité au cisaillement que le xanthane. Sa grande compatibilité avec les sels tels que les polyphosphates d'ammonium en fait

un agent de suspension pour les pesticides et les fertilisants largement utilisé dans le domaine de l'agriculture (Colegrove, 1983).

2.3.4. Polysaccharides utilisés pour leurs propriétés gélifiantes.

Parmi les polysaccharides utilisés pour leurs propriétés gélifiantes, nous pouvons tout d'abord citer le gellane, polysaccharide anionique excrété par *Pseudomonas elodea*. Ses propriétés gélifiantes en présence d'ions magnésium sont dues aux groupements acétyles. Il forme un gel cassant lorsqu'il y a peu de groupements acétyles ou un gel élastique sous sa forme non désacétylée. Le gellane est utilisé en microbiologie pour préparer des milieux de culture.

Le curdlan produit par *A. radiobacter* est un polysaccharide neutre qui forme des gels thermiquement irréversibles, plus élastiques que l'agar, très résistants à la congélation et décongélation.

L'alginate bactérien synthétisé par la bactérie *Azobacter vinelandii* (Jarman *et al.*, 1978) vient concurrencer l'alginate extrait d'algues marines. Les propriétés, identiques à celles de l'alginate marin, sont celles d'un gel (gélification en présence de calcium) utilisé principalement dans l'industrie alimentaire. Toutefois, le produit obtenu par synthèse bactérienne est actuellement plus cher et sa synthèse encore mal maîtrisée. L'intérêt pourrait provenir de l'obtention d'un polymère où les rapports acide β -D-mannuronique / acide α -D-guluronique seraient maîtrisés et constants, contrairement à l'alginate extrait des algues marines.

2.3.5. Conclusion.

Pour résumer, les polymères bactériens sont utilisés dans les domaines suivants :

- L'alimentation, où ils sont utilisés comme gélifiants, épaississants, stabilisants, émulsifiants et même inhibiteurs de cristallisation en assurant une protection contre la formation de cristaux de glace.
- La médecine, où certaines substances sont employées comme immuno-stimulants.
- L'agriculture, où certains polysaccharides protègent les racines des arbres contre la dessiccation. Dans l'industrie des pesticides et des herbicides, ils jouent le rôle d'agent de suspension.
- Les polysaccharides peuvent enfin être utilisés comme absorbant dans le domaine des peintures, émulsifiant dans l'émail des céramiques, gélifiants dans le domaine des explosifs, liants et épaississant dans les produits cosmétiques.

Il va sans doute être difficile d'imposer de nouveaux polymères dans le futur. En effet, ceux-ci devront avoir des propriétés améliorées, être plus performants du point de vue de la stabilité à la température ou, devront présenter des propriétés nouvelles. En tout cas, leur qualité principale devra être un coût de production réduit. Cependant, des polysaccharides ayant des propriétés originales sont susceptibles d'apparaître, soit par isolement de nouvelles souches, soit par modification des souches existantes.

C'est dans ce contexte que se justifie l'analyse du polysaccharide 1644 qui possède des propriétés rhéologiques nouvelles

3. ANALYSE STRUCTURALE DES POLYSACCHARIDES CONTENANT DES ACIDES URONIQUES.

L'analyse structurale des polysaccharides nécessite souvent l'association de différentes méthodes physico-chimiques afin de déterminer la nature des monosaccharides constitutifs, leur position dans l'unité de répétition (lorsqu'elle existe), la nature des liaisons glycosidiques ainsi que leur isomérisation α ou β . Dans ce chapitre, nous présentons différentes techniques associées à l'étude des polysaccharides constitués d'acides uroniques.

3.1. Caractérisation des monosaccharides.

3.1.1. Identification.

Chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse des acides uroniques par chromatographie en phase gazeuse (CPG) est réalisée de façon classique après méthanolyse (Montreuil *et al.* 1986). Les méthylglycosides libérés sont rendus volatils par triméthylsilylation. L'identification des acides uroniques sur la base des temps de rétention peut être confirmée à l'aide de la spectrométrie de masse (Vanlaeke *et al.*, 1989; Saady et Blanke, 1990). Les chromatogrammes obtenus montrent les différents isomères des acides uroniques (les anomères α et β , ainsi que les formes lactones).

L'alternative consistant à libérer les monosaccharides par hydrolyse, les réduire et les peracétyler afin d'obtenir des polyols acétates ne peut être utilisée pour les acides uroniques. En effet la fonction carboxylique de ces derniers n'est pas dérivée et elle empêche toute chromatographie en phase gazeuse. Cependant, l'analyse des monosaccharides neutres, s'ils sont présents dans le polysaccharide, reste possible.

Chromatographie liquide haute performance.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) peut également être utilisée pour l'identification des acides uroniques libérés par hydrolyse à l'acide trifluoroacétique. Cette méthode utilise l'échange d'anions et présente l'avantage de ne donner qu'un pic par monosaccharide ce qui simplifie le chromatogramme. La chromatographie d'échange d'anions peut être réalisée sur des colonnes de type AX dans un tampon phosphate (KH_2PO_4) suivie d'une détection UV à 210 nm (Gacesa *et al.*, 1983). Cependant, une meilleure résolution et une plus grande sensibilité sont obtenues avec l'échange d'anions à haut pH couplée à la détection ampérométrique pulsée (Système Dionex). La colonne utilisée dans ce cas est une CarboPac PA1 et les solvants, des solutions de NaOH et NaOH/ CH_3COONa (Martens *et al.*, 1990 ; Whitfield *et al.*, 1991).

3.1.2. Quantification des acides uroniques.

Dosages colorimétriques

La stabilité de la liaison uronosidyle empêche la libération quantitative des acides uroniques et limite leur dosage par CPG ou HPLC. Un moyen de les doser est d'utiliser des méthodes colorimétriques.

Ce type de dosages consiste à chauffer les monosaccharides (en présence d'acide sulfurique) pour générer des dérivés du furfural plus communément appelés chromogènes. Le couplage de ces chromogènes à des dérivés du phénol donne des chromophores qui absorbent dans le visible.

Le dosage des acides uroniques peut aussi se faire selon la méthode de Dische (1947) en présence de carbazol-sulfurique, mais une correction est alors nécessaire car les oses neutres réagissent également avec ce réactif au carbazol (Spik, 1995). La méthode utilisant le méta-

hydroxydiphényl (MHDP) en présence de sulfamate permet d'éviter les interférences dues aux oses neutres (Blumenkrantz *et al.*, 1973; Filisetti-Cozzi et Carpita, 1991).

Ces différentes méthodes colorimétriques permettent le dosage des acides uroniques par rapport aux autres monosaccharides, mais n'autorisent pas l'identification de la nature des différents acides uroniques (acide glucuronique, acide galacturonique).

Réduction des acides uroniques.

Le dosage des acides uroniques peut être réalisé par les méthodes classiques d'analyse des monosaccharides neutres après réduction de la fonction carboxylique en alcool primaire. L'utilisation d'un borodutérure lors de la réduction permet de marquer de deux atomes de deutérium les hexoses provenant des acides uroniques et les rend identifiables par spectrométrie de masse.

Les différentes techniques de réduction reposent toutes sur le même principe, c'est-à-dire l'activation de la fonction acide puis sa réduction par un borohydrure alcalin. L'activation peut se faire par la formation de la lactone correspondante. La lactonisation s'effectue à pH 4.75 selon la figure 5 (Taylor et Conrad, 1972; York *et al.*, 1985). Le carbodiimide réagit avec la fonction carboxylique de l'acide uronique pour donner le dérivé A. En milieu acide, ce dérivé se réarrange en une lactone B ensuite réduite à pH 7 en un sucre neutre C. Il faut savoir que cette technique nécessite plusieurs cycles de réduction pour obtenir une réaction complète (Quintero *et al.*, 1989). L'activation de la fonction carboxylique peut également s'effectuer par estérification, avec une solution de méthanol chlorhydrique à froid (Fazio *et al.*, 1982), ou avec le diazométhane (Fontaine *et al.*, 1994). Dans les deux cas, le polysaccharide méthyl-estérifié est dialysé, lyophilisé et enfin réduit par un borohydrure de sodium à pH 7 et à 4°C. Dutton *et al.* (1986a) effectuent l'estérification des acides hexuroniques lors de la méthanolyse du

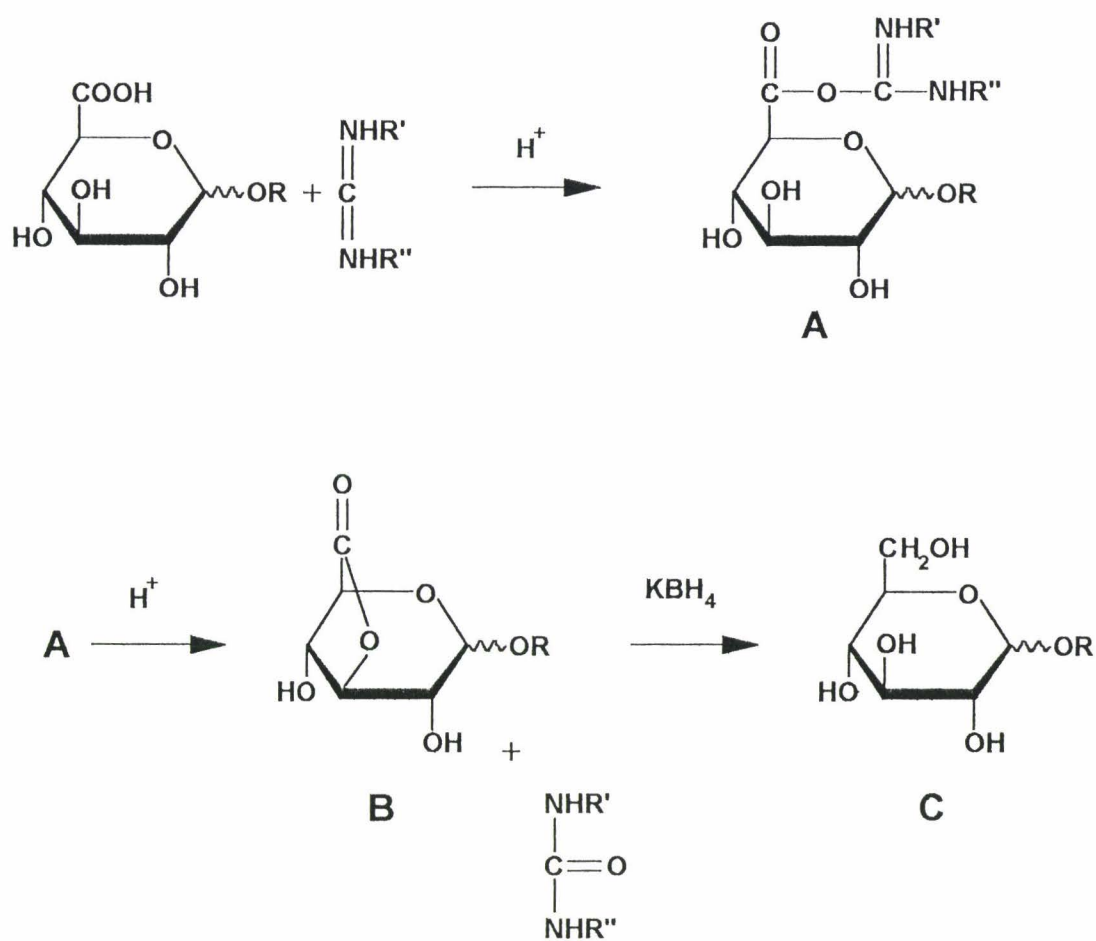


Figure 5: Schéma réactionnel de la réduction au carbodiimide.

polysaccharide, et la réduction dans le méthanol anhydre en présence de borohydrure de potassium. Après hydrolyse, on peut réaliser le dosage quantitatif de tous les monosaccharides.

3.2. Préparation d'oligosaccharides.

La méthode la plus simple et la plus efficace pour préparer des oligosaccharides 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 développée sur des exopolysaccharides de *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* grâce à des endoglycanases spécifiques produites par des bactériophages (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. Outre les méthodes classiques telles que l'oxydation périodique (Goldstein *et al.*, 1965; Angel *et al.*, 1987), les hydrolyses ménagées (Saeman *et al.*, 1954) et les différentes solvolyses qui permettent de générer des oligosaccharides, il existe des réactions de clivage sélectif des acides uroniques. Ces différentes techniques de rupture spécifique peuvent être réalisées sur le polysaccharide natif ou modifié.

3.2.1. L'hydrolyse acide partielle.

La stabilité chimique des liaisons impliquant des acides uroniques (Aspinall, 1982) leur confère une résistance parfois importante aux acides forts tels que l'acide chlorhydrique ou l'acide trifluoroacétique, et ce, même à température élevée. Une telle résistance à l'hydrolyse conduit à l'obtention de motifs oligosaccharidiques stables. Dans le plus simple des cas, c'est le disaccharide HexUA-Hex, appelé acide aldobiouronique, qui est facilement isolé et caractérisé (Fontaine, 1991).

3.2.2. La photolyse.

La radiation U.V. est connue et utilisée depuis longtemps pour la dégradation de polymères glucidiques neutres comme l'amidon et la cellulose (Phillips, 1963). Ce traitement, qui transforme les fonctions alcools en groupements carbonyles, est responsable de l'augmentation du pouvoir réducteur du polymère traité. A notre connaissance, les seuls exemples, d'irradiation UV d'un polysaccharide acide sont donnés par Mogilevkii *et al.* (1951) et Balazs *et al.* (1959). Les auteurs indiquent que l'irradiation UV d'une solution d'acide hyaluronique s'accompagne de la diminution de la viscosité et de l'augmentation du pouvoir réducteur de la solution, correspondant à une dégradation de l'acide glucuronique.

Cette technique est applicable à un autre type de molécule contenant des acides uroniques : les saponines. Les saponines sont des substances d'origine végétale ou échinodermique constituées d'une partie hydrophobe (correspondant à un triterpène ou à un stérol) et d'une partie hydrophile (composée d'un ou plusieurs oligosaccharides linéaires ou branchés reliés à l'aglycone sur un groupement hydroxyle ou une fonction carboxylique). Kitagawa *et al.* (1973) montrent que la photolyse réalisée dans une solution de méthanol est une façon très commode de libérer la chaîne glycanique si celle-ci est liée à l'aglycone par un acide glucuronique.

3.2.3. Dégradation par le lithium dissous 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 (1982). A partir de l'exopolysaccharide produit par *Rhizobium japonicum*, le lithium dissous dans l'éthylène diamine a permis d'obtenir un oligosaccharide correspondant à l'unité de répétition dépourvue de l'acide galacturonique contenu dans la chaîne principale. Une application systématique de cette technique à différents polysaccharides (Lau *et al.* 1987a; Lau *et al.*, 1987b) montre que le lithium provoque une rupture sélective de la liaison uronosidyle et la libération des substituants en 2 et 4 de l'acide

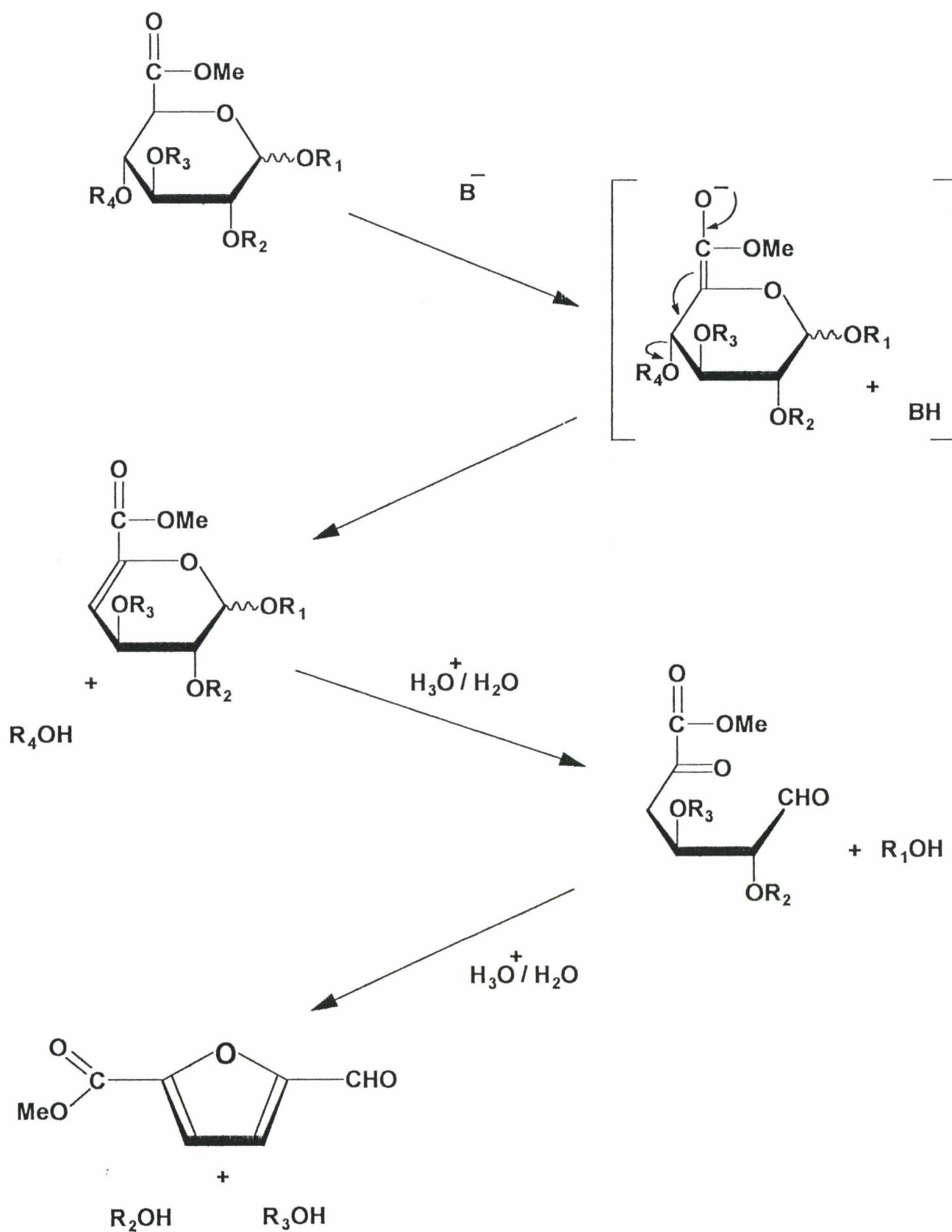
uronique. Cette étude met également en évidence l'élimination des substituants non glucidiques tels que les acétates et les pyruvates, phénomène logique en milieu basique. Concernant la substitution en 3 de l'acide galacturonique, Lau *et al.* (1987a) montrent que le substituant reste lié sur le résidu d'acide uronique, ce qui est en contradiction avec les résultats de Mort et Bauer (1982).

Le mécanisme réactionnel de dégradation des acides uroniques par le lithium n'est pas connu. Toutefois, le lithium en solution dans l'ammoniaque ou dans une alkylamine est un réducteur des fonctions carboxyliques (Burgstahler *et al.*, 1963; Smith *et al.*, 1967). Cette méthode est surtout utilisée pour la préparation d'oligosaccharides natifs. Cependant, elle doit être employée avec précaution car l'analyse d'oligosaccharides obtenus après action du lithium sur un polysaccharide de la cyanobactérie *Mastigocladus laminosus*, a montré la formation de produits secondaires provenant de la condensation d'oligosaccharides libérés au cours de la réaction (Gloaguen *et al.*, 1996).

3.2.4. Réaction de β -élimination des acides uroniques.

Une fonction carbonyle, ester ou amide constitue un centre électroattracteur, qui, en présence d'une base, permet une réaction de β -élimination.

Cette réaction peut être appliquée aux acides uroniques d'un polysaccharide (Lawson *et al.*, 1969; Mc Cleary *et al.*, 1967). De cette façon, le méthoxyde de sodium dans le méthanol dégrade les esters méthyliques des acides uroniques et libère le substituant en 4. Cette technique de β -élimination a été détaillée par l'équipe de Lindberg (Lindberg *et al.*, 1973; Curvall *et al.*, 1975; Lindberg *et al.*, 1976). Ces auteurs proposent le mécanisme réactionnel décrit dans la figure 6. La β -élimination a lieu dans un premier temps, en présence d'une base et conduit à la libération du substituant en 4 de l'acide uronique. Dans un second temps, une hydrolyse ménagée en présence d'acide coupe la liaison de l'acide uronique modifié et libère



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

Figure 6: Réaction de β -élimination.

ses substituants en 2 et 3. Cette technique est appliquée sur les polysaccharides perméthylés en présence de 2,2 diméthoxypropane (afin de rester en milieu anhydre) par action du méthoxyde de sodium dans le méthanol, ou par action du méthylsulfinyl de sodium dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Le substituant en position 4 d'un acide uronique libéré lors de la β -élimination (R_4OH) peut lui aussi subir une β -élimination (peeling) mais à partir de la fonction réductrice libre (Aspinall 1982; Strecker 1995). Différentes méthodes visant à protéger par acétylation les fonctions aldéhydes libérées ont donc été développées.

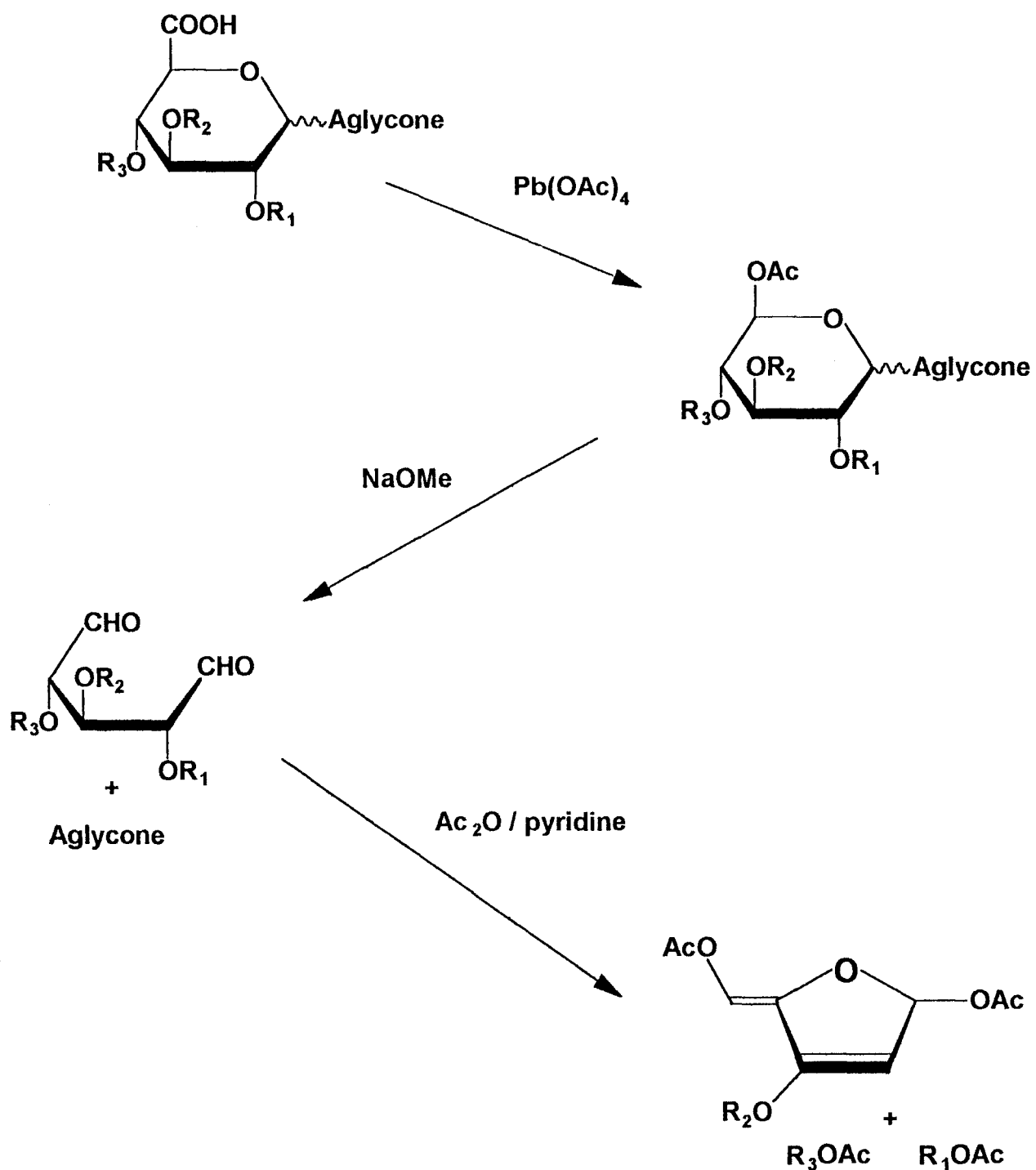
- Le Diaza-1,5-bicyclo[5,4,0]-undécène-5 (DBU) en présence d'anhydride acétique dans le benzène a été utilisé sur des polysaccharides perméthylés (Aspinall et Chaudhari, 1975).

-La triéthylamine en présence d'anhydride acétique a été employée sur des polysaccharides peracétylés (Lindberg *et al.*, 1978). Dans ce cas, la fonction carboxylique est sous forme anhydride. 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.

-La pyridine en présence d'anhydride acétique a été appliquée pour la dégradation d'acides uroniques contenus dans des saponines (Kitagawa *et al.*, 1977).

3.2.5. La décarboxylation oxydative (dégradation au tétraacétate de plomb).

Cette méthode a d'abord été développée pour l'étude des saponines (Kitagawa *et al.*, 1977) et ensuite adaptée aux polysaccharides. En effet, le chauffage à reflux d'une saponine perméthylée dans le benzène en présence de tétraacétate de plomb provoque la décarboxylation et l'acétoxylation en C5 de l'acide glucuronique présent, si ce dernier présente sa fonction carboxylique sous la forme acide (COOH). L'action du méthoxyde de sodium suivie d'une acétylation (anhydride acétique/pyridine) libère l'aglycone ainsi que les substituants en 2 et 4



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

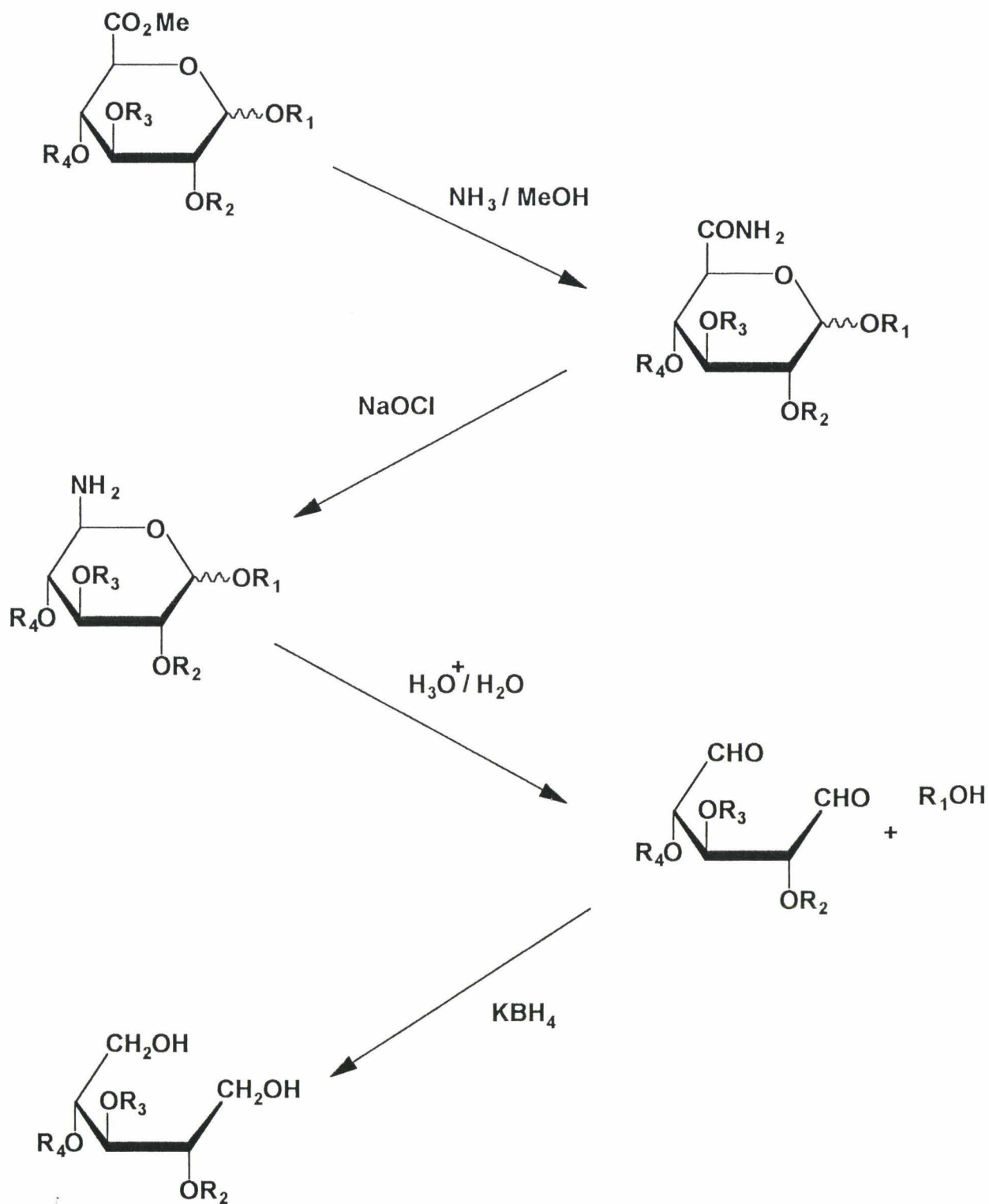
Figure 7: Réaction de décarboxylation oxydative d'un acide uronique.

de l'acide uronique (Kitagawa *et al.*, 1978). Le schéma réactionnel proposé par Kitagawa est présenté dans la figure 7.

Cette technique a été adaptée aux polysaccharides contenant des acides uroniques par Aspinall *et al.* (1984; 1989). Le polysaccharide perméthylé est saponifié en présence de soude afin de libérer les fonctions carboxyliques. Après action du tétraacétate de plomb dans le benzène, un borohydrure alcalin réduit le dialdéhyde formé. Ainsi, Aspinall *et al.* (1984) découpent un polysaccharide de plante (*Drosera*) au niveau de tous les acides glucuroniques, les transformant en xylitol sans libérer les substituants des acides uroniques. Les oligosaccharides alditols obtenus sont dérivés et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

3.2.6. Dégradation de Hofmann.

La réaction de Hofmann consiste en fait à transformer une fonction amide en une fonction amine sous l'action d'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 transformation de la fonction carboxylique en fonction amide. Cette étape peut être réalisée dans l'ammoniaque liquide (Kochetkov *et al.*, 1970 ; Mian et Percival, 1973) ou dans une solution de méthanol saturée en ammoniac (Kochetkov *et al.*, 1967a; 1973). Dans ce dernier cas, le polysaccharide doit être au préalable perméthylé pour être soluble dans le méthanol. La figure 8 présente les différentes étapes de la réaction (Kochetkov *et al.*, 1967b). Comme lors de la dégradation par le tétraacétate de plomb, l'acide hexuronique est transformé en pentadialdose auquel restent attachés tous les substituants.



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

Figure 8: Schéma réactionnel de la dégradation de Hofmann appliquée aux acides uroniques.

3.3. RMN des oligosaccharides.

L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode non destructrice qui peut, en principe, fournir toutes les informations nécessaires à l'établissement de la structure complète d'une molécule glucidique, c'est-à-dire, la nature et la séquence des monosaccharides, la position des liaisons et leur anomérie. Les limites de cette méthode viennent essentiellement de la quantité de matériel glucidique nécessaire pour réaliser les spectres (500 µg à 5 mg) et du très grand degré de pureté des échantillons requis.

Actuellement, les analyses bidimensionnelles (COSY, TOCSY, HOHAHA) permettent l'identification des monosaccharides par la mesure des constantes de couplage des protons axiaux et équatoriaux de l'hétérocycle.

La liaison entre chaque unité monosaccharidique peut quant-à elle être déterminée de deux façons. La première consiste à appliquer l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) qui fournit généralement des pics de corrélation intenses entre les protons H_1 et H_x de deux sucres attachés par une liaison 1-x. La seconde, beaucoup plus sûre, nécessite l'attribution de toutes les résonances du ^{13}C via le spectre $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, et se fonde sur le fait que le glissement chimique du carbone C_x subit un déblindage de 3 à 10 ppm selon la nature du sucre qui lui est attaché.

La séquence HMBC fournira ensuite l'enchaînement des différentes unités, tout en précisant la nature des liaisons.

A partir de quelques centaines de µg de matériel, l'analyse RMN monodimensionnelle (1D) des structures glycaniques peut néanmoins être effectuée selon les principes établis par Vliegthart *et al.* (1983). Ils demandent l'étude des déplacements chimiques de quelques signaux bien individualisés sur le spectre (structural-reporter-groups). Ces résonances sont celles des protons anomériques, mais peuvent aussi être par exemple celles des protons du groupement CH_3 pour le rhamnose et le fucose ou celle du proton H-2 du mannose ou H-3, H-4 du galactose substitué en ces positions (Strecker, 1993 ; van Halbeek, 1994).

3.4. Spectrométrie de masse des oligosaccharides.

Avec la spectrométrie de masse, nous disposons de techniques qui permettent de descendre d'un facteur 10 à 1000 les quantités nécessaires à l'étude de structures glycaniques par rapport à la RMN.

La spectrométrie de masse permet de mesurer des masses moléculaires à partir d'espèces ionisées. C'est pourquoi, dans ce chapitre, nous présenterons succinctement les différentes techniques d'ionisation ainsi que les analyseurs à temps de vol et quadripolaires.

3.4.1. Les techniques d'ionisation.

L'ionisation par bombardement d'atomes rapides ou FAB (fast atom bombardment).

L'ionisation par bombardement consiste à focaliser un faisceau d'atomes neutres de grande énergie cinétique sur un échantillon en solution dans une matrice. Ces atomes neutres, qui sont le plus souvent de l'argon et parfois le xénon, provoquent une onde de choc expulsant de la solution des ions et des molécules. Cette technique ne provoque pas ou peu de fragmentation : elle se contente d'expulser en phase gazeuse des ions (De Hoffmann *et al.*, 1994). Cette méthode est très efficace pour produire des ions moléculaires à partir de substances polaires et ou thermolabiles (peptides, glycannes). Dans de nombreux cas, elle offre en outre l'avantage de fournir des faisceaux d'ions qui peuvent être maintenus pendant des temps longs, parfois plusieurs dizaines de minutes, permettant d'effectuer divers types d'analyses. Ceci est particulièrement appréciable dans les mesures d'analyseurs multiples (MS/MS).

Le choix de la matrice est fondamental et conditionne la qualité de réponse d'une substance en ionisation FAB. D'une manière générale, le glycérol est la matrice par excellence pour les oligosaccharides natifs, alors que le thioglycérol, plus acide, fournit d'excellents

résultats avec les sucres substitués (Dell, 1987). La triéthanolamine est aussi souvent utilisée en mode négatif car elle facilite la déprotonation des sucres natifs (Garozzo *et al.*, 1990).

La dérivation permet aussi d'augmenter l'intensité du signal FAB de manière significative. Les méthodes proposées comprennent la peracétylation, la perméthylation (Dell, 1990), mais aussi le greffage d'une amine aromatique par amination réductive (Poulter et Burlingame, 1990). Dans ce dernier cas, l'aglycone présente une lipophilie suffisante pour autoriser la chromatographie de ces dérivés sur des phases inversées et leur détection en UV.

Désorption-ionisation par laser assistée par matrice (MALD).

La désorption laser assistée par matrice consiste à co-cristalliser la substance à analyser et une solution de petites molécules organiques, appelée matrice, présentant une forte absorption à la longueur d'onde du laser. L'énergie absorbée par le mélange lors de l'irradiation laser induit un changement de phase instantané du solide en gaz. Dans ce volume de gaz en expansion, des réactions font intervenir des transferts de protons et d'électrons qui conduisent à la formation d'ions positifs et négatifs (Karas *et al.*, 1991). La figure 9 représente une vue schématique de ce processus (De Hoffmann *et al.*, 1994).

La matrice est un élément déterminant de l'ionisation par laser. La qualité de la détection des oligosaccharides repose sur la bonne co-cristallisation de l'échantillon avec la matrice. De récentes études montrent que des oligosaccharides natifs complexes peuvent être détectés jusqu'à un seuil de 100 fmoles en utilisant l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB) comme matrice. La sensibilité est alors supérieure à celle obtenue avec l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (ACH) ou l'acide 3-amino-4-hydroxybenzoïque (Harvey, 1993). Enfin la dérivation des oligosaccharides par peracétylation améliore encore le rendement d'ionisation.

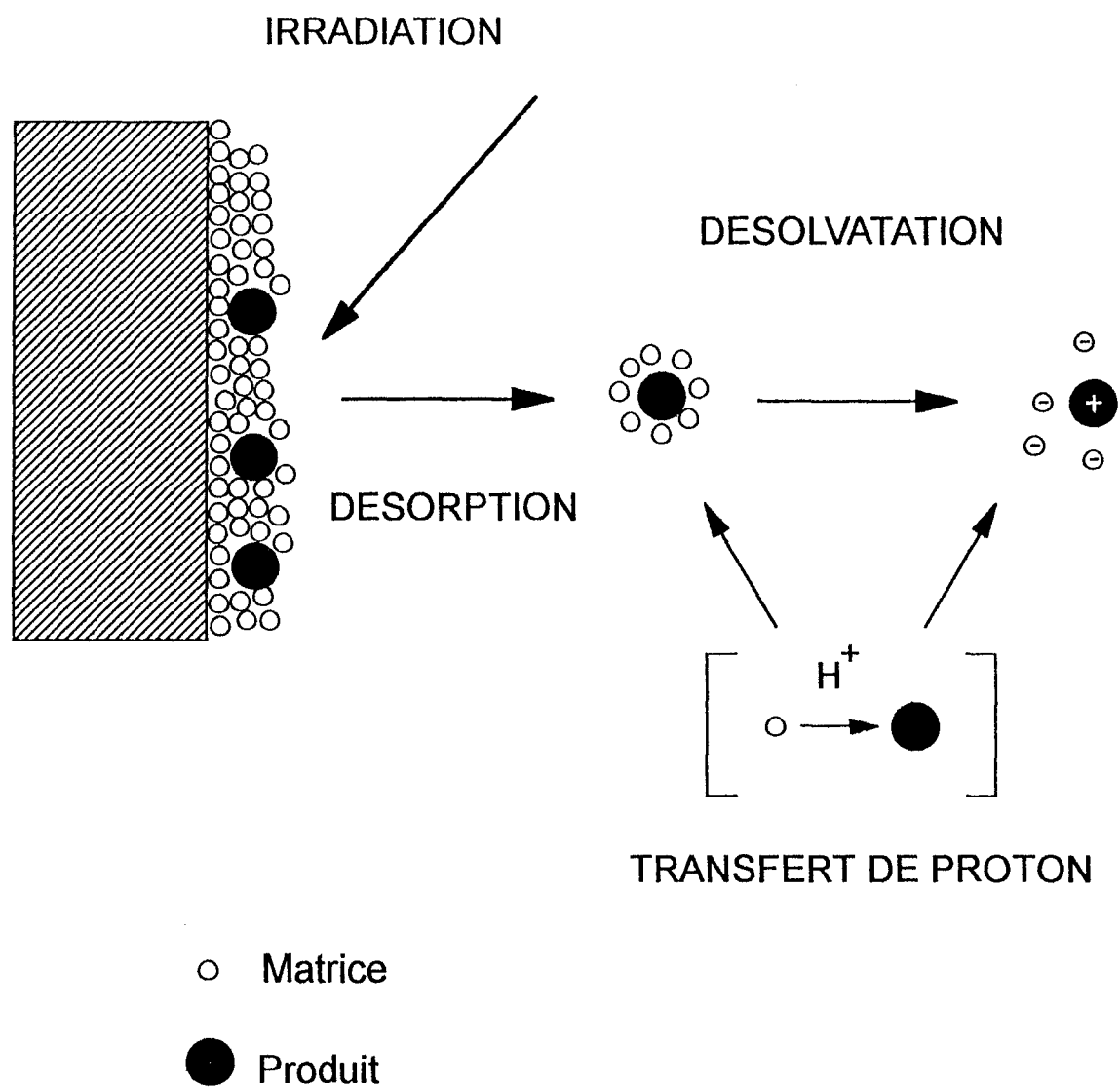


Figure 9: Schéma de principe de l'ionisation MALD (Matrix Assisted Laser Desorption).

L'électrospray (ES).

L'analyse en mode électrospray consiste à appliquer une différence de potentiel entre l'extrémité d'un capillaire traversé par un liquide et une électrode afin de créer un fort champ électrique. Celui-ci provoque la formation de gouttelettes hautement chargées à la sortie du capillaire. L'évaporation du solvant provoque une diminution de volume des gouttelettes jusqu'au moment où les forces coulombiennes répulsives excèdent les forces de cohésion du liquide et provoquent l'explosion en microgouttelettes encore plus petites (Fig.10). Lorsque le champ électrique à leur surface est suffisant, il provoque la désorption des ions. Les ions produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule. Les spectres de masse en électrospray correspondent généralement à une distribution statistique de pics consécutifs caractérisant des ions moléculaires multiplement chargés par protonation $(M+zH)^{z+}$, tout en évitant les contributions dues aux dissociations ou aux fragmentations.

Ceci est surtout vrai pour les protéines qui possèdent de multiples charges et dont la masse moléculaire atteint plusieurs milliers de Da. Toutefois, les glycanes peuvent être analysés en mode positif en présence de cations (Li^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ , Na^+ , Zn^{2+}). Les états de charge détectés dépendent alors de la nature du cation utilisé, comme l'indiquent les analyses de β -cyclodextrines (Metzger *et al.*, 1991). L'utilisation d'un mélange NH_4HCO_3/CH_3CN (Garozzo *et al.*, 1991) peut quant-à lui permettre d'observer l'espèce moléculaire $[M-H]^-$ en ionisation négative.

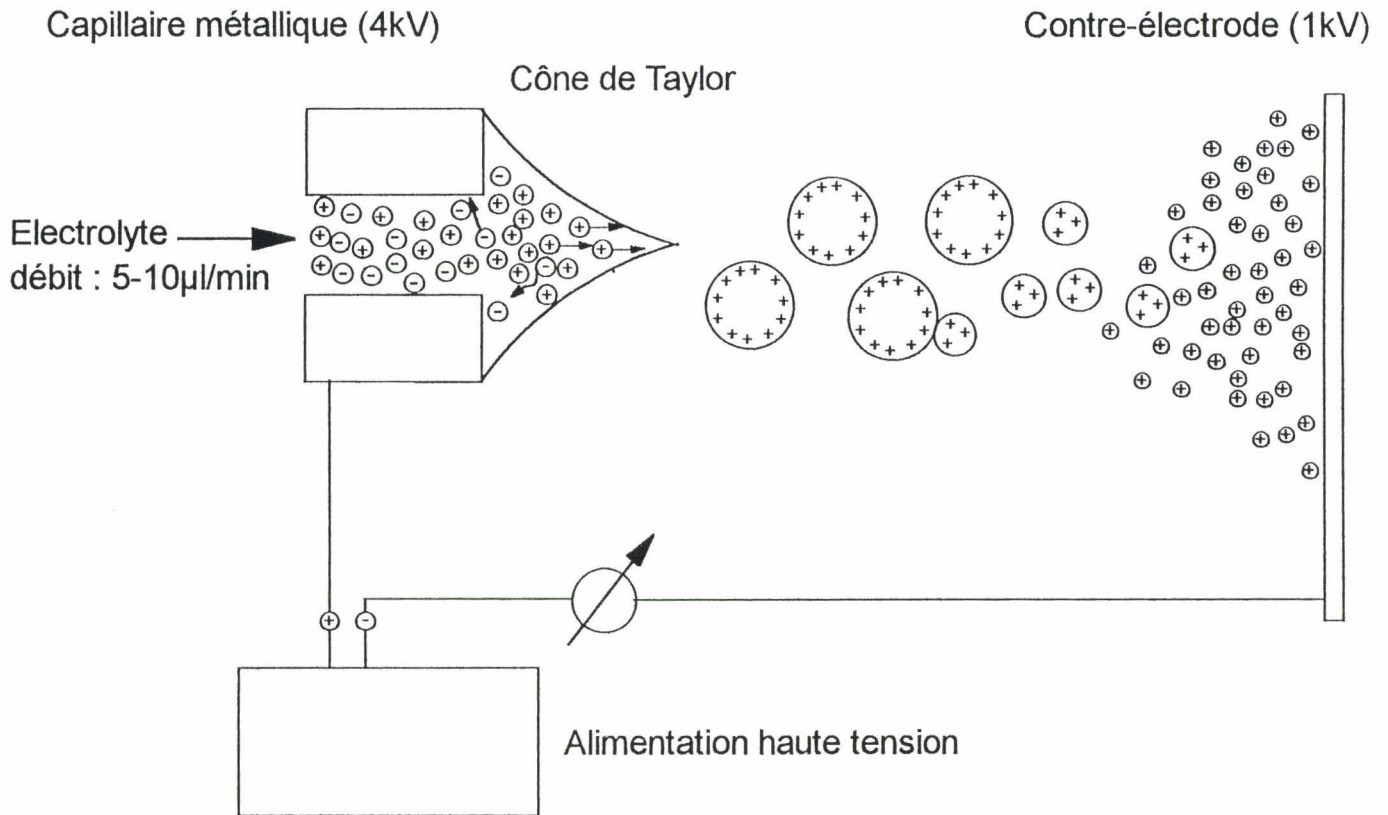


Figure 10: Illustration du phénomène électrophorétique dans le processus d'ionisation en électrospray en mode ion positif (Kearle et Tang, 1993).

3.4.2. Les analyseurs.

Les analyseurs à temps de vol (TOF).

Dans ce type d'analyse, les ions expulsés de la source sont accélérés sous une différence de potentiel (V_s) et parcourent une distance (d) pour arriver au détecteur. L'énergie cinétique (E_c) est la même pour tous les ions mais leur vitesse (v) est différente car elle dépend de leur masse (m) et de leur charge totale ($q = ze$; où z représente le nombre de charges et e la charge d'un électron).

Un ion possède l'énergie cinétique suivante à la sortie de la source :

$$E_c = qV_s = mv^2 / 2$$

Il parcourt la distance d en un temps t tel que: $t = d/v$

En remplaçant v par la valeur obtenue à partir de l'équation précédente nous obtenons

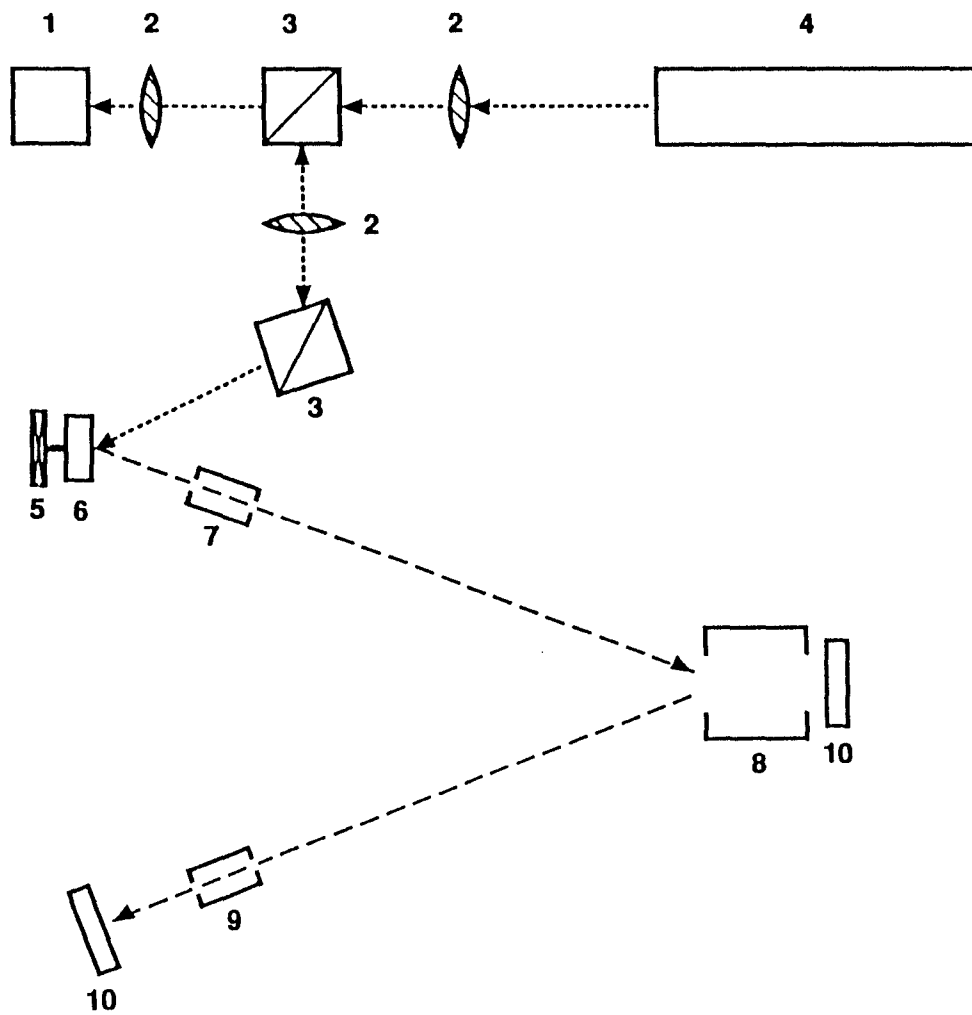
$$t^2 = (m/q) \cdot (d^2/2V_s)$$

Les termes $(d^2/2V_s)$ étant constants, la mesure de t^2 permet le calcul de m/q .

Il en découle donc que le temps de vol des ions est d'autant plus long que leur masse est élevée.

Les analyseurs (Fig. 11) ont été perfectionnés par l'introduction d'un réflecteur électrique qui permet une refocalisation des ions selon leur énergie cinétique, corrigeant ainsi les faibles différences de vitesse observées pour des ions de même rapport m/z , dues à une dispersion en énergie cinétique lors de l'ionisation. Ce réflecteur permet également de refocaliser les ions métastables formés dans le tube de temps de vol, ceux-ci possédant la même vitesse mais une énergie cinétique différente de celle de l'ion parent. Cette technique est baptisée post source decay (PSD).

Ces analyseurs connaissent un regain d'actualité grâce au développement d'électronique appropriée pour traiter un flux rapide d'informations.



- | | | |
|-----------------|-----------------------|----------------------|
| 1) TV-Camera | 5) Target-manipulator | 9) Post acceleration |
| 2) Light-optics | 6) Target | 10) Detector |
| 3) Prism | 7) Ion-optics | |
| 4) Laser | 8) Ion-reflector | |

Figure 11: Schéma d'un appareil à temps de vol (VISION 2000, Finnigan).

L'analyseur quadripolaire.

L'analyseur quadripolaire est constitué de quatre électrodes en parallèle (Fig. 12) (De Hoffmann *et al.*, 1994). Les ions qui pénètrent dans cet analyseur sont soumis à l'action conjuguée d'un champ électrique alternatif et d'un champ électrique continu. Les ions vont osciller dans le champ électrique en fonction de l'amplitude des tensions continues et alternatives. Cependant, une seule espèce d'ions arrivera au détecteur, les autres espèces étant défectées ou déchargées sur les barres. C'est donc un balayage de tensions électriques continues et alternatives qui sépare des ions de masses différentes. Tous les modes d'ionisation qui génèrent des ions en continu (FAB, ES, CI, EI) peuvent être couplés à des quadripôles de ce type.

3.4.1. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Les spectromètres de masse en tandem sont constitués, comme l'indique la figure 13 (Domon, 1994), de deux analyseurs en série séparés par une cellule de collision. Le premier analyseur (MS-1) permet de sélectionner une espèce moléculaire, généralement l'ion parent, qui va générer dans la cellule de collision des ions fragments identifiés par le second analyseur (MS-2). La configuration la plus utilisée est l'appareil de type "à triple quadripôles", le premier et le troisième étant des spectromètres de masse, et le second une cellule de collision.

La plupart des travaux rapportés à ce jour sur l'analyse des glycanes libres ou conjugués utilisent la FABMS/MS. Certains oligosaccharides peuvent être analysés en mode négatif, mais généralement on préfère les dériver par peracétylation ou méthylation (Dell, 1990) ou par amination réductive (Gillece-Castro and Burlingame, 1990) afin de les analyser en mode positif et surtout d'abaisser le seuil de détection. Les sources d'ionisation électrospray peuvent aussi être utilisées pour la spectrométrie de masse en tandem. L'ESMS/MS est employée pour l'analyse de glycopeptides (Huddleston *et al.*, 1993) ainsi que pour l'analyse de glycanes libres natifs ou perméthylés (Reinhold *et al.*, 1995).

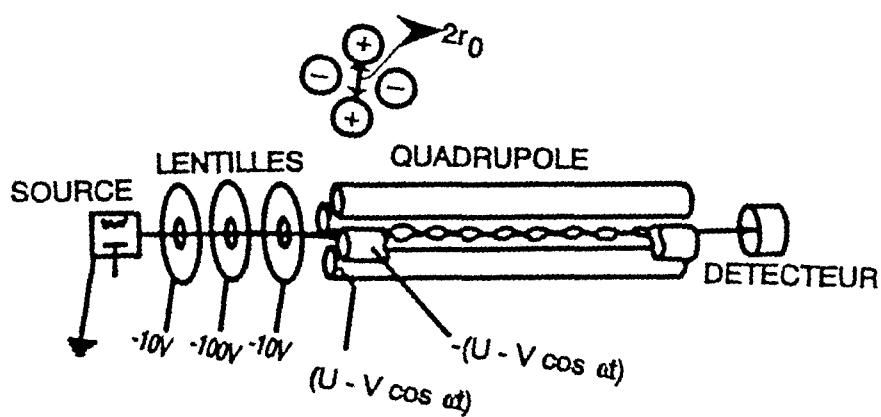


Figure 12: Schéma d'un appareil à quadripôles comportant la source, les barres cylindriques du quadripôle et le détecteur (De Hoffmann *et al.*, 1994).

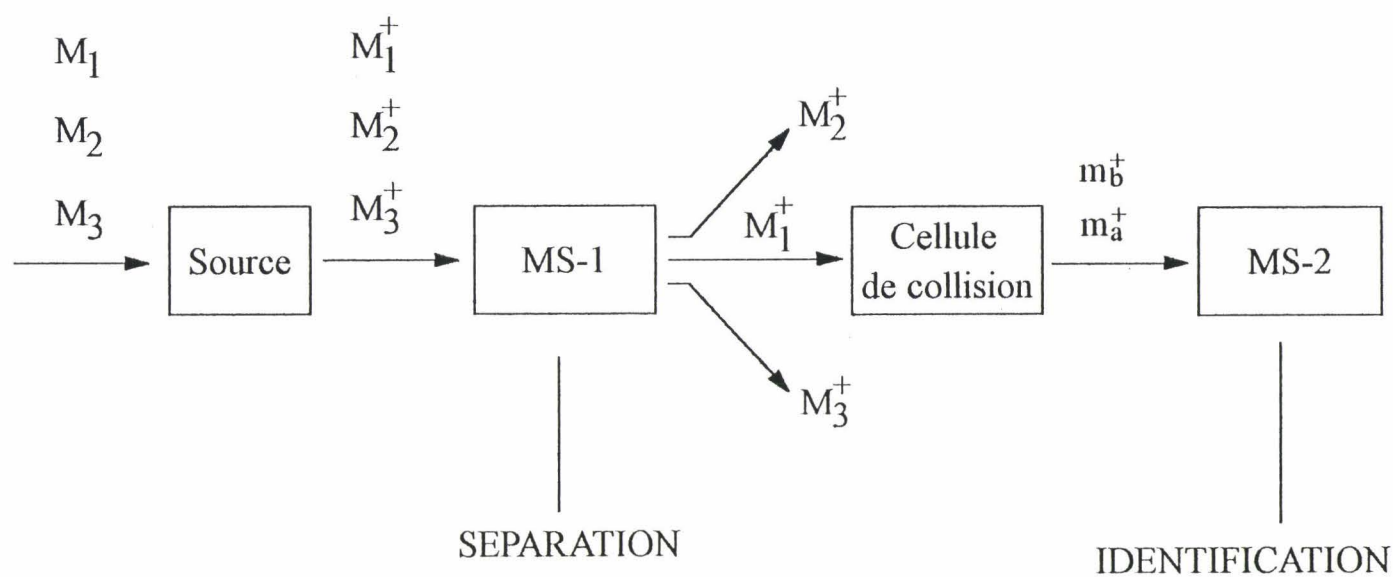


Figure 13: Principe de la spectrométrie de masse en tandem (Domon, 1994).

3.5. La perméthylation.

3.5.1. La réaction de perméthylation.

La méthylation est l'une des techniques les plus utilisées pour connaître la substitution de chaque monosaccharide constitutif d'un polysaccharide ou d'un oligosaccharide. L'éthérisation de tous les hydroxyles libres permet de les différencier des hydroxyles engagés dans les liaisons osidiques et qui sont libérés après clivage. Les méthodes de méthylation dérivent toutes de la méthode décrite par Hakomori (1964) (Fig. 14). La première étape consiste à faire réagir du NaH avec du diméthyl sulfoxyde (DMSO) afin de produire une base forte ou carbanion (diméthylsulfinyl de sodium) capable de former des alcoolates. L'attaque nucléophile de l'alcoolate sur l'iodure de méthyle (CH_3I) fixe le groupement méthyle. La base de méthylation la plus utilisée est le diméthylsulfinyl de sodium, mais d'autres bases de même type, comme le diméthylsulfinyl de potassium (Philipps et Frazer, 1981) ou le diméthylsulfinyl de lithium (Paz Parente *et al.*, 1985) sont également employées.

Ciucanu et Kerek (1984) proposent une méthode de méthylation beaucoup plus simple utilisant l'hydroxyde de sodium en pastilles pulvérisées comme base de méthylation. En fait, l'hydroxyde de sodium réagirait comme précédemment avec le DMSO pour former un carbanion.

La méthylation des acides uroniques s'accompagne souvent d'une réaction de β -élimination susceptible d'être utilisée comme procédé de rupture spécifique des acides uroniques (voir généralités chapitre 3.2). Mais elle provoque surtout une perte de l'information pour la suite de l'étude structurale. Cette β -élimination importante lors de la méthylation à l'hydroxyde de sodim (Gunnarsson, 1987) peut être minimisée, sans toutefois jamais être évitée, en méthylant selon la méthode d'Hakomori (Somme, 1986). En effet, le carbanion serait dégradé rapidement par l'excès d'iodure de méthyle.

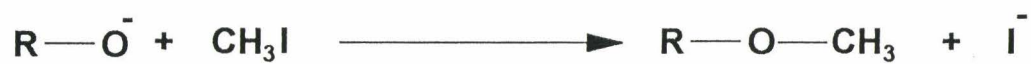
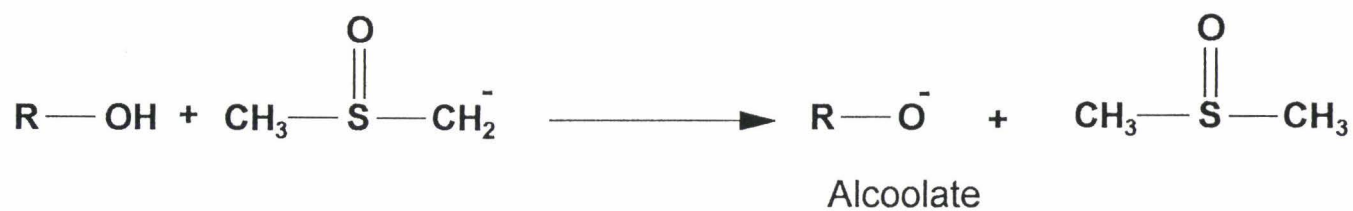
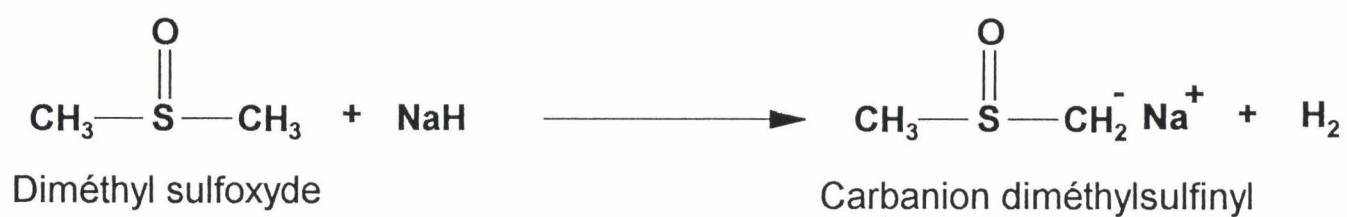


Figure 14: Schéma réactionnel de la méthylation utilisant la méthode d'Hakomori.

3.5.2. Les méthodes de clivage de la liaison glycosidique.

L'hydrolyse est la méthode classique de clivage de la liaison osidique. Les monosaccharides libérés sont réduits et peracétylés (Fig. 15) pour donner des alditols acétates partiellement méthylés (PMAA) susceptibles d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Björndal *et al.*, 1970 ; Geyer et Geyer, 1994). Cependant, l'hydrolyse d'hexoses, d'acides uroniques ou d'acides sialiques requiert des conditions différentes. De plus, l'hydrolyse peut conduire à la perte de résidu méthyle ou détruire des sucres labiles comme les acides sialiques.

La méthanolyse est un autre moyen de cliver la liaison osidique (Fournet *et al.*, 1981). Elle est capable de libérer toutes sortes de sucres en une seule étape avec peu ou pas de dégradation. Les méthylglycosides libérés sont directement peracétylés sans réduction préalable, supprimant ainsi l'étape d'élimination des sels. Cependant, la méthanolyse fait apparaître pour les sucres analysés les anomères α et β des formes furanose et pyranose, rendant l'interprétation des chromatogrammes plus complexe et la quantification des méthylglycosides perméthylés plus difficile.

3.5.3. Le couplage GC/MS.

La chromatographie en phase gazeuse permet la séparation des différents méthylglycosides en fonction de la nature du monosaccharide, du nombre de groupements méthyles et de leur position. Une première identification des éthers méthyliques est possible avec les temps de rétention. Ces dérivés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique (CI) et en mode d'ionisation par impact électronique (EI) afin de préciser sans ambiguïté le nombre de groupements méthyles et leur position.

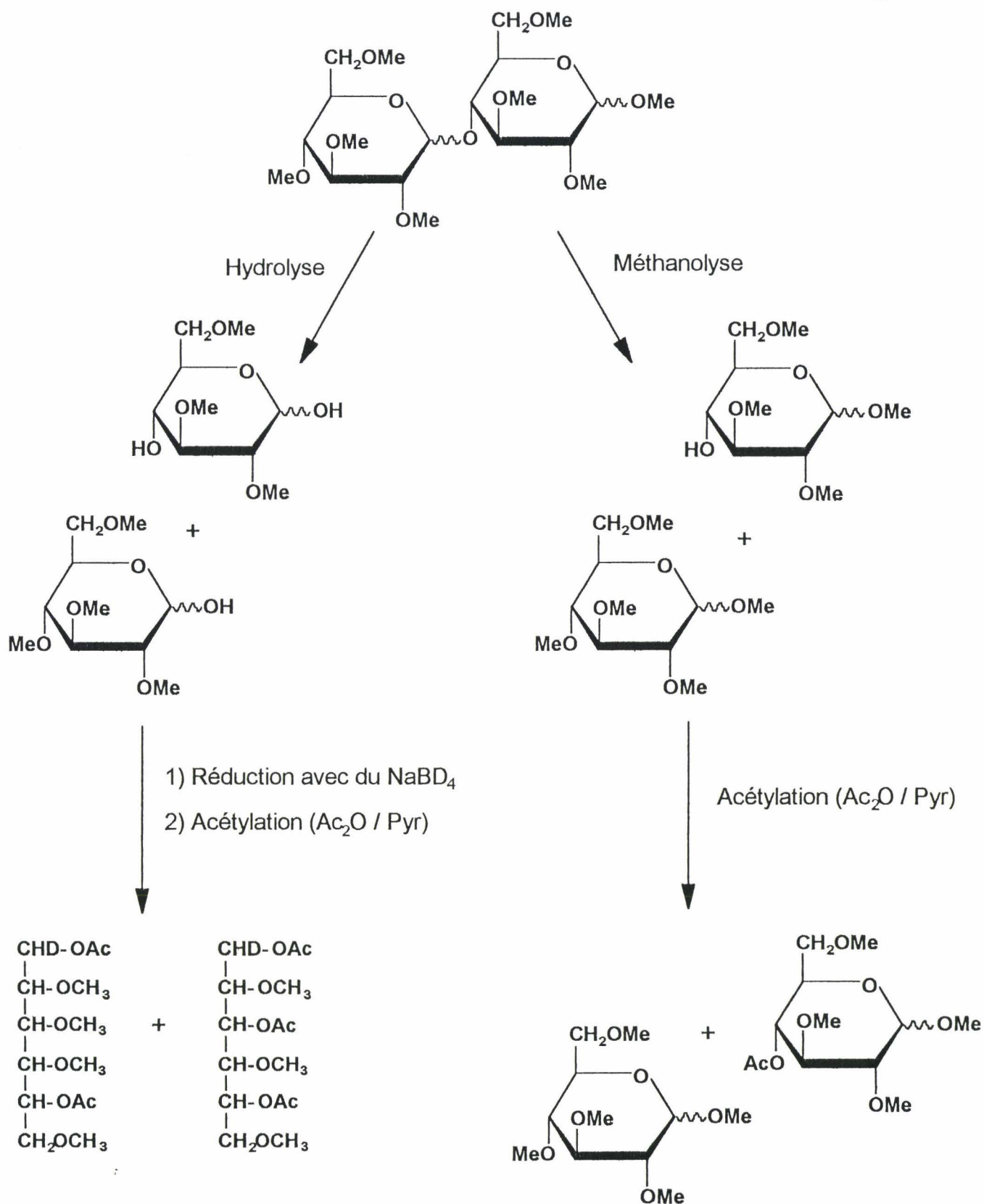


Figure 15: Clivage des oligosaccharides perméthylés.

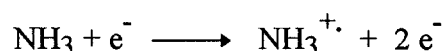
L'ionisation par impact électronique (EI).

Lors de l'ionisation par impact électronique, un filament chauffé émet des électrons. Ceux-ci sont accélérés vers une anode et "entrent en collision" avec les molécules introduites dans la source (Fig. 16) (De Hoffmann *et al.*, 1994). L'interaction des électrons avec les molécules se traduit par leur ionisation. Cette technique fournit des informations sur la structure des molécules par le biais de l'analyse de leurs fragments. On peut notamment déterminer le nombre de carbones des monosaccharides, différencier les cycles pyranoses et furanoses, identifier les N-acétyl-hexosamines, les acides uroniques et sialiques, et enfin caractériser certains substituants non glucidiques (acétate, phosphate et pyruvate) (Wait, 1991).

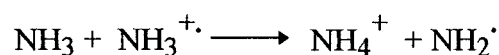
L'ionisation chimique (CI).

L'ionisation par impact électronique produit des fragmentations de l'ion moléculaire, qui devient parfois difficile à observer. Or, il est souvent nécessaire de pouvoir mesurer la masse moléculaire du produit intact. L'avantage de l'ionisation chimique est d'être plus douce et donc de fournir un spectre dans lequel l'espèce moléculaire est facilement reconnaissable. Lors de cette ionisation, un gaz réactant, en général de l'ammoniac, du méthane ou de l'isobutane, est introduit dans la source. Le faisceau d'électrons traverse la source comme précédemment mais ionise le gaz utilisé comme réactif. Celui-ci réagit avec la substance étudiée qui est vaporisée. Avec l'ammoniac par exemple, nous obtenons les réactions suivantes:

L'impact électronique avec l'ammoniac forme un radical-cation :



Ce radical-cation réagit avec l'ammoniac pour former l'ion ammonium et le radical $\text{NH}_2\cdot$:



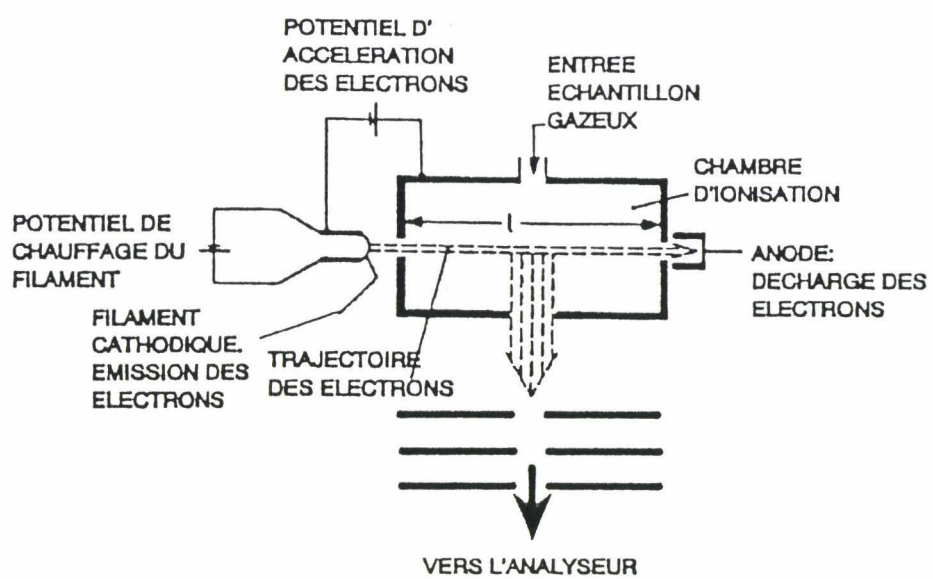
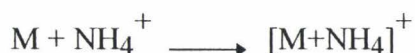


Figure 16: Schéma d'une source par impact électronique (De Hoffmann *et al.*, 1994).

Avec ce gaz, le mode d'ionisation dépend de la nature de l'échantillon. Les molécules basiques, les amines principalement, s'ioniseront par transfert d'un proton :



Les molécules polaires et celles qui sont susceptibles de former des liaisons hydrogène, mais peu ou pas basiques, formeront un adduit :



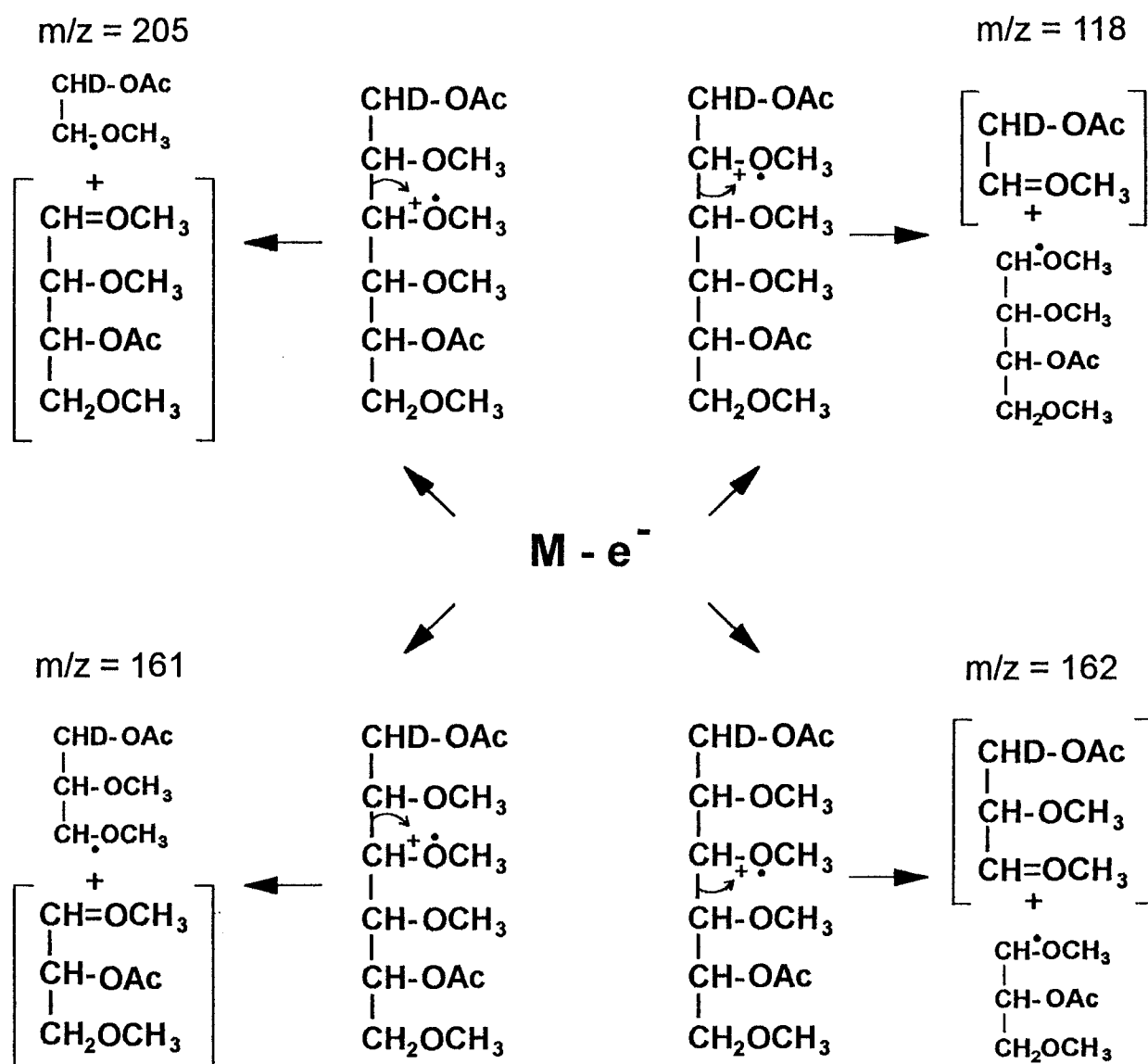
La combinaison de l'ionisation chimique (CI) et de l'ionisation par impact électronique (EI) permet donc non seulement de mesurer la masse moléculaire d'un produit mais aussi de l'identifier.

EIMS des alditols acétates partiellement méthylés.

L'interprétation des spectres de masse des alditols acétates partiellement méthylés est aisée si l'on observe quelques règles simples (Hellerqvist, 1990).

L'ionisation peut être réalisée sur n'importe quel oxygène d'une liaison éther (perte d'un électron) (Fig.17). Un transfert d'électrons provoque une rupture de la chaîne carbonée de l'alditol, aboutissant à la formation d'un radical et d'un ion positif appelé fragment primaire. L'analyse de cet ion positif nous indique le nombre de carbones O-méthylés et O-acétylés. De plus, si la réduction de la fonction aldéhyde est réalisée avec un borodeutérure de sodium, un nombre pair pour m/z va montrer que le fragment possède le carbone 1 (C-1) deutéré alors qu'un nombre impair va indiquer que le fragment possède le carbone 6 (C-6).

La charge positive est généralement portée par le carbone O-méthylé positionné au niveau du site de coupure. La fragmentation se fait en fonction des substituants. Ainsi, elle a lieu préférentiellement entre deux carbones O-méthylés (Fig 17). Elle peut aussi intervenir, mais moins facilement, entre un carbone O-méthylé et un carbone O-acétylé (Fig. 18). Elle se produit plus rarement entre deux carbones O-acétylés.



M: 1,5-di-O-Acetyl-2,3,4,6-tetra-O-Methyl-hexitol

Figure 17: Fragmentation de la chaîne d'un alditol acétate (Hellerqvist, 1990).

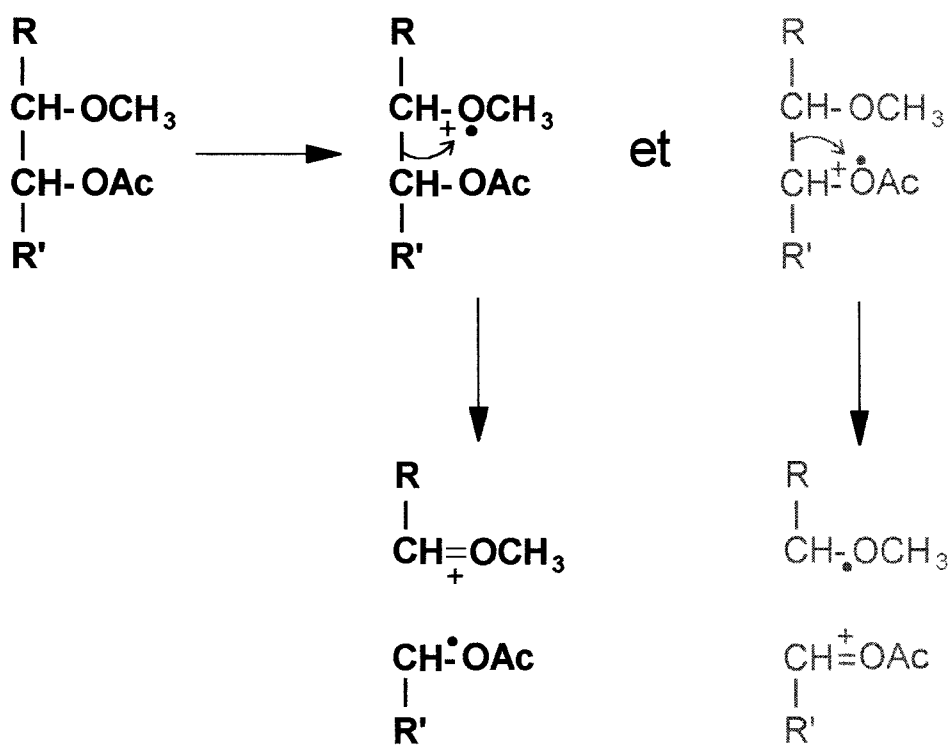


Figure 18: Fragmentation entre un carbone méthylé et un carbone acétylé.
Généralement la rétention de la charge se fait sur le carbone méthylé.

Des fragmentations secondaires apparaissent lors de l'ionisation. Elles correspondent à la perte, au niveau des fragments primaires, d'une molécule neutre qui peut être du méthanol (m/z 32), de l'acide acétique (m/z 60), une cétène (m/z 42) ou un formaldéhyde (m/z 30).

EIMS des méthylglycosides partiellement méthylés .

L'interprétation d'un spectre EI de méthylglycoside partiellement méthylé est beaucoup plus difficile que celle d'un spectre d'alditol acétate partiellement méthylé. En effet, la fragmentation d'un méthylglycoside n'est pas dirigée par la nature des substituants mais suit un schéma classique avec cinq séries principales de fragments (a, b, c, d, e). La figure 19 montre le fragment primaire de chaque série (a_1 , b_1 , c_1 , d_1 , e_1) pour un méthylglycoside perméthylé. Chacun de ces ions peut donner lieu à une fragmentation secondaire comme l'ion a_1 (m/z 219) qui se décompose en ions a_2 (m/z 187) et a_3 (m/z 155). Il est aisé de comprendre que le nombre de fragments à analyser est important, ce qui rend le spectre complexe et donc difficile à interpréter.

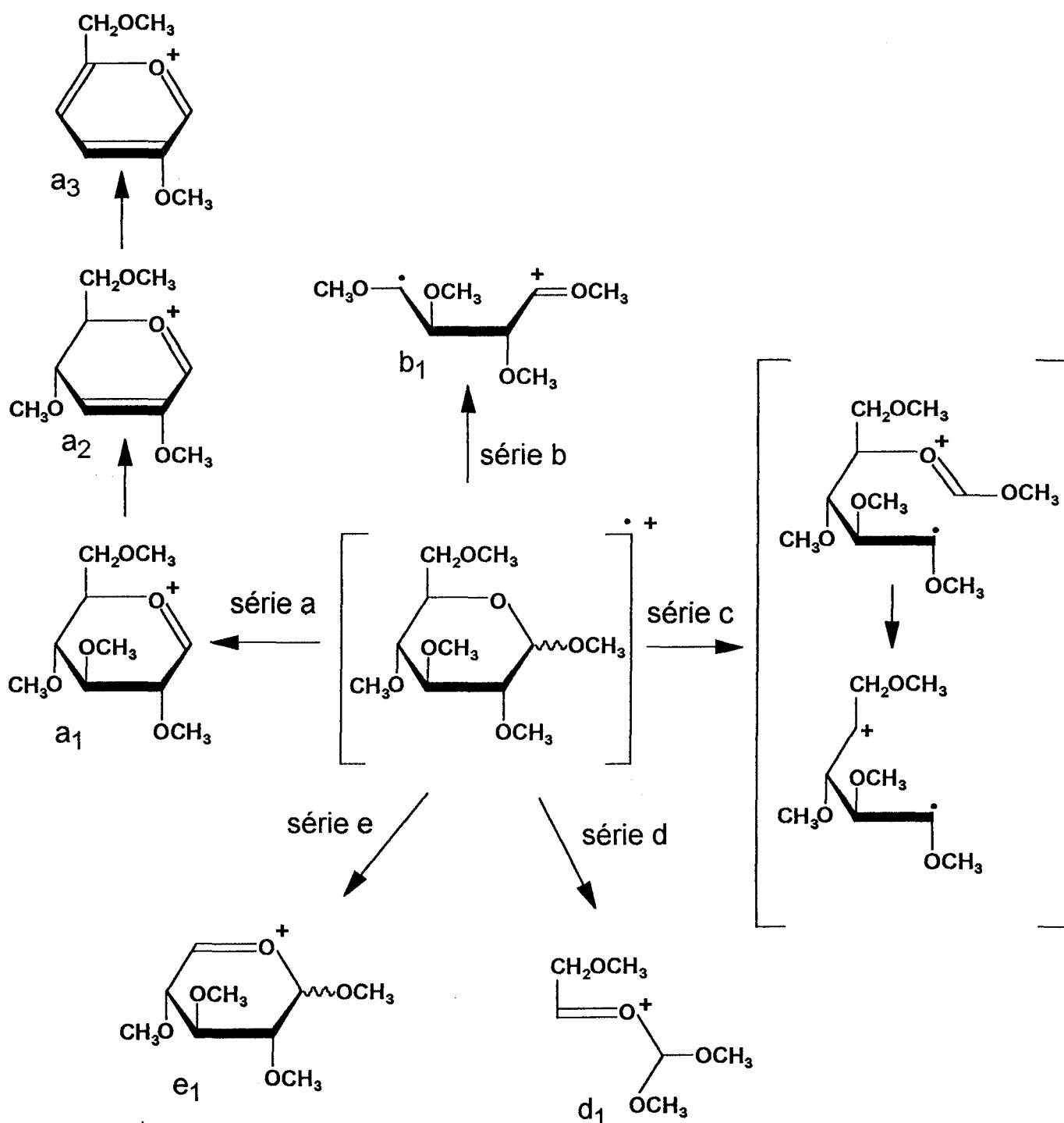


Figure 19: Principales voies de fragmentation des méthylglycosides perméthylés.

N.B. Nous désignons les différents ions par des minuscules pour éviter une confusion avec la nomenclature utilisée pour les ions obtenus par MS/MS des oligosaccharides.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude d'un site hydrothermal profond du pacifique (12°48'56'' N, 103°56'72'' O) lors de la campagne océanographique française "Hydronaute" (décembre, 1987) a permis de constituer une collection de souches bactériennes.

Le criblage de 479 de ces souches par Vincent (1993) a retenu 17 d'entre elles pour leur capacité à produire un exopolysaccharide. Ces bactéries se caractérisent en fait par l'aspect mucoïde des colonies sur boîte de Petri et par leur capacité à augmenter la viscosité d'un milieu de culture liquide.

L'analyse des propriétés rhéologiques de ces 17 exopolysaccharides par le CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales - CNRS) a montré que seul le polysaccharide excrété par la bactérie *Alteromonas sp.* 1644 possédait des propriétés originales intéressantes. En effet, celui-ci peut former en présence de chlorure de calcium un gel visco-élastique aux propriétés uniques, extrêmement résistant et qui garde la forme du récipient dans lequel il s'est formé (Bozzi, 1991).

Ce polysaccharide excrété par la bactérie *Alteromonas sp.* 1644 a donc été retenu pour une étude structurale approfondie.

1. CULTURE DES BACTERIES ET ISOLEMENT DU POLYSACCHARIDE 1644.

La première fermentation de la souche *Alteromonas sp.* 1644 a été réalisée à la station biologique de Roscoff (Vincent, 1993). Elle a permis l'obtention de 2g/l d'un exopolysaccharide pur à 93 % appelé polysaccharide 1644. Par la suite, les fermentations ont été effectuées par E. Samain au CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales - CNRS). Ces fermentations ont, dans un premier temps, abouti à des résultats très variables en ce qui concerne les cinétiques de croissance bactérienne et la production du polysaccharide 1644. La première partie du travail de thèse de Bozzi (1994) a été d'étudier les

causes de cette variabilité, afin notamment de savoir si elle provenait d'une instabilité génétique de la souche. Pour cela, différents sous-clones de la souche 1644 ont été comparés afin de déterminer s'ils produisaient plus ou moins de polysaccharide et, le cas échéant, si ce caractère était génétiquement transmissible.

Le sous-clonage de la souche 1644 a montré qu'il existait deux types morphologiques de colonies (Fig. 20): a) des colonies *crénelées* et plates avec des bords irréguliers et des nervures partant du centre; b) des colonies *lisses* et bombées avec des bords francs.

Lors de cette étude, Bozzi a remarqué qu'une culture inoculée avec une colonie *crénelée* donne majoritairement des colonies *crénelées* mais aussi des colonies *lisses*. Ce taux de conversion est très variable et semble dépendre de nombreux facteurs tels que la température, l'âge de la culture ou encore la composition du milieu. Par contre, la formation de colonies *crénelées* à partir de cultures de colonies *lisses* n'a jamais été observée. Des variations comparables de morphologie de colonies ont déjà été observées chez des souches de *Pseudomonas atlantica*. Pour cette bactérie, on a pu mettre en évidence une relation entre la morphologie des colonies et la sécrétion de polysaccharide (Barlett *et al.*, 1988). Des analyses génétiques ont montré que la conversion du phénotype crénelé en phénotype lisse chez *P. atlantica* est due à un réarrangement génomique provoqué par l'excision d'une séquence d'acide désoxyribonucléique (IS49.2) dans le locus contrôlant la production de polysaccharide (Barlett et Siverman, 1989).

Bozzi a donc tenté de prédire la production de polysaccharide en fonction de la morphologie des colonies crénelées ou lisses de la souche 1644. Il a pu montrer qu'il était possible de réduire la variabilité de la souche et que l'utilisation des colonies *crénelées* comme inoculum lors de la fermentation donnait les meilleurs rendements de production du polysaccharide 1644.

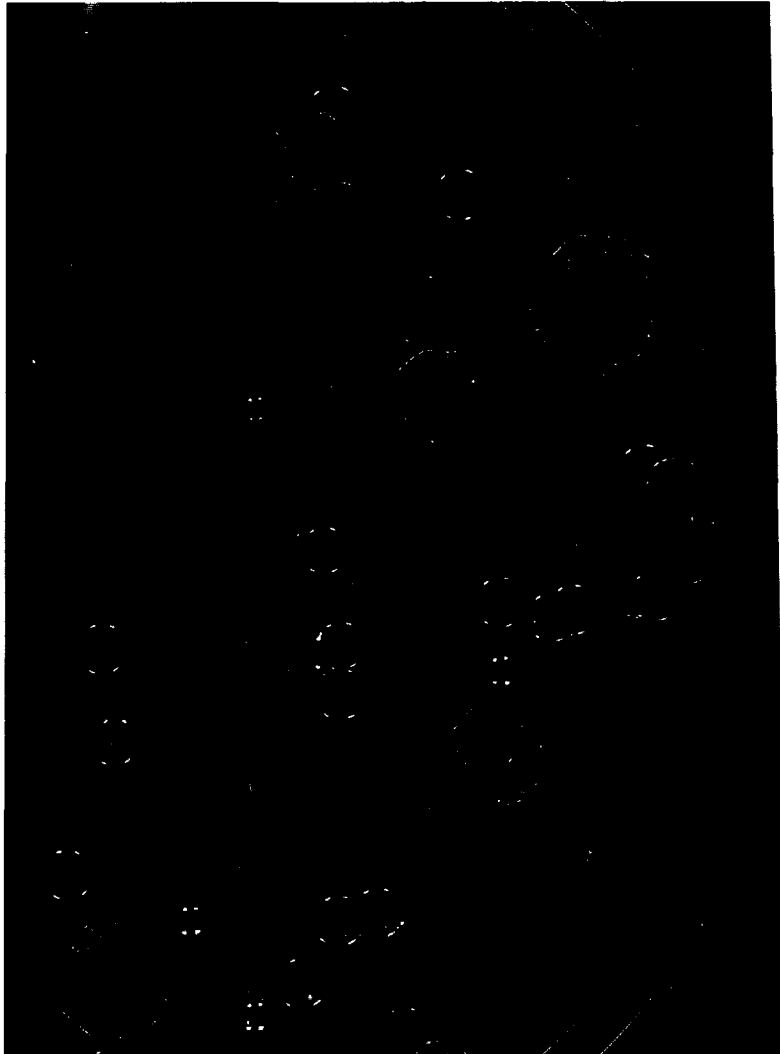


Figure 20: Photographie des colonies lisses et crénelées de la souche 1644 après culture sur boîte de Petri.

La phase exponentielle correspond à l'utilisation des peptones du milieu. Le ralentissement de la croissance s'accompagne d'une consommation lente du glucose. L'exopolysaccharide soluble 1644 est synthétisé exclusivement dans la deuxième partie de la fermentation ; elle commence quand la croissance ralentit. Dans les conditions décrites par Bozzi (1994), la production atteint 5g/l pour un milieu contenant 30g/l de glucose. Après centrifugation du milieu de culture, le surnageant est filtré sur membranes *Sartorius* et ajusté à une concentration en NaCl de 20g/l. L'addition d'éthanol à ce filtrat permet la précipitation du polysaccharide 1644 qui est ensuite lavé et séché pour les études suivantes.

2. PURIFICATION DU POLYSACCHARIDE.

Des dosages colorimétriques (voir le chapitre 3.1 des généralités) effectués sur le polysaccharide 1644 brut, obtenu à partir du moût de fermentation, montrent la présence de 56 % d'hexoses par la méthode utilisant l'orcinol. Les acides uroniques sont estimés à 44 % par la méthode utilisant le carbazol et à 46 % par la méthode au méta-hydroxydiphényl (MHDP). Le polysaccharide contient en outre 0,6% de protéines. La fraction polysaccharidique 1644 brute est donc essentiellement de nature glucidique légèrement contaminée par des protéines. La présence d'une grande quantité d'acides uroniques nous a incité à utiliser une résine échangeuse d'anions (diéthyl-amino-éthyl ou DEAE) pour la purification du polysaccharide 1644.

2.1. Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'anions du polysaccharide brut permet l'isolement de deux sous-fractions (Fig. 21). La détection des sucres lors de l'élution fait appel à la méthode colorimétrique au phénol sulfurique (Dubois *et al.*, 1956).

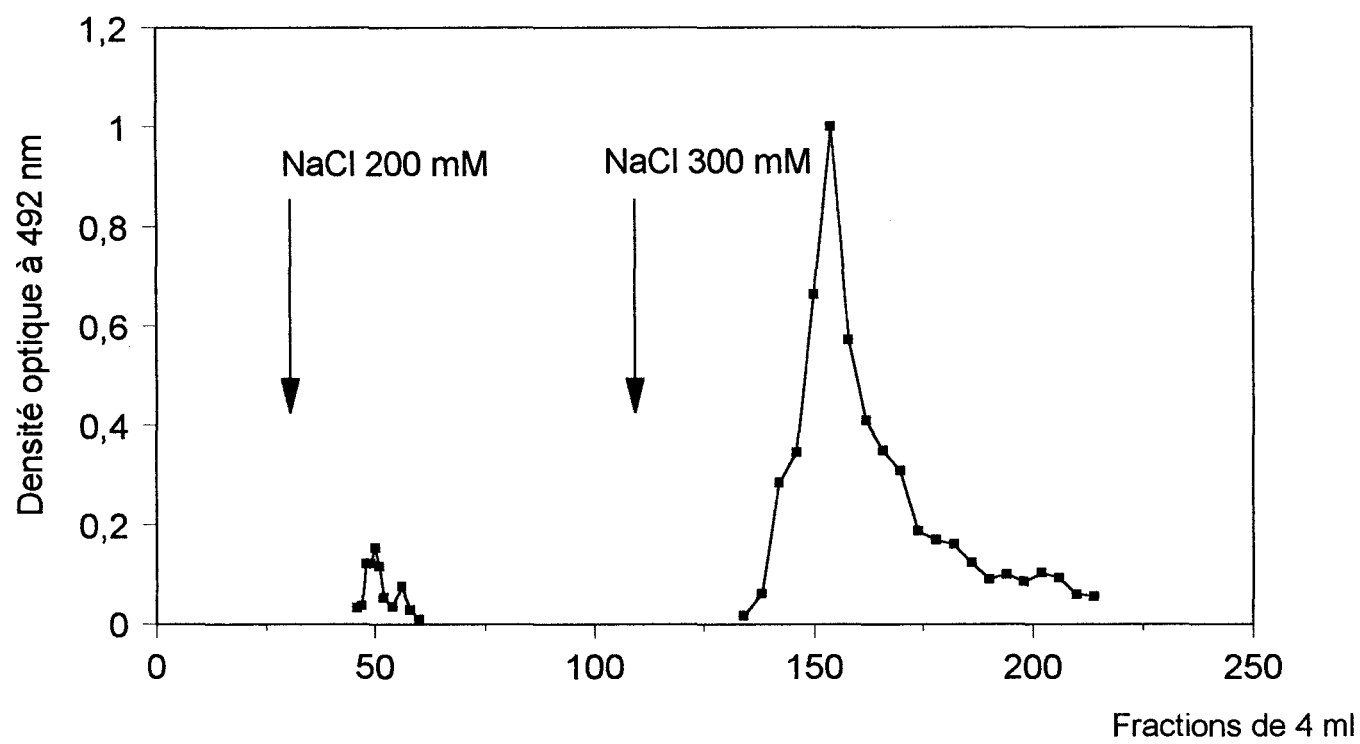


Figure 21: Chromatographie d'échange d'anions de la fraction polysaccharidique brute 1644.

La première sous-fraction obtenue, éluée par une solution de NaCl 200 mM, est minoritaire (7%). Elle est dessalée par dialyse contre de l'eau désionisée. L'analyse d'une aliquote par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et triméthylsilylation indique la présence de rhamnose, mannose, glucose, galactose et d'acide glucuronique.

La fraction majoritaire (93%) est éluée par une solution de NaCl 300 mM. Elle ne comporte plus de protéines et renferme 53% d'hexoses neutres dosés comme précédemment. Elle contient également 47% d'acides uroniques selon la méthode au carbazol (48% après dosage par la méthode au MHDP). L'analyse qualitative d'une aliquote de cette fraction par chromatographie en phase gazeuse indique la présence de glucose, galactose, d'acide glucuronique et d'acide galacturonique.

Des études menées en collaboration avec le CERMAV nous ont permis de remarquer que lors de certaines fermentations, la fraction minoritaire peut atteindre jusqu'à 50% de l'ensemble. Ainsi, *Alteromonas sp.* 1644 est capable de produire deux polysaccharides distincts qui pourraient correspondre aux deux sous-fractions obtenues par chromatographie d'échange d'anion. L'augmentation de la fraction minoritaire est associée à la perte de toutes les propriétés rhéologiques originales intéressantes. En conséquence, seule la fraction majoritaire (éluée par une solution de NaCl 300 mM) a été retenue pour les études structurales, sachant que les conditions de culture pouvaient permettre d'orienter vers sa production préférentielle. Cette fraction est considérée comme étant le polysaccharide 1644 pour la suite de l'étude.

2.2. Chromatographie de gel filtration.

L'homogénéité du polysaccharide 1644 purifié par chromatographie d'échange d'anions a été étudiée par chromatographie de gel filtration. Après passage sur colonne de Sépharose 4B, on obtient une fraction pure et incluse dans le gel. Cette méthode permet aussi de déterminer la masse moléculaire apparente de ce polysaccharide en étalonnant la colonne avec des témoins de dextran. Le report du volume d'éluion du polysaccharide 1644,

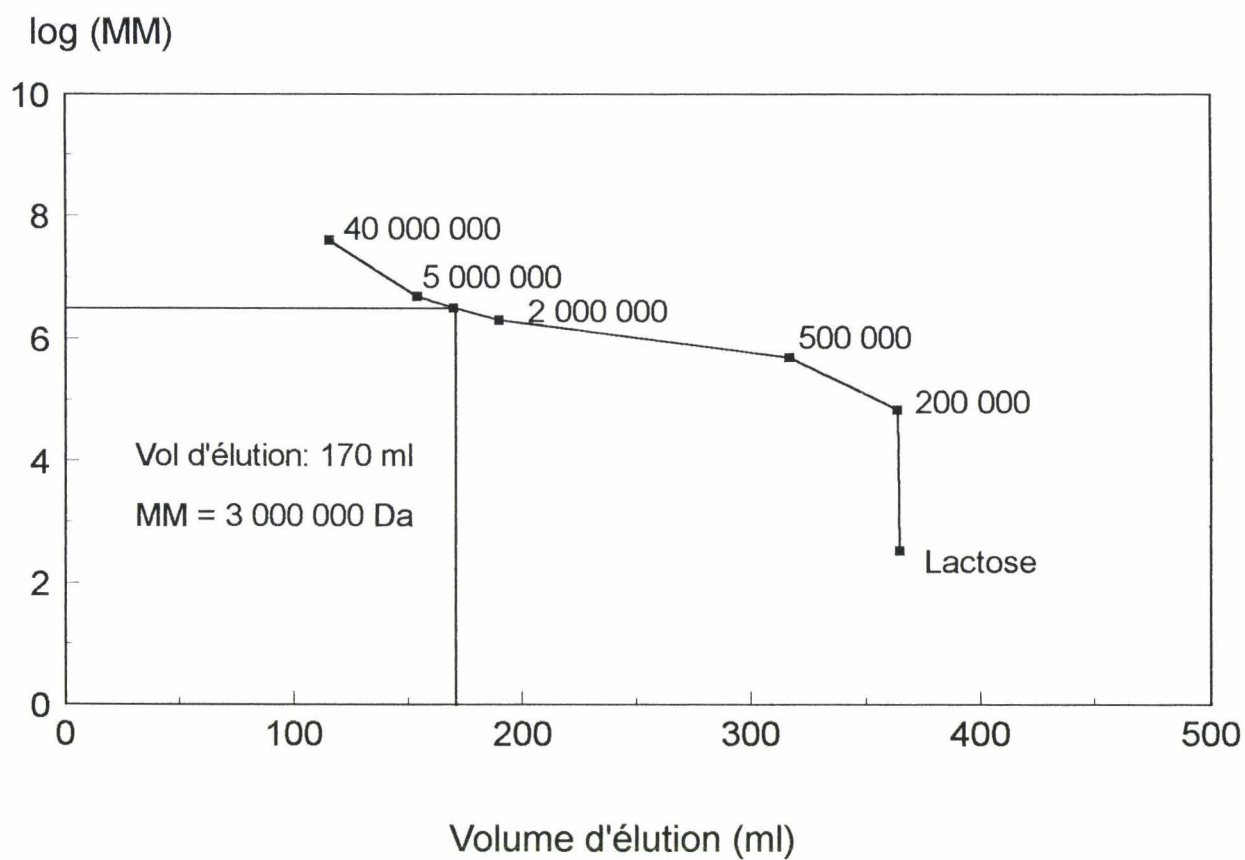


Figure 22: Estimation de la masse moléculaire du polysaccharide 1644 par chromatographie de gel filtration.

correspondant au sommet du pic chromatographique, permet de déterminer une masse moléculaire apparente de 3.10^6 Da (Fig.22).

3. CARACTERISATION PRELIMINAIRE DU POLYSACCHARIDE.

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

Une analyse préliminaire de la composition en sucre du polysaccharide 1644 est obtenue par méthanolyse (méthanol / HCl 0.5 N, 24 h à 80°C) suivie d'une triméthylsilylation. L'analyse du mélange par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Fig.23) met en évidence la présence de galactose, de glucose, d'acide galacturonique, d'acide glucuronique. On observe aussi la présence d'un sucre de structure inconnue ne correspondant à aucun de nos produits de référence et qui se caractérise par deux signaux aux temps de rétention rapportés à celui du méso-inositol de 0.91 et 0.92. Ces signaux sont en fait deux anomères, dont les spectres de masse associés montrent une espèce moléculaire $[M+NH_4]^+$ à m/z 470 correspondant à un monosaccharide de structure inconnue. L'étude de ce composé sera donnée dans le chapitre 4. Les rapports molaires calculés sur la base d'une unité de galactose sont Gal (1,0), Glc (0,92), GalUA (0,26), GlcUA (0,7), sucre de structure inconnue (0,34).

L'analyse des polyols acétates obtenus après hydrolyse du polysaccharide 1644 par l'acide trifluoroacétique (4N, 4h, 100°C), réduction et peracétylation permet d'identifier uniquement les monosaccharides neutres, galactose et glucose, dans les rapports molaires respectifs : 1,0 : 0,94.

Que ce soit pour la méthanolyse ou l'hydrolyse, il est à noter que les rapports molaires en monosaccharides ne reflètent pas la répartition réelle des monomères dans le polysaccharide compte tenu de la stabilité des liaisons uronosidyles.

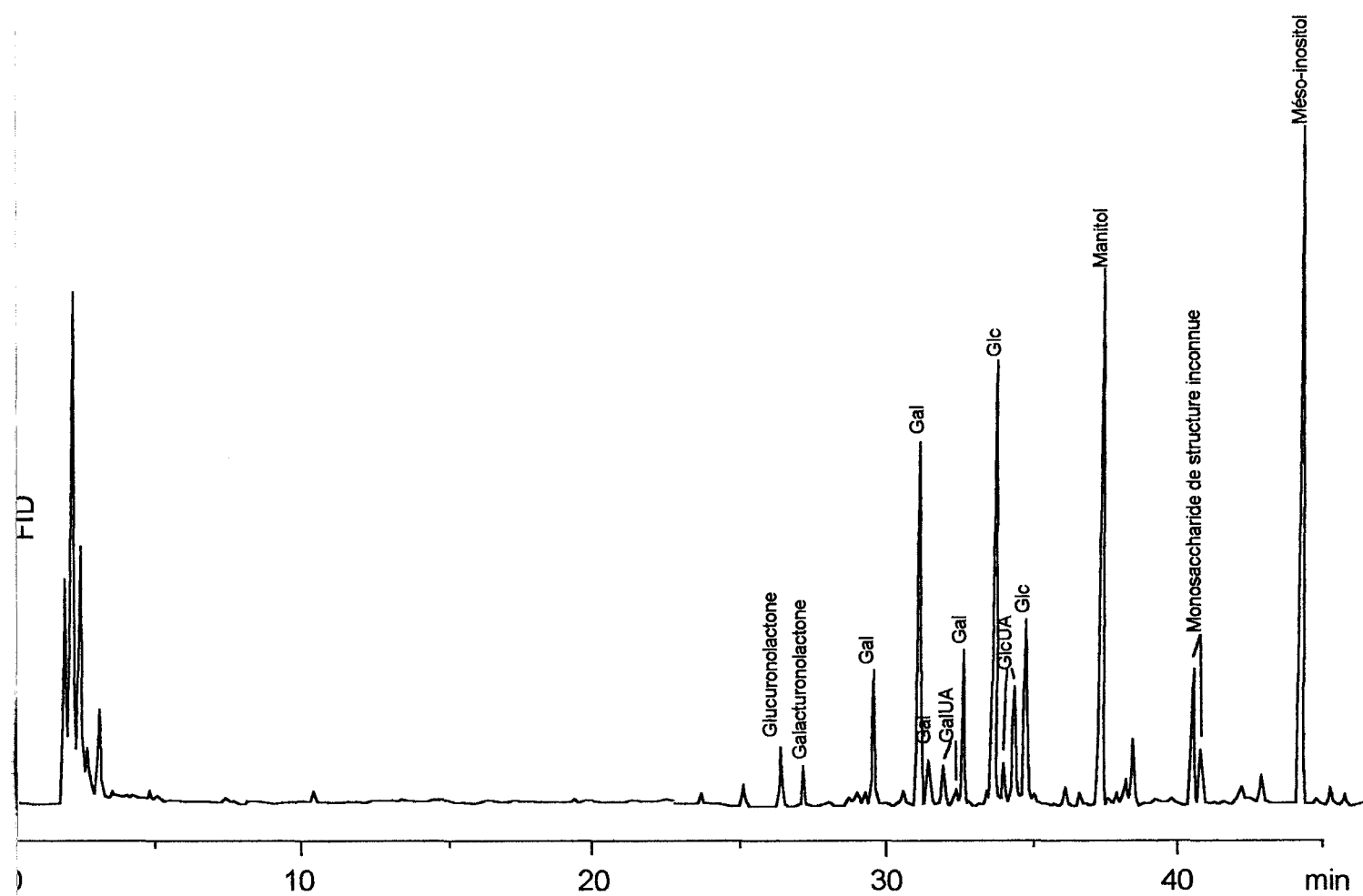


Figure 23: Chromatogramme en phase gazeuse du polysaccharide 1644 après méthanolyse et triméthylsilylation.

3.2. Détermination de la configuration absolue des monosaccharides.

Dans le but d'analyser la configuration absolue des acides uroniques, leur fonction carboxylique est réduite en fonction alcool. L'utilisation d'un borodutérite de sodium (NaBD_4) lors de cette réduction permet de marquer les résidus de galactose et de glucose issus respectivement des acides galacturoniques et glucuroniques. Dans la pratique, les fonctions carboxyliques sont estérifiées par le diazométhane avant réduction. Le polysaccharide 1644 réduit est ensuite hydrolysé par l'acide trifluoroacétique 4N (4h, 100°C). Les monosaccharides libérés sont ensuite convertis en butylglycosides en présence de 2(R)-butanol / HCl 1N puis triméthylsilylés pour être analysés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La comparaison des temps de rétention (Tableaux 1 et 2) des 2(R)-butylglycosides obtenus avec le polysaccharide 1644 et les témoins (L et D glucose et galactose) montre la présence unique de D-glucose et de D-galactose. Les spectres de masse associés aux signaux des butylglucoses et butylgalactoses montrent des espèces moléculaires $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ à m/z 542 et 544. Celles-ci correspondent à des hexoses (glucose, galactose) et à leurs homologues deutérés (glucose- d_2 , galactose- d_2) résultant de la réduction des acides uroniques. De plus, le chromatogramme montre deux signaux dont l'espèce moléculaire $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ est observée à m/z 604 et qui correspondent aux anomères du sucre de structure inconnue.

Le polysaccharide 1644 est donc composé de D-glucose (D-Glc), D-galactose (D-Gal), d'acide D-glucuronique (D-GlcUA), d'acide D-galacturonique (D-GalUA) et d'un sucre de structure inconnue.

Tableau 1: Temps de rétention en GC/MS pour les
(R)-2-butyl glycosides triméthylsilylés témoins.

<i>Témoins</i>	<i>Temps de rétention</i>	$[M+NH_4]^+$
D-glucose	37.2	542
	40.4	542
L-glucose	36.5	542
	40.4	542
D-galactose	33.8	542
	35.7	542
	36.9	542
	37.6	542
L-galactose	34.4	542
	35.1	542
	37.4	542
	37.7	542

Tableau 2: Temps de rétention en GC/MS pour les (R)-2-butylglycosides
triméthylsilylés provenant du polysaccharide 1644 réduit.

<i>Temps de rétention</i>	$[M+NH_4]^+$	<i>Composé</i>
37.2	542 / 544	D-glucose / D-glucose-d ₂
40.3	542 / 544	
33.8	542 / 544	D-galactose / D-galactose-d ₂
35.7	542 / 544	
36.9	542 / 544	
37.6	542 / 544	
44.7	604	Monosaccharide "inconnu" réduit
48.1	604	

4. ETUDE STRUCTURALE DU MONOSACCHARIDE INCONNU.

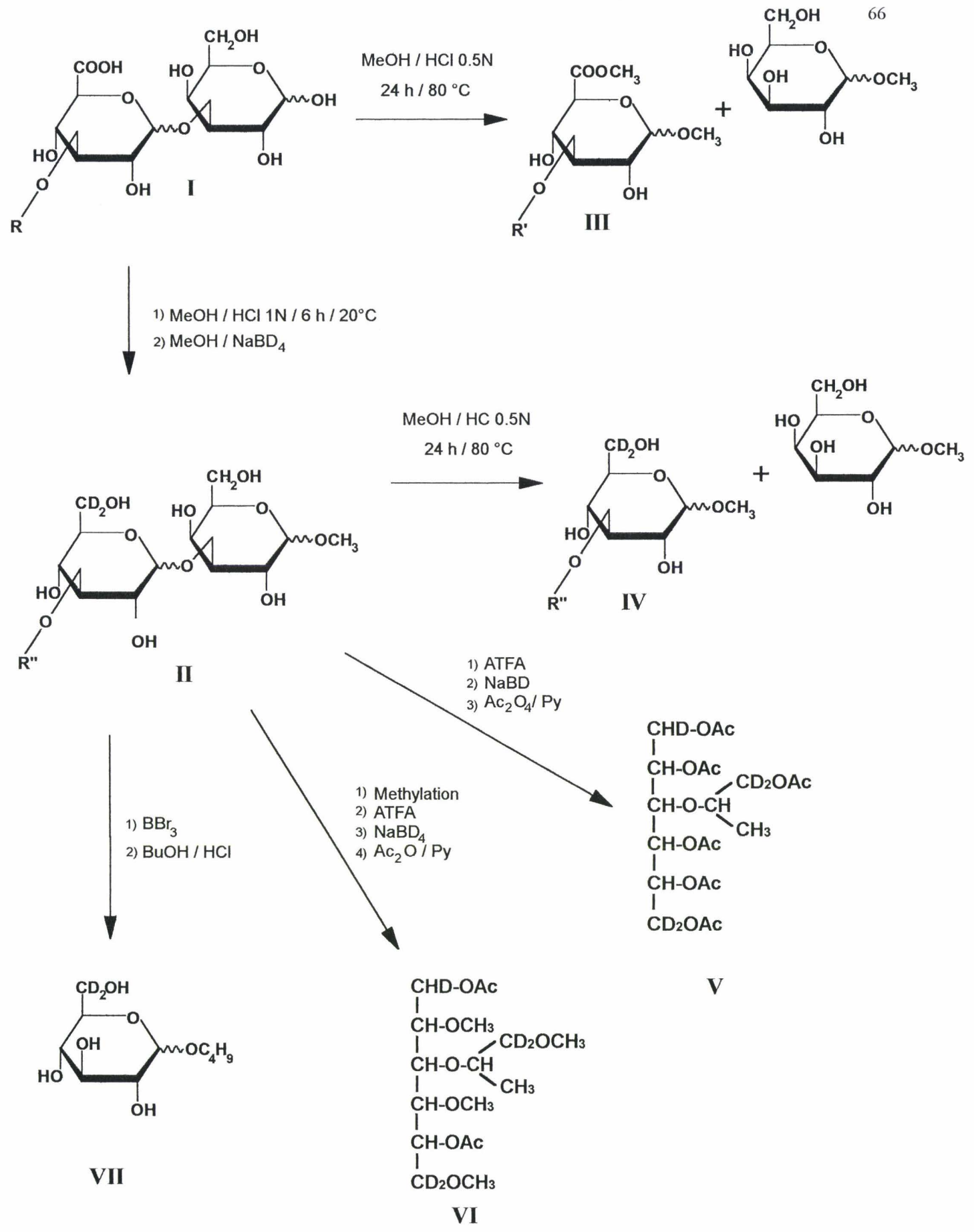
4.1. Isolement.

L'élucidation de la structure du monosaccharide inconnu a nécessité son isolement. Pour cela, le polysaccharide 1644 a été hydrolysé en présence d'acide trifluoroacétique 4N (4 h, 100°C). La chromatographie de l'hydrolysate sur papier Whatman n° 3 dans le solvant acétate d'éthyle / pyridine / acide acétique / eau (5:5:1:3) permet de séparer trois fractions principales. L'analyse de ces fractions par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et triméthylsilylation montre que la première contient les oses neutres libres (Glc et Gal), la seconde les acides uroniques libres (GlcUA et GalUA). La troisième se caractérise par un Rf rapporté au glucose de 0.18 et un Rf rapporté à l'acide galacturonique de 0.31. Elle se compose de Gal, GlcUA, GalUA et du monosaccharide inconnu. Une chromatographie d'échange d'anions à haut pH (système DIONEX) de cette troisième fraction a permis d'isoler deux disaccharides. L'un est composé de l'acide glucuronique et de l'acide galacturonique et l'autre de galactose et du monosaccharide de structure inconnue. C'est ce dernier (noté **I** dans le schéma 1) qui servira à l'étude structurale du monosaccharide inconnu.

Ici encore, la présence de ces disaccharides reflète en fait la stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide.

4.2. Etude structurale.

Dans un premier temps, le disaccharide **I** est carboxyméthylé en présence de méthanol / HCl 1N (6h, 20°C) puis réduit avec du NaBD₄ afin d'obtenir le composé **II** (schéma 1), qui montre par analyse en spectrométrie de masse la présence de 4 atomes de deutérium. Une partie de ce disaccharide carboxyréduit est hydrolysée par de l'acide trifluoroacétique 4N (4h, 100°C), réduite avec NaBD₄ et peracétylée afin d'obtenir deux alditols acétates (1 galactitol et le composé **V**, schéma 1) pour une étude par chromatographie en phase gazeuse couplée à la



$\text{R} = \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2 \quad \text{R}' = \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 \quad \text{R}'' = \text{C}_3\text{H}_7\text{O}-d_2$

Shéma 1: Shéma des différentes méthodes utilisées pour déterminer la structure du monosaccharide inconnu.

spectrométrie de masse. Le spectre de masse en mode d'ionisation chimique (CI) est réalisé avec l'ammoniac comme gaz réactant. Il montre pour l'alditol acétate **V** une espèce moléculaire $[M+NH_4]^+$ à m/z 403, indiquant la présence de 5 atomes de deutérium dont quatre proviennent de la réduction de deux fonctions carboxyliques et le cinquième de la réduction de la fonction aldéhyde. Ce même échantillon est analysé par spectrométrie de masse en mode d'ionisation impact électronique (EI) et donne les fragments suivants à m/z 103, 278, 351, et 378 (fig. 24a), suggérant qu'il s'agit d'un hexitol provenant de la réduction d'un acide hexuronique substitué sur son carbone 3 par un groupement provenant de la réduction d'un acide lactique.

Dans une autre analyse, le composé **II** est perméthylé, hydrolysé avec de l'acide trifluoroacétique 4N (4h, 100°C), réduit avec du NaBD₄ et acétylé pour donner deux alditoles acétates partiellement méthylés : un galactitol et le composé **VI** (voir schéma 1). L'analyse de ces produits par GC/MS confirme la présence d'un acide hydroxy-propionique réduit lié en 3 sur un hexose-*d*₂ non réducteur (Fig. 24b). Cette méthode nous indique en plus la substitution en 3 du galactose situé en position terminale réductrice.

La nature de l'acide hexuronique formant le monosaccharide inconnu est déterminée par le traitement du disaccharide carboxy-réduit **II** avec le BBr₃ afin d'éliminer l'acide lactique réduit. L'analyse par GC/MS de ce mélange réactionnel après méthanolyse et pertriméthylsilylation montre (Fig. 25) la présence de galactose et surtout l'apparition de 6,6-*d*₂-glucose. Ce dernier provient du monosaccharide inconnu réduit et désalkylé. Il est à noter que l'on retrouve sur ce chromatogramme la présence de ce monosaccharide inconnu réduit résiduel, indiquant que la réaction au BBr₃ n'est pas totale.

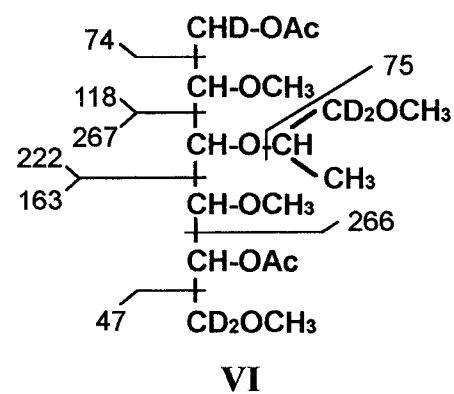
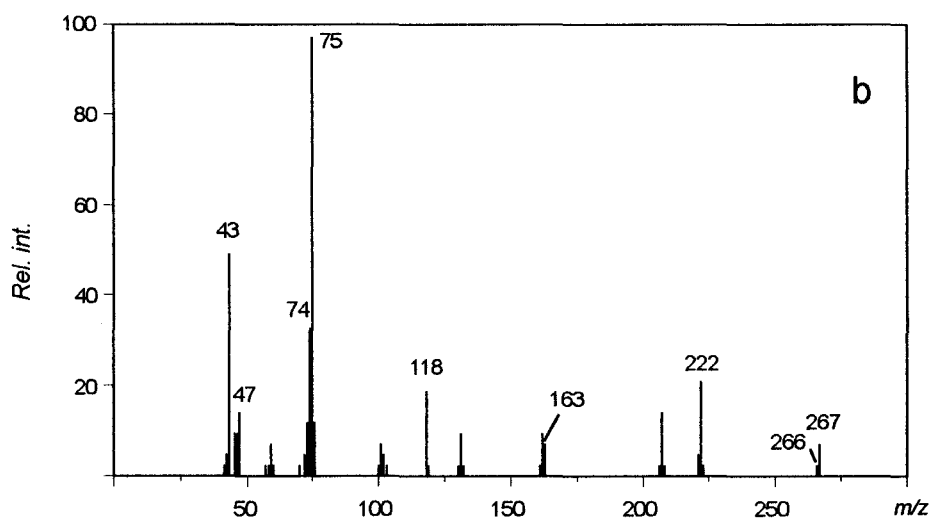
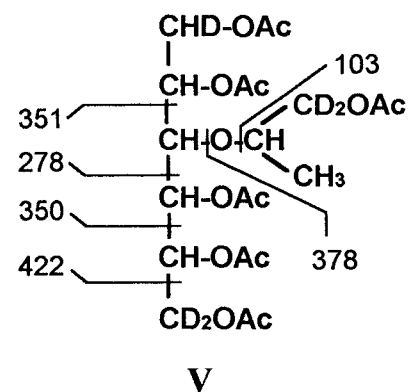
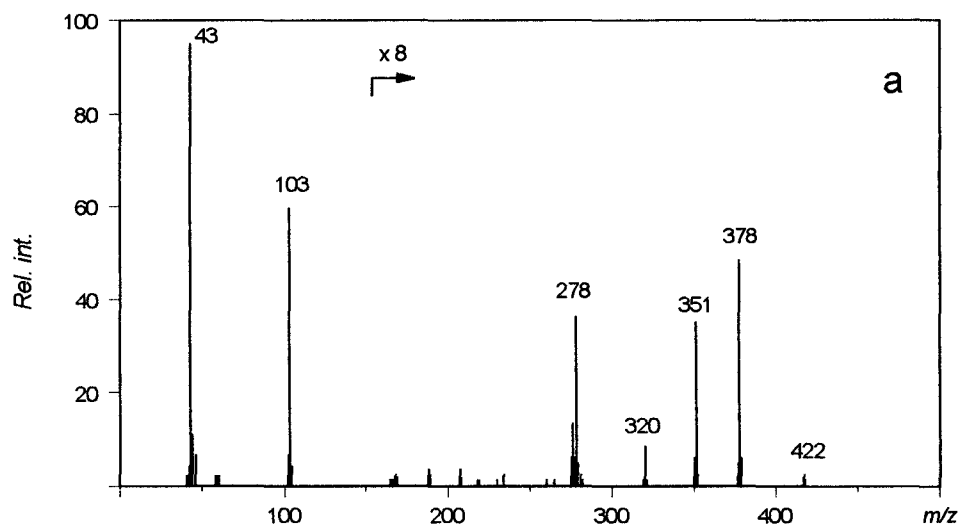


Figure 24: Spectre de masse en impact électronique des composé V (a) et composé VI (b)

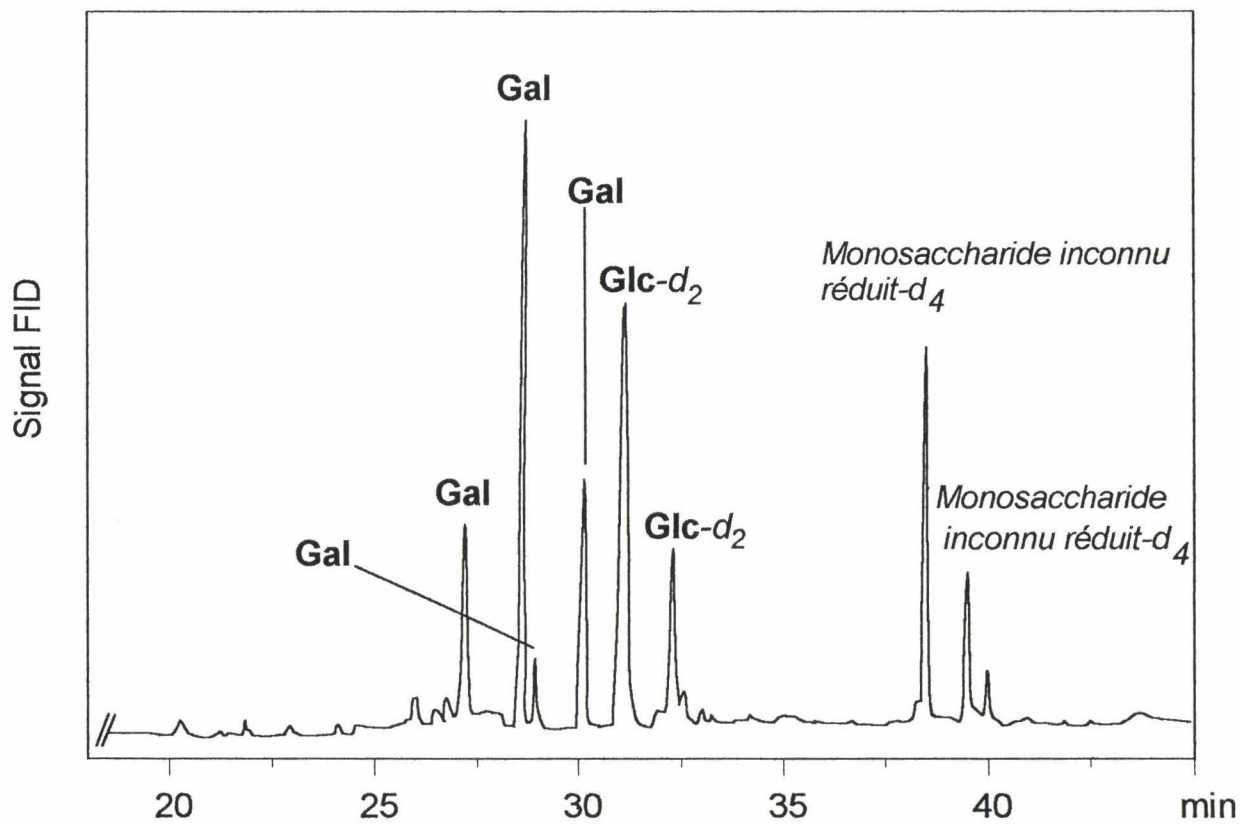


Fig 25: Chromatogramme en phase gazeuse du disaccharide carboxyréduit **II** traité au BBr₃, méthanolysé et triméthylsilylé

La configuration absolue de ce glucose-6,6- d_2 est déterminée par le traitement du disaccharide **II** avec le BBr_3 , suivi d'une solvolysse en présence de (R)-2-butanol / HCl 1N. La comparaison des temps obtenus par GC/MS pour les (R)-2-butylglycosides témoins (Tableau 1 p.64) et pour les (R)-2-butylglycosides provenant du disaccharide **II** traité au BBr_3 (Tableau 3) montre la présence de D-galactose et de D-glucose-6,6- d_2 .

Tableau 3: Données de GC/MS pour les (R)-2-butyl glycoside triméthylsilylés provenant de **II** après désalkylation et butanolyse.

<i>Temps de rétention</i>	$[M+\text{NH}_4]^+$	<i>Composé</i>
37.1	544	D-Glucose- d_2 (VII)
40.4	544	
33.9	542	D-Galactose
35.7	542	
36.9	542	
37.6	542	
44.7	604	Monosaccharide
48.1	604	"inconnu" réduit

La détermination de la configuration absolue du résidu d'acide lactique nécessite la synthèse de références possédant la configuration R ou S de l'acide lactique réduit (schéma 2). Dans un premier temps, le 1,2:5,6-Di-O-isopropylidène-D-glucofuranose (composé **VIII**, schéma 2) est alkylé avec l'acide (S)-2-chloropropionique. Le mécanisme d'alkylation est en fait une substitution nucléophile de type SN_2 avec une inversion de Walden (Matsushima et Park, 1962). Il permet l'obtention du 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucose (composé **IXa** schéma 2).

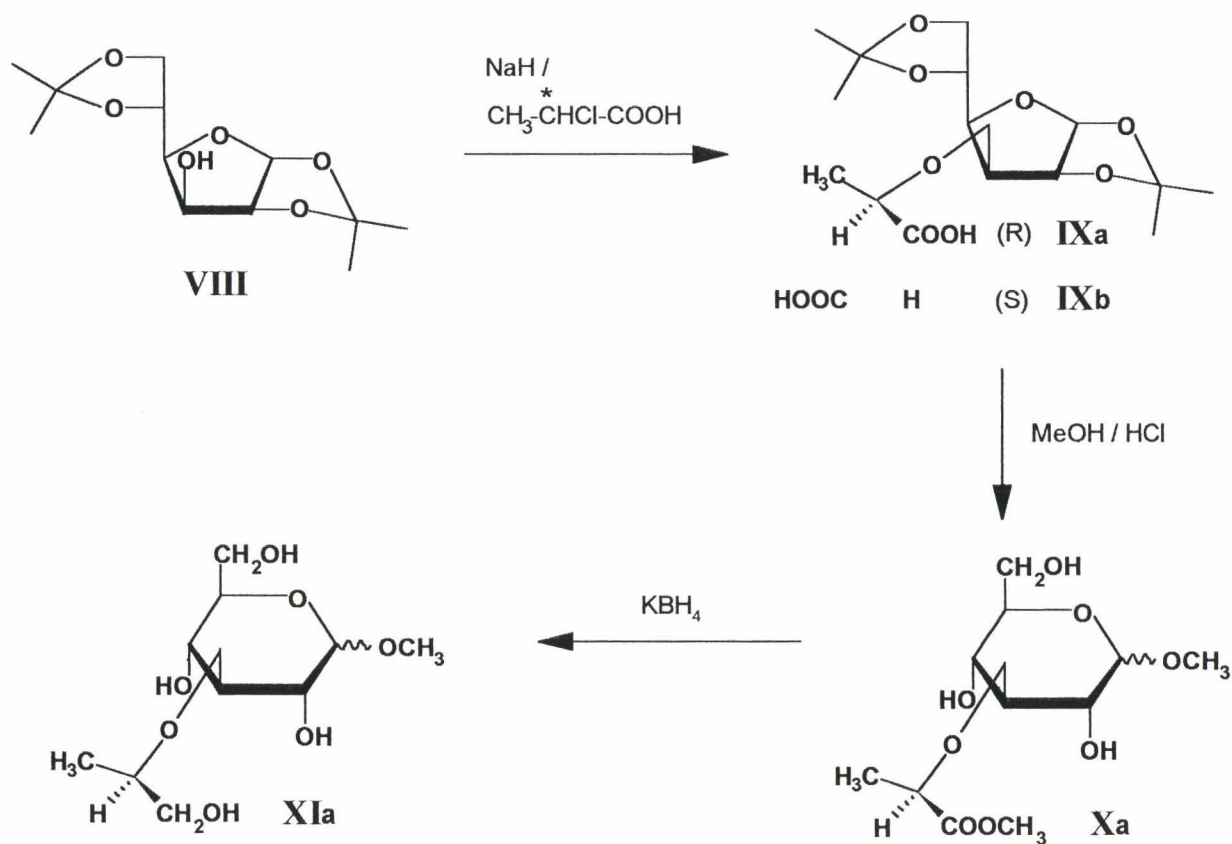


Schéma 2

De la même façon, le diastéréoisomère S (composé **IXb**, schéma 2) est obtenu en faisant réagir l'acide (R)-2-chloropropionique avec le 1,2:5,6-Di-O-isopropylidene-D-glucofuranose. La fonction carboxylique de ces deux diastéréoisomères est alors estérifiée en présence de méthanol/HCl puis réduite avec du KBH_4 pour donner le 3-O-[(R)-2-(1-hydroxy)propyl]-D-glucose (**XIa**) et le 3-O-[(S)-2-(1-hydroxy)propyl]-D-glucose (**XIb**). Ces deux références et le monosaccharide inconnu réduit (**IV**) sont triméthylsilylés et analysés par GC. Les temps de rétention observés à 38.4 et 39.3 minutes pour le monosaccharide inconnu réduit (**IV**) sont parfaitement analogues à ceux des deux anomères du 3-O-[(R)-2-(1-hydroxy)propyl]-D-glucose (**XIa**). Les anomères du 3-O-[(S)-2-(1-hydroxy)propyl]-D-glucose (**XIb**) donnent quant-à eux les temps de rétention 37.4 et 38.7 minutes.

Par conséquent, le monosaccharide de structure inconnue présent dans le polysaccharide produit par la bactérie *Alteromonas sp.* 1644 est un acide 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucuronique. Ce sucre n'a jusqu'à présent jamais été décrit dans la littérature. Par contre, la substitution d'un monosaccharide par un acide lactique a déjà été observée dans plusieurs polysaccharides bactériens (Tableau 4).

Tableau 4: Monosaccharides substitués par un acide lactique présent dans les polysaccharides bactériens.

Monosaccharide	Origine	Référence
4-O-[(S)-1-carboxyéthyl]-D-GlcUA	<i>Klebsiella</i> type 37	<i>a</i>
4-O-[(S)-1-carboxyéthyl]-D-Glc	<i>Aerococcus viridans</i> var. <i>homari</i>	<i>b</i>
4-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-Glc	<i>Klebsiella</i> type 66	<i>c</i>
3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-Glc	<i>Pseudomonas marginalis</i> ATCC 10844	<i>d</i>
4-O-[(S)-1-carboxyéthyl]-D-Man	<i>Mycobacterium lacticolum</i> 121	<i>e</i>
3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-GlcNH ₂	Peptidoglycane	<i>f</i>
3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-ManNH ₂	Peptidoglycane	<i>f</i>

a : Lindberg *et al.* (1976) ; **b** : Kenne *et al.* (1976) ; **c** : Jansson *et al.* (1984) ;

d : Osman et Fett (1993) ; **e** : Kochetkov *et al.* (1979) ; **f** : Kenne *et al.* (1983).

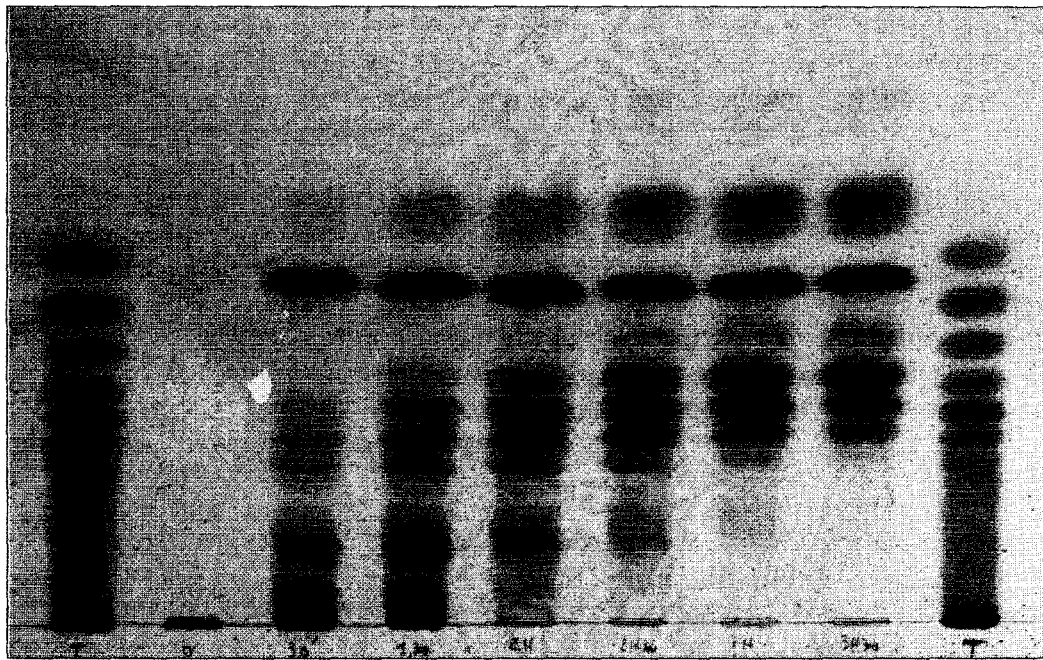
5. CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDES ISSUS DE L'HYDROLYSE PARTIELLE DU POLYSACCHARIDE 1644.

5.1. Préparation des oligosaccharides

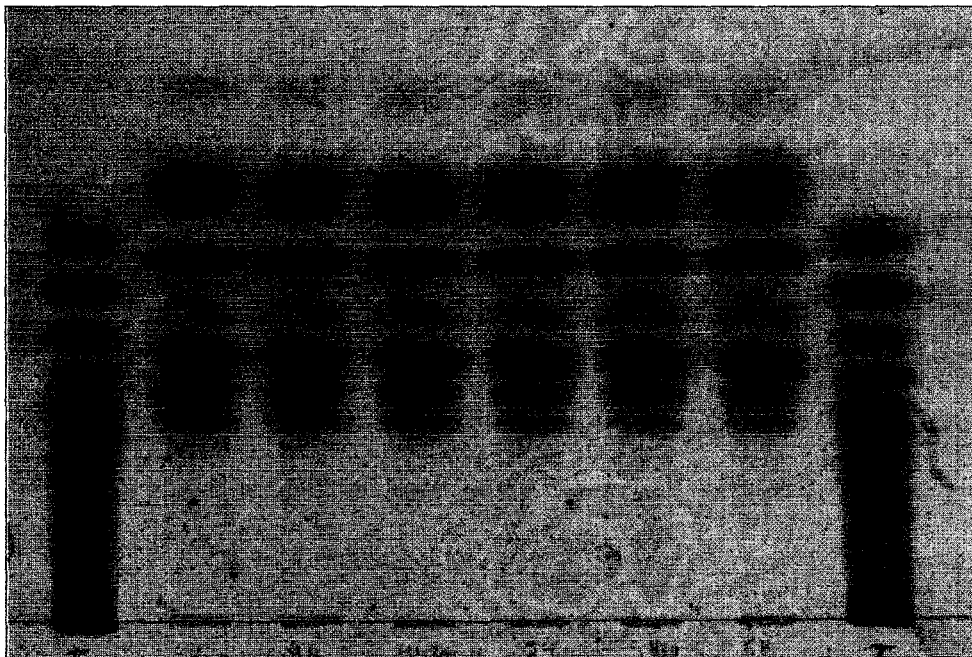
5.1.1. Hydrolyse partielle

Dans le but de déterminer la structure du polysaccharide 1644, nous avons cherché à préparer des oligosaccharides par hydrolyse partielle.

Une cinétique d'hydrolyse par de l'acide trifluoroacétique 2N à 100 °C permet de déterminer le temps de réaction qui donne un maximum d'oligosaccharides. Les échantillons prélevés toutes les trente minutes (durant six heures) sont analysés par chromatographie de partage sur couche mince de silice. Comme le montre la figure 26, après 1h30 d'hydrolyse, la presque totalité du polysaccharide est dépolymérisée. Cette analyse sur cette



T 0' 30' 1h 1h30' 2h 2h30' 3h T



T 3h30' 4h 4h30' 5h 5h30' 6h T

T: témoins glucidex N°19

Figure 26: Cinétique d'hydrolyse, sur couche mince de gel de silice, du polysaccharide 1644 hydrolysé par l'acide trifluoroacétique 2N.

couche mince met en évidence la présence de quatre entités oligosaccharidiques majeures et de deux composés de mobilité chromatographique supérieure correspondant aux monosaccharides neutres et aux acides hexuroniques. Le chromatogramme relativement simple que nous obtenons après quatre heures d'hydrolyse indique l'existence de structures oligosaccharidiques très résistantes à l'hydrolyse et donc certainement riches en acides hexuroniques. La dépolymérisation complète du polysaccharide donnant des oligosaccharides, dont la taille se prête à une analyse structurale, est donc obtenue après 1h30 d'hydrolyse.

5.1.2. Séparation des oligosaccharides

L'hydrolysate obtenu après action de l'acide trifluoroacétique est évaporé en présence de méthanol de façon à éliminer l'acide. Une chromatographie de tamisage moléculaire permet l'élimination des sels résiduels ainsi qu'une première séparation des monosaccharides libres du mélange d'oligosaccharides. La chromatographie d'échange d'anions à haut pH sur une colonne CarboPac PA1 de ce dernier permet d'isoler cinq composés principaux nommés A, B, C, D et E (Fig. 27). La poursuite de l'étude de ces oligosaccharides nécessite l'élimination complète des nombreux sels apportés par l'hydroxyde de sodium et l'acétate de sodium. Les oligosaccharides sont débarrassés des sels de sodium par passage sur une petite colonne de résine échangeuse de cations (Dowex 50 x 8). L'hydroxyde de sodium est ainsi transformé en eau et l'acétate de sodium en acide acétique. Habituellement, un passage sur résine échangeuse d'anions permet d'éliminer l'acide acétique. Mais les acides uroniques des oligosaccharides du 1644 seraient eux aussi piégés par la résine ; c'est pourquoi cette étape est omise dans notre protocole. L'acide acétique est neutralisé par de l'ammoniaque afin d'obtenir un acétate d'ammonium volatil facilement éliminé par lyophilisation. Une étape finale de purification est réalisée par chromatographie d'exclusion sur Biogel P2.

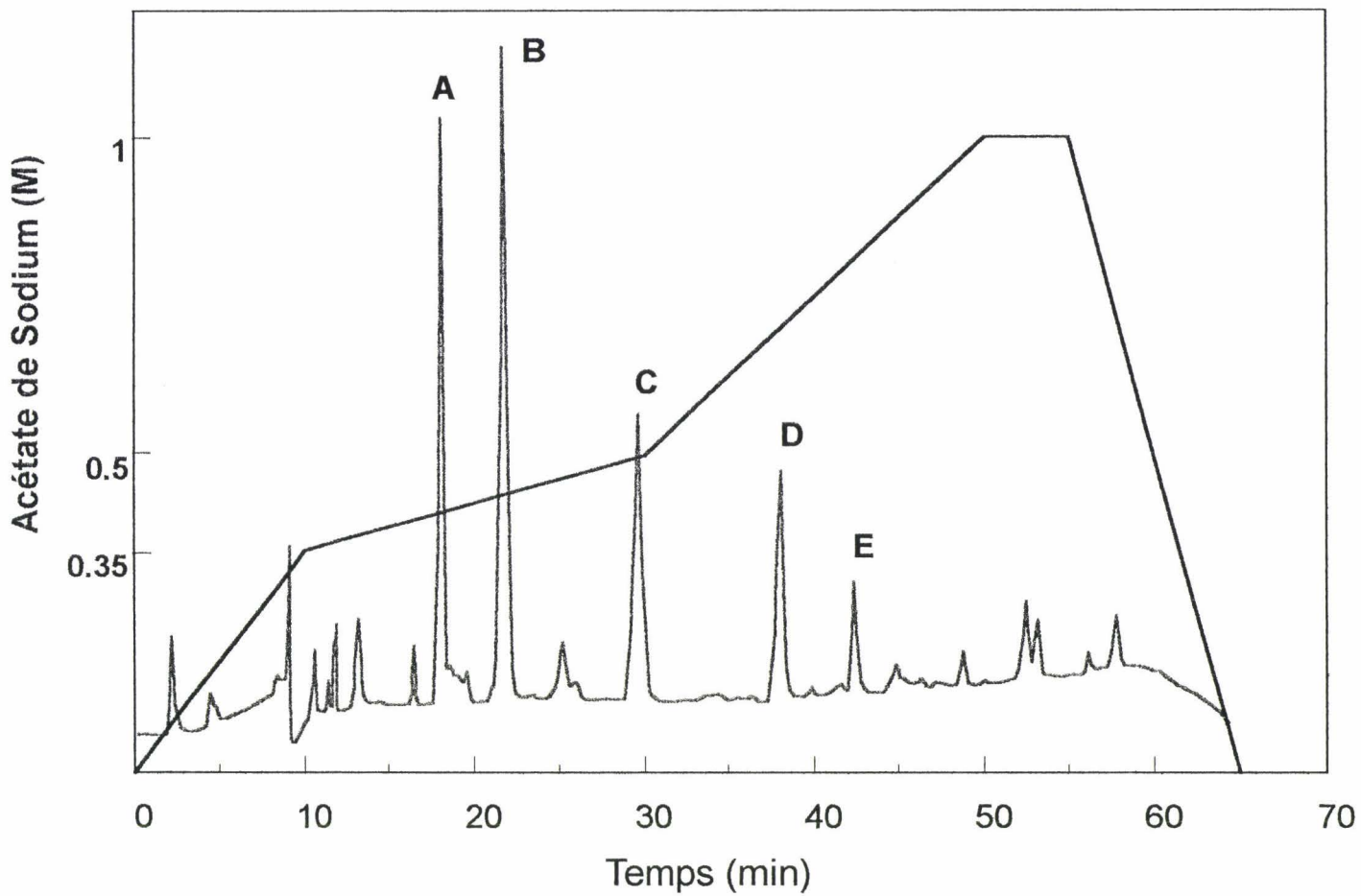


Figure 27: Séparation des oligosaccharides du polysaccharide 1644 par chromatographie d'échange d'anions à haut pH.

5.2. Analyse des oligosaccharides.

5.2.1. Analyse par spectrométrie de masse.

Les oligosaccharides isolés du polysaccharide 1644 sont analysés par spectrométrie de masse FAB (fast atom bombardment) en mode ions négatifs afin de déterminer leur masse moléculaire. Celle-ci nous permet de déduire le nombre et le type (hexose/acide hexuronique) des monosaccharides constitutifs.

Tableau 5: Analyse des oligosaccharides du polysaccharide 1644 par spectrométrie de masse en mode FAB négatif (matrice: glycérol / eau / triéthylamine : 3/2/1).

Oligosaccharide	$[M-H]^-$ m/z	Composition
A	693	2 Hex / 2 HexUA
B	531	1 Hex / 2 HexAU
C	427	1 Hex / 1 Lac-HexUA
D	869	2 Hex / 3 HexAU
E	707	1 Hex / 3 HexAU

Hex : hexose ; HexAU : acide hexuronique ; Lac : acide lactique

Les résultats donnés dans le tableau 5 permettent de classer les oligosaccharides en trois catégories en fonction du nombre d'acides uroniques qu'ils contiennent.

La première catégorie regroupe les oligosaccharides renfermant deux de ces acides. Il s'agit des oligosaccharides A, dont l'espèce moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 693 correspond à un tétrasaccharide composé de deux oses neutres et de deux acides uroniques, et B, dont l'ion moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 531 correspond à un trisaccharide composé d'un ose neutre et de deux acides uroniques.

La deuxième catégorie regroupe les oligosaccharides renfermant trois acides uroniques. Il s'agit des oligosaccharides D, avec une espèce moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 869 correspondant à un pentasaccharide composé de deux oses neutres et de trois acides uroniques, ainsi que E, dont l'espèce moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 707 correspond à un tétrasaccharide composé d'un ose neutre et trois acides uroniques.

La troisième catégorie ne comprend que l'oligosaccharide C dont l'espèce moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 427 correspond à un disaccharide composé d'un ose neutre et d'un acide uronique substitué par un acide lactique.

5.2.2. Détermination de la composition en monosaccharides.

La chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour déterminer de façon précise la composition en monosaccharides. Ainsi l'analyse des méthylglycosides pertriméthylsilylés (Tableau 6) obtenus après méthanolyse des oligosaccharides et triméthylsilylation permet d'identifier les oses neutres (glucose et galactose), les acides uroniques (acide galacturonique et glucuronique) et l'acide 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucuronique. L'hydrolyse par le méthanol / HCl 0.5N (80 °C, 24 h) permet de libérer seulement 30 à 40 % des monosaccharides, cette estimation étant réalisée par comparaison avec le méso-inositol comme standard interne. Ce faible rendement de libération est la conséquence de la présence d'acides uroniques car, comme indiqué ci-dessus, la liaison uronosidyle est relativement stable.

La composition en monosaccharides est également réalisée après hydrolyse de l'oligosaccharide à l'acide trifluoroacétique (4N, 4h, 100°C). L'analyse des monosaccharides libres, réduits avec du KBH_4 et peracétylés (Tableau 7) confirme le dosage des oses neutres obtenu par méthanolyse. Cependant, cette dernière méthode ne permet pas l'identification et la

quantification des acides uroniques car la présence d'une fonction carboxylique rend ces composés trop polaires pour être analysés en phase gazeuse.

Tableau 6 : Composition molaire des méthylglycosides triméthylsilylés libérés à partir des oligosaccharides du 1644

Oligosaccharide	Gal	Glc	GalUA	GlcUA	Lac-GlcUA	Rendement de méthanolyse (%) *
A	1.0	1.2	0.64	0.85	-	42
B	1.0	-	0.75	0.89	-	38
C	1.0	-	-	-	1.0	31
D	1.0	1.4	0.38	1.5	-	40
E	1.0	-	0.42	1.6	-	30

* : Le rendement de méthanolyse est mesuré par comparaison avec un standard interne (mésositol).

Tableau 7: Composition molaire des polyols acétates issus des oligosaccharides du 1644.

Oligosaccharide	Gal	Glc	Rendement d'hydrolyse (%)*
A	1	0.94	27
B	1	-	13
C	1	-	9
D	1	1.05	12
E	1	-	26

* : Le rendement d'hydrolyse est mesuré par comparaison avec un standard interne (mésositol).

La spectrométrie de masse FAB en mode négatif des oligosaccharides natifs donne des renseignements sur leur taille et sur le type des monosaccharides constitutifs (ose neutre ou acide hexuronique). Par contre, si la chromatographie en phase gazeuse donne la nature des monosaccharides constitutifs (Glc, Gal, GlcUA, GalUA ou 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-GlcUA), les rapports stoechiométriques sont faussés par les mauvais rendements de méthanolyse ou d'hydrolyse.

Seule la combinaison des résultats obtenus par ces deux méthodes peut, en fait, fournir la composition précise en monosaccharides de ces oligosaccharides.

- Oligosaccharide A: Gal / Glc / GalUA / GlcUA
- Oligosaccharide B: Gal / GalUA / GlcUA
- Oligosaccharide C: Gal / 3-Lac-D-GlcUA
- Oligosaccharide D: Gal / Glc / GalUA / GlcUA / GlcUA
- Oligosaccharide E: Gal / GalUA / GlcUA / GlcUA

6. MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE POUR L'ANALYSE

STRUCTURALE D'OLIGOSACCHARIDES COMPOSES D'ACIDES URONIQUES

L'analyse structurale des oligosaccharides possédant des acides uroniques ne peut se faire de façon classique par les techniques de spectrométrie de masse couplée ou non à la chromatographie en phase gazeuse. En effet, la présence d'acides uroniques peut entraîner des problèmes lors de la méthylation ou de la solvololyse.

Comme nous l'avons cité (chapitre 3 des généralités), la méthylation des acides uroniques peut conduire à un phénomène appelé " β -élimination" (Lindberg *et al.*, 1975). Rappelons qu'une fonction carboxylique sous forme d'ester est un centre électroattracteur qui, en présence d'une base, provoque la dégradation de l'acide uronique estérifié et conduit à la libération du substituant en C4. Ce phénomène peut donner des informations d'ordre structural comme la nature de la substitution en 4 ou encore être utilisé comme technique de

dépolymérisation. Mais il peut également compliquer les analyses en donnant un mélange d'oligosaccharides perméthylés et de produits secondaires.

Le second problème lié à la présence des acides uroniques est la stabilité de la liaison uronosidyle qui empêche la libération quantitative de ces derniers lors de la méthanolyse ou de l'hydrolyse.

Pour ces différentes raisons, nous avons donc développé une stratégie d'analyse structurale basée sur la réduction des acides hexuroniques en hexoses. Les oligosaccharides obtenus ne sont plus susceptibles de donner lieu à une réaction de β -élimination et leurs liaisons glycosidiques peuvent être facilement clivées. L'utilisation de borodutériure de sodium lors de la réduction de la fonction carboxylique estérifiée permet de marquer par deux atomes de deutérium les hexoses provenant des acides hexuroniques. Ces hexoses- d_2 sont alors facilement identifiables par spectrométrie de masse.

6.1. Dérivation.

La méthodologie développée pour notre analyse repose essentiellement sur le couplage de l'oligosaccharide avec une molécule d'aniline (dérivation) afin de le rendre lipophile et détectable en UV. Cet oligosaccharide peut alors subir une réduction de ses acides uroniques en hexoses deutérés puis être facilement purifié par chromatographie liquide haute performance sur phase inversée avec une détection UV.

6.1.1. Dérivation par amination réductive.

La dérivation consiste à coupler l'oligosaccharide à une molécule d'aniline par amination réductive. Lors de cette réaction, la fonction aldéhyde libre de l'oligosaccharide réagit avec la fonction amine de l'aniline pour former une base de Schiff. L'utilisation d'un agent réducteur tel que le complexe borane-diméthylamine permet ensuite la réduction de cette base de Schiff en une amine secondaire stable (schéma 3). Enfin, une chromatographie sur

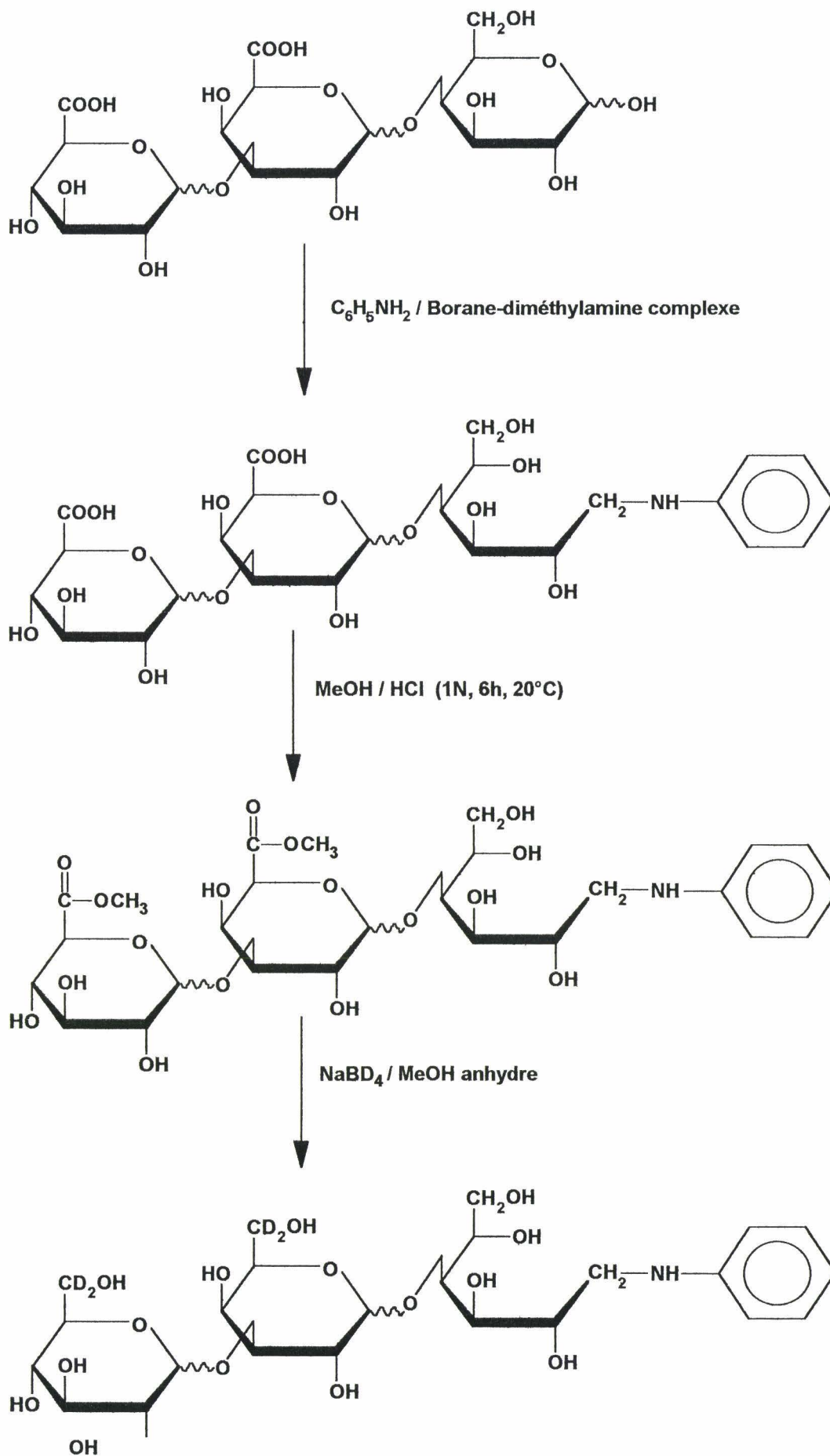
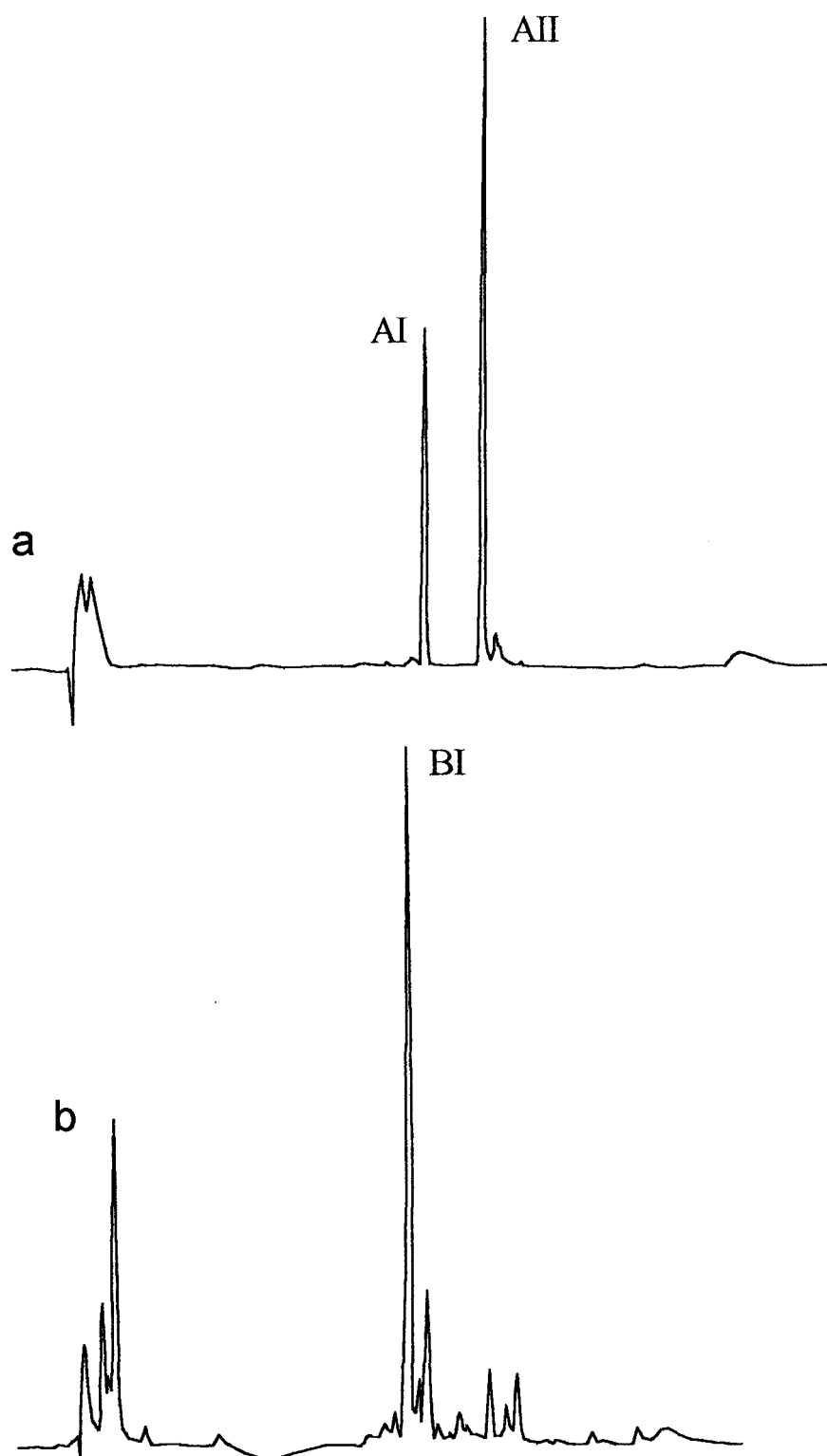


Schéma 3: Dérivation des oligosaccharides et conversion des acides uroniques en hexoses.

papier Whatman N° 3 dans le solvant n-butanol/éthanol/eau (4/1/1) permet de séparer l'oligosaccharide couplé de l'excès de réactif restant dans le milieu réactionnel.

6.1.2. Conversion des acides uroniques en hexoses.

La fonction carboxylique des acides uroniques est activée par estérification en présence de méthanol/HCl 1N (6h, 20°C) (Fazio *et al.*, 1982). La réduction est réalisée dans le méthanol anhydre en présence de borodeutérure de sodium. L'arrêt de la réduction se fait par addition d'acide acétique jusqu'à la destruction complète de l'excès de borodeutérure de sodium (schéma 3). L'excès de borate est éliminé sous forme d'esters par évaporation en présence de méthanol. Une chromatographie liquide à haute performance sur phase inversée permet ensuite l'élimination des sels résiduels et surtout l'obtention d'un oligosaccharide pur complètement réduit. En effet, la réduction des acides uroniques est complète pour les oligosaccharides B, C et E mais partielle pour A et D. Ainsi, la chromatographie liquide haute performance de l'oligosaccharide B après réduction (Fig. 28b) donne un seul produit **BI** pour lequel l'analyse en spectrométrie de masse désorption laser donne une espèce moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 608 qui correspond à l'oligosaccharide entièrement carboxyréduit. Par contre, l'analyse par chromatographie liquide haute performance de l'oligosaccharide A après réduction montre deux composés **AI** et **AII** (Fig. 28a). Le premier (**AI**) correspond à l'oligosaccharide A couplé et entièrement réduit par le borodeutérure de sodium. Le second composé (**AII**) correspond à l'oligosaccharide A couplé et partiellement réduit. Son analyse par spectrométrie de masse désorption laser donne une espèce moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 796 correspondant à un tétrasaccharide couplé à l'aniline et constitué de deux hexoses, d'un hexose deutéré et d'un acide hexuronique carboxyméthylé. La présence d'un méthyl explique le retard d'élution sur phase inversée de l'oligosaccharide **AII** comparativement à l'oligosaccharide **AI**. Une analyse de ce composé **AII** par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et



AI: Glc / Glc-*d*2 / Gal-*d*2 / Gal / aniline

AII: Glc / Glc-*d*2 / GalAU(CH₃) / Gal / aniline

BI: Glc-*d*2 / Gal-*d*2 / Gal / aniline

Figure 28: Chromatographie liquide haute performance sur phase inversée de l'oligosaccharide A (a) et de l'oligosaccharide B (b) après réduction des acides uroniques

triméthylsilylation révèle que seul l'acide galacturonique résiste à la réduction. Cette réduction partielle estimée à environ 40 % concerne aussi l'oligosaccharides D.

L'analyse par spectrométrie de masse désorption laser de tous les oligosaccharides couplés et carboxyréduits est donnée dans le tableau 8.

Tableau 8: Analyse des oligosaccharides couplés et carboxyréduits par spectrométrie de masse désorption laser (matrice : acide 2,5-dihydroxybenzoïque)

Oligosaccharide	$[M+Na]^+$ m/z	Composition
A	770	2 Hex / 2 Hex- d_2 / aniline
B	608	1 Hex / 2 Hex- d_2 / aniline
C	658	1 Hex / 1 Hex- d_2 (hydroxy-propyl- d_2) / aniline
D	934	1 Hex / 3 Hex- d_2 / aniline
E	772	2 Hex / 3 Hex- d_2 / aniline

Hex : hexose ; Hex- d_2 : hexose deutéré

6.1.3. Perméthylation.

Les oligosaccharides dérivés et réduits sont perméthylés de façon classique en présence d'hydroxyde de sodium (Ciucanu et Kerek, 1984) afin d'en analyser la séquence et les liaisons interglycosidiques. La présence d'un atome d'azote apporté par l'aniline nécessite une N-acétylation préalable des oligosaccharides afin d'éviter la formation d'un ammonium quaternaire $[R_2R_1N(CH_3)_2]^+$ lors de la méthylation. Cette N-acétylation est effectuée dans le méthanol anhydre en présence d'anhydride acétique pendant 6 heures à température ambiante. Les réactifs sont ensuite éliminés sous courant d'azote.

6.2. Analyse des dérivés perméthylés par spectrométrie de masse en tandem.

La spectrométrie de masse en tandem en mode électrospray (ESMS/MS) des oligosaccharides perméthylés permet de générer des fragments pouvant nous informer sur la séquence des monosaccharides. Une première analyse ESMS en mode positif permet d'identifier les espèces moléculaires $[M+Na]^+$ et $[M+H]^+$. Les espèces moléculaires $[M+H]^+$ sont sélectionnées pour l'analyse MS/MS. Dans ces conditions, les fragments sont générés par rupture de la liaison glycosidique avec ou sans transfert de l'hydrogène, suivant le mécanisme décrit dans la figure 29, pour donner les ions de type B et Y. Dans notre étude, les différents fragments obtenus par spectrométrie de masse ont été nommés selon la nomenclature proposée par Domon et Costello (1988). Les fragments B correspondent à la partie terminale non réductrice de l'oligosaccharide, alors que les fragments Y correspondent à la partie terminale réductrice. L'indice utilisé indique la position du fragment dans la séquence. Enfin, les deux nominations α et β sont utilisées si l'oligosaccharide est ramifié.

Dans notre étude, les fragments Y posséderont toujours l'aniline et les hexoses- d_2 correspondront à des acides uroniques réduits.

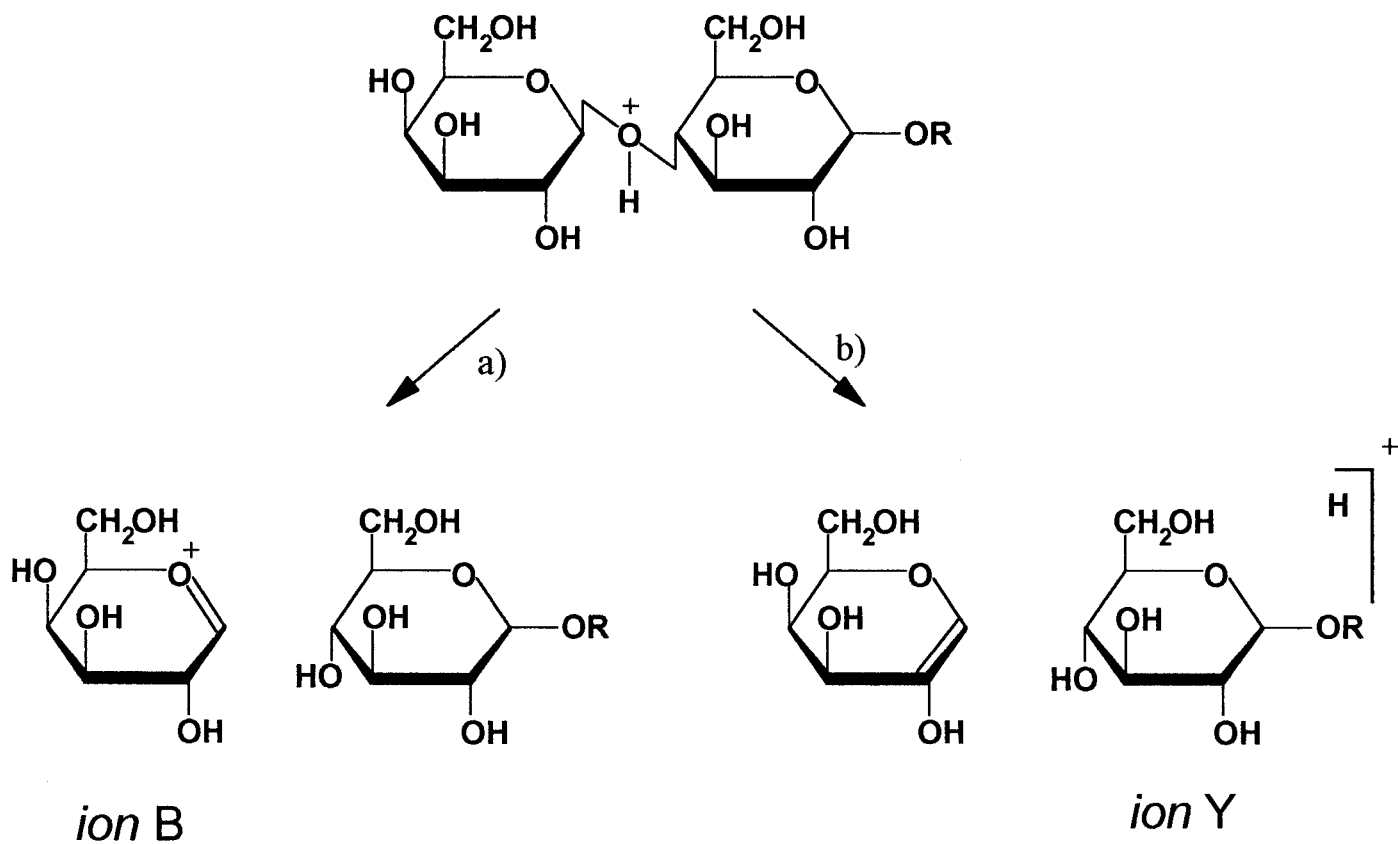


Figure 29: Schéma de fragmentation des oligosaccharides.

a) rupture de la liaison glycosidique

b) rupture de la liaison glycosidique avec transfert d'hydrogène.

Oligosaccharide C:

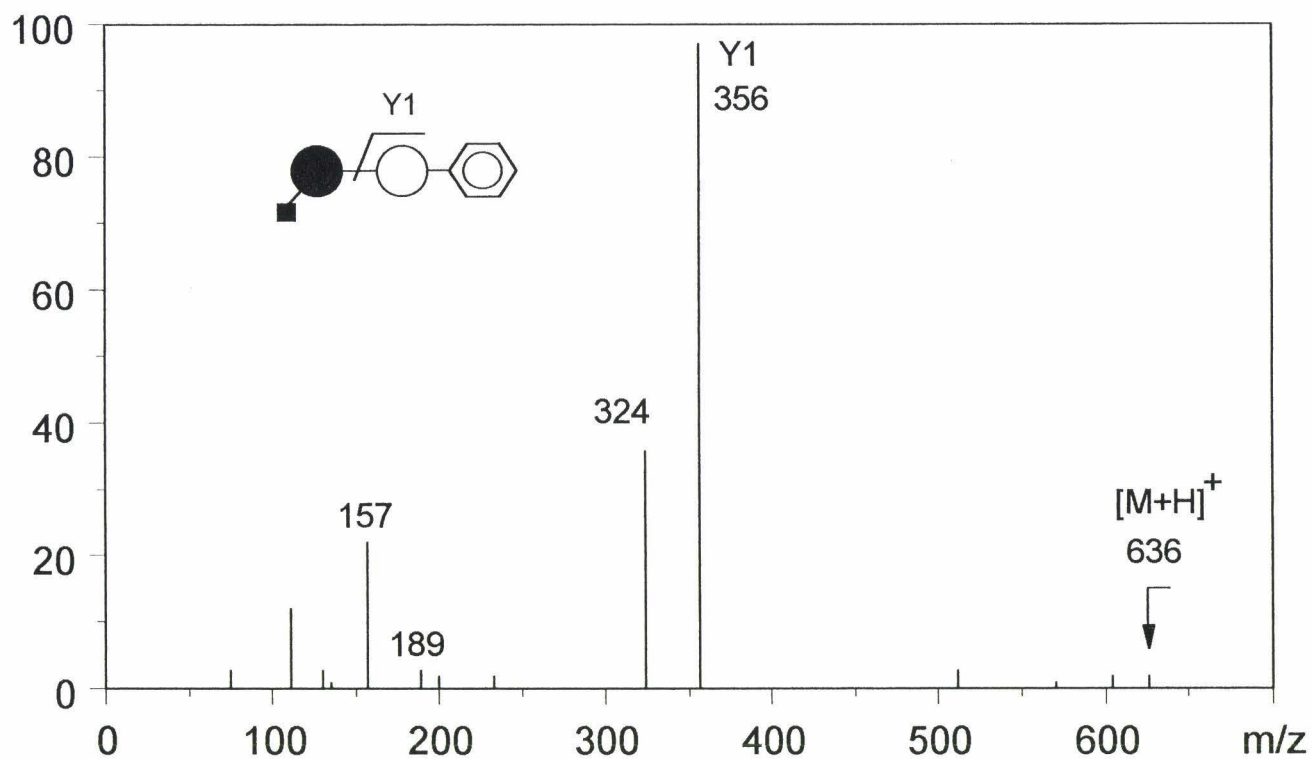
Le spectre MS/MS de l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 636 montre (Fig. 30) l'ion à m/z 356 correspondant au fragment Y_1 permettant de conclure à la présence d'un hexose- d_0 couplé à l'aniline. On ne retrouve pas sur le spectre l'ion B_1 correspondant à un hexose- d_2 substitué par un acide lactique réduit et deutéré. En fait, ce résidu d'acide lactique réduit est éliminé lors de la fragmentation de l'ion B_1 en ions secondaires à m/z 189 et 157 caractéristiques d'un Hex- d_2 .

Le spectre donné dans la figure 30 propose la séquence suivante pour l'oligosaccharide C:
3-O-[(S)-2-(1-hydroxy)propyl- d_2]-Hex- d_2 -Hex-aniline

Oligosaccharide B :

Le spectre ESMS/MS (Fig. 31b) montre l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 782. Ce spectre est aussi caractérisé par les ions à m/z 221 et 427, correspondant aux fragments B_1 (Hex- d_2) et B_2 (Hex- d_2 -Hex- d_2). Les ions à m/z 356 et 562 peuvent être assignés aux fragments Y_1 (Hex-aniline) et Y_2 (Hex- d_2 -Hex-aniline). Ces deux séries complémentaires de fragments permettent d'assigner sans ambiguïté la séquence linéaire complète suivante :

Hex- d_2 -Hex- d_2 -Hex-aniline



Pour toutes les analyses ESMS/MS nous utiliserons les symboles suivants:

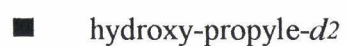
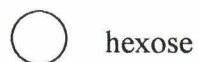


Figure 30: Spectre ESMS/MS de l'oligosaccharide C, couplé à l'aniline, réduit, N-acétylé et perméthylé, ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 636.

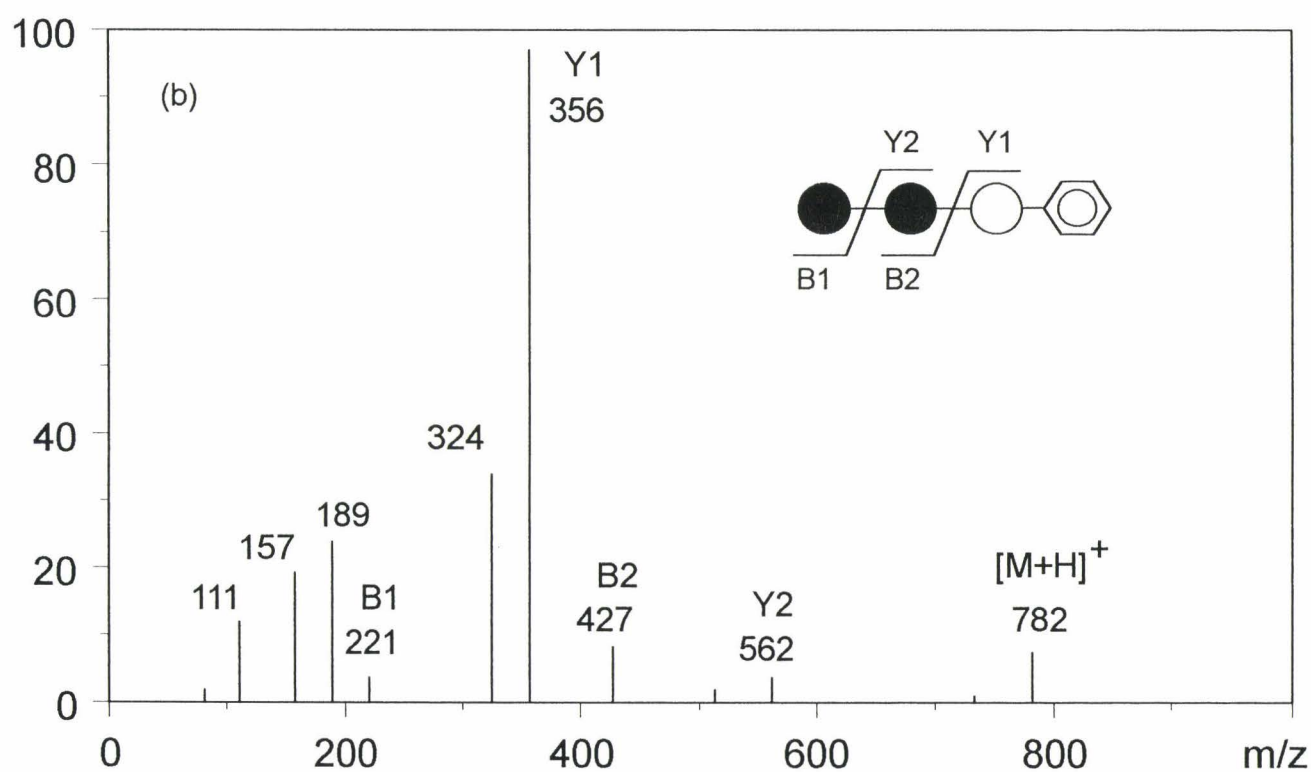
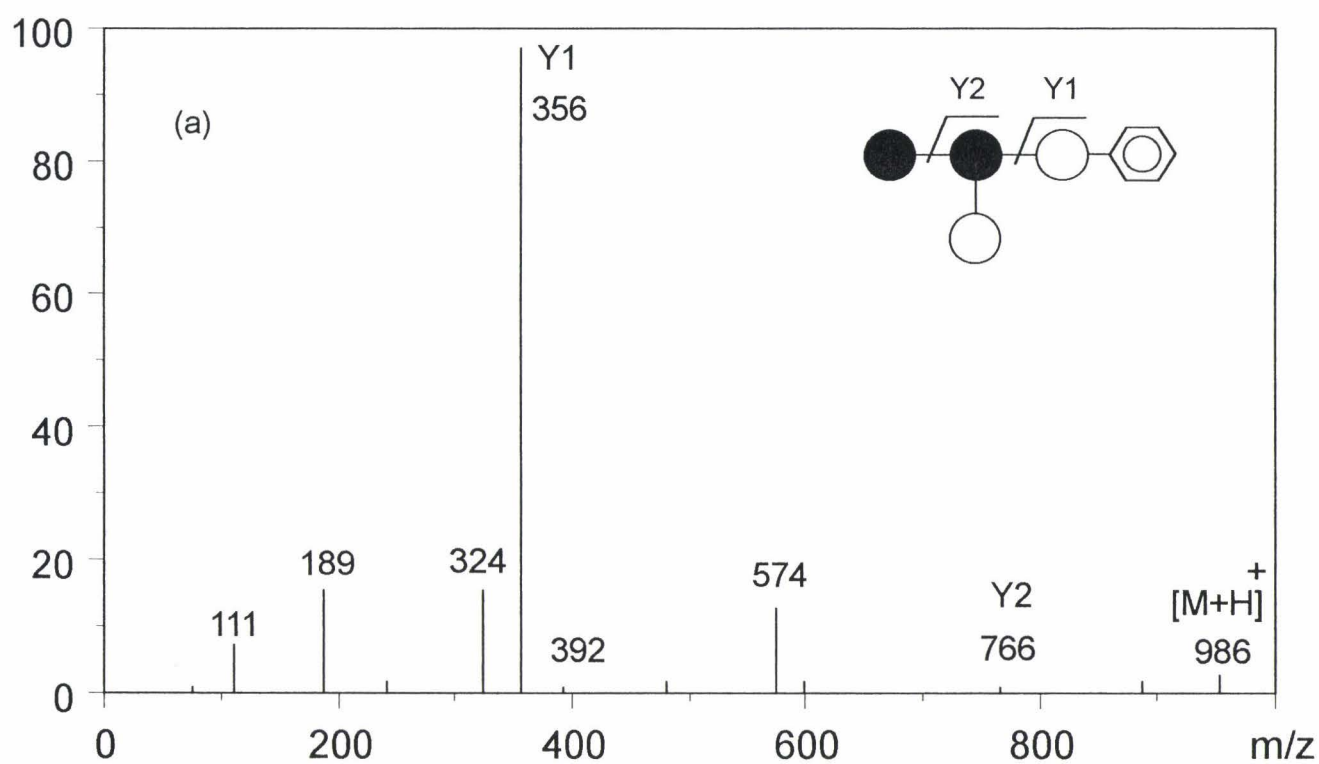


Figure 31: Spectres ESMS/MS des oligosaccharides A (a) et B (b), couplés à l'aniline, réduits, N-acétylés et perméthylés. Ions précurseurs $[M+H]^+$ à m/z 986 (a) et 782 (b)

Oligosaccharide A :

Le spectre MS/MS de l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 986 montre (Fig. 31a) les ions à m/z 356 et 766 correspondant aux fragments Y1 Hex-Aniline et Y2 [Hex] hex- d_2 -Hex-Aniline

Ces fragments et l'absence d'une série régulière « équidistante » complète permettent de supposer une structure ramifiée pour cet oligosaccharide: Hex- d_2 -[Hex]Hex- d_2 -Hex-Aniline

Oligosaccharide E :

Le spectre ESMS/MS (Fig. 32e) montre l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 988. Nous pouvons aussi observer les ions à m/z 221, 427 et 633 correspondant aux fragments B₁ (Hex- d_2), B₂ (Hex- d_2 -Hex- d_2) et B₃ (Hex- d_2 -Hex- d_2 -Hex- d_2). Les ions à m/z 356, 562 et 768 peuvent être assignés respectivement aux fragments Y₁ (Hex-aniline), Y₂ (Hex- d_2 -Hex-aniline) et Y₃ (Hex- d_2 -Hex- d_2 -Hex-aniline). Ces deux séries complémentaires de fragments permettent de proposer la séquence linéaire complète suivante :

Hex- d_2 -Hex- d_2 -Hex- d_2 -Hex-Aniline

Oligosaccharide D:

Le spectre MS/MS de l'espèce moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 1192 montre (Fig. 32d) les ions à m/z 356 et 427 correspondant respectivement aux fragments Y₁ (Hex-aniline) et B₂ (Hex- d_2 -Hex- d_2). Ces fragments montrent la présence d'un hexose en position terminale

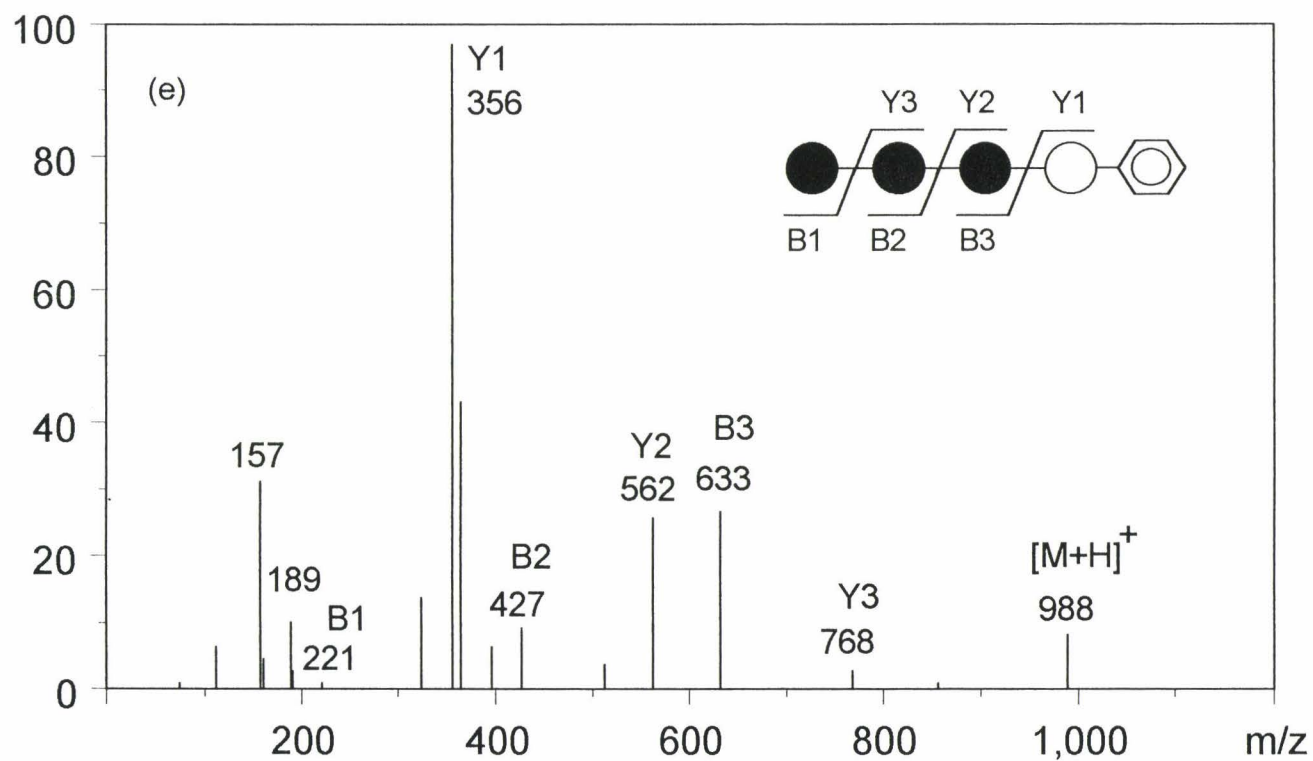
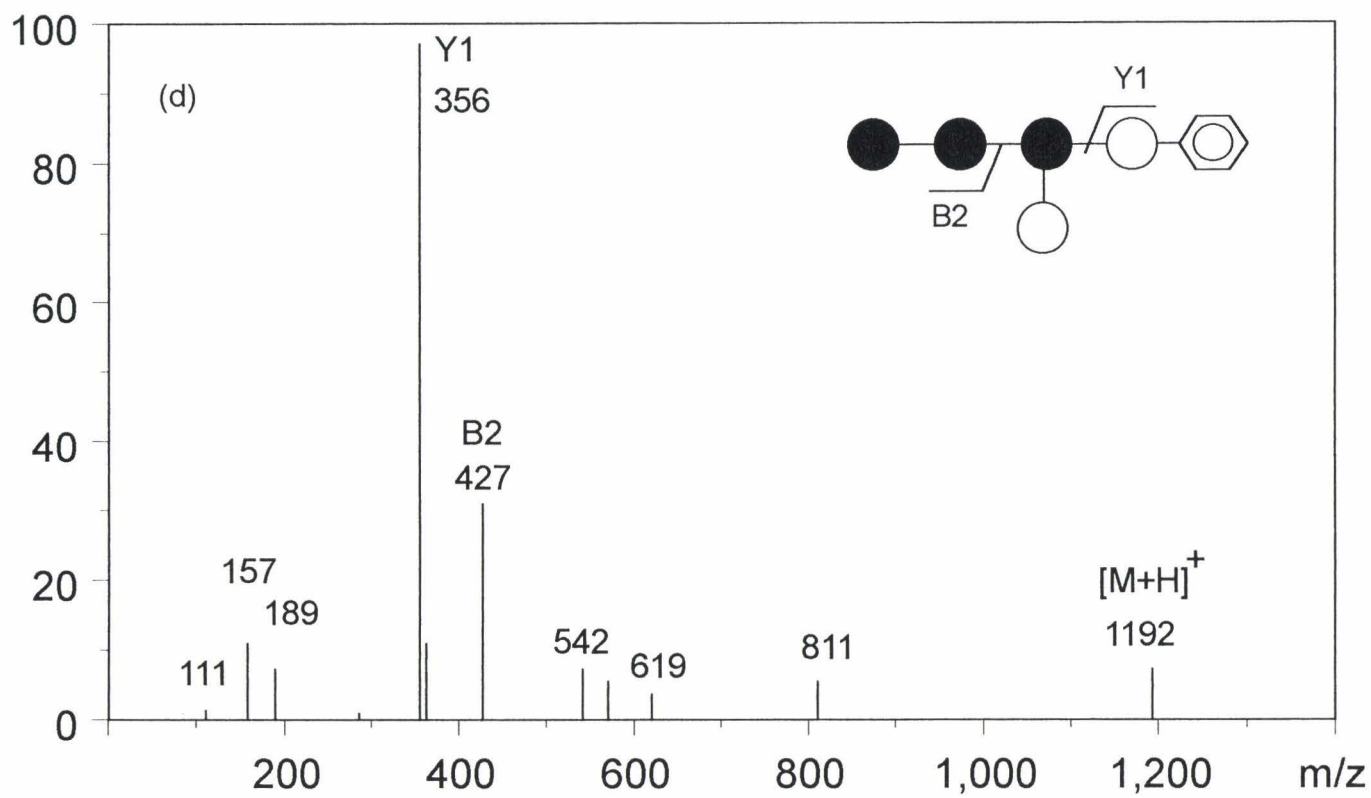


Figure 32: Spectres ESMS/MS des oligosaccharides D (d) et E (e) couplés à l'aniline, réduits, N-acétylés et perméthylés. Ion précurseur $[M+H]^+$ à m/z 1192 (d) et 988 (e).

réductrice et l'existence d'une unité disaccharidique $-d_4$ en position terminale non réductrice.

L'absence d'une série régulière laisse présumer l'existence de la séquence ramifiée suivante:

Hex- d_2 -Hex- d_2 -[Hex]Hex- d_2 -Hex-Aniline .

Les analyses effectuées en ESMS/MS nous indiquent la position des hexoses et des hexoses deutérés au sein de la séquence des oligosaccharides A, B, C, D et E. Toutefois, elles ne livrent pas la nature des monosaccharides (Gal/Glc) ainsi que le type de liaison interglycosidique.

6.3. Détermination des liaisons interglycosidiques.

La nature des monosaccharides ainsi que leur substitution sont déterminées par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des dérivés méthylés obtenus après clivage des liaisons glycosidiques des oligosaccharides perméthylés.

Pour cette étude, deux méthodes différentes sont utilisées pour le clivage de la liaison glycosidique.

La coupure par méthanolyse (MeOH/HCl 0.5N, 24 h, 80°C) de l'oligosaccharide perméthylé libère des méthyl-glycosides qui sont ensuite peracétylés afin de marquer les hydroxyles engagés dans une liaison glycosidique.

La coupure de l'oligosaccharide perméthylé par hydrolyse (acide trifluoroacétique 4N, 4 h, 100°C) conduit à la libération de monosaccharides ensuite réduits en présence d'un borodeutérure de sodium et peracétylés afin de marquer les hydroxyles libres. Les produits méthylés ainsi obtenus sont plus communément appelés alditols acétates partiellement méthylés.

L'analyse par spectrométrie de masse des dérivés méthylés obtenus après méthanolyse ou hydrolyse peut faire appel à l'ionisation chimique ou l'ionisation par impact électronique (voir chapitre 3.5. des généralités).

L'ionisation chimique (CI), utilisant l'ammoniac comme gaz réactant livre l'espèce moléculaire. Le spectre de masse renseigne sur la masse moléculaire du dérivé et donne le nombre de groupes acétylés ou plus précisément le nombre d'hydroxyles impliqués dans une liaison glycosidique. De la même façon, ce spectre de masse indique la présence d'atomes de deutérium provenant de la réduction des acides uroniques. Les différentes espèces moléculaires pouvant être observées en fonction du nombre de groupes acétylés sont répertoriées dans le Tableau 9. Il est à noter que ce type d'analyse par spectrométrie de masse ne révèle pas la nature des monosaccharides. Cependant, les temps de rétention observés par chromatographie en phase gazeuse permettent d'identifier la nature de ces dérivés ainsi que la position des substitutions par comparaison avec des témoins.

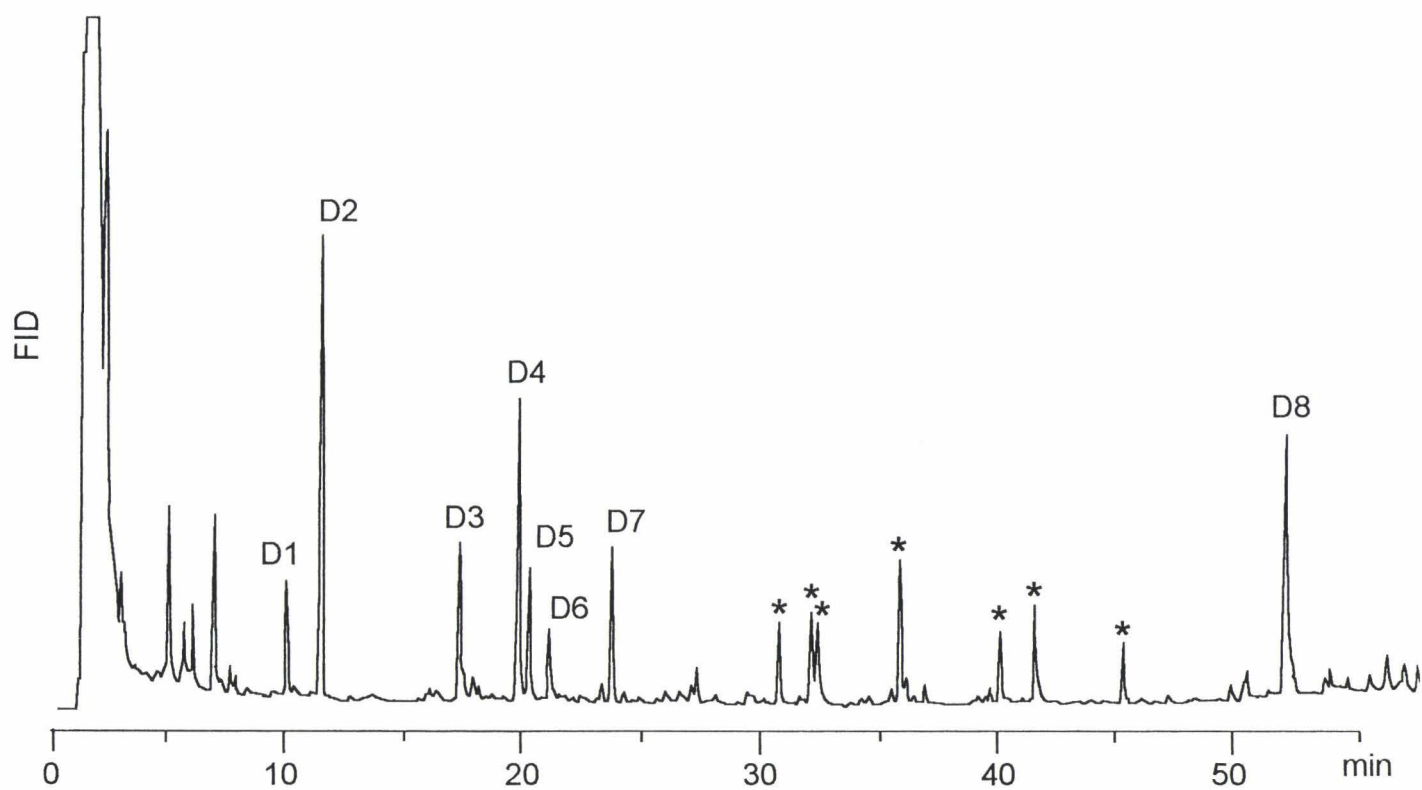
L'ionisation par impact électronique (EI) peut être utilisée pour les éthers méthyliques obtenus après méthanolyse. Toutefois, dans ce travail, elle a surtout été employée pour l'analyse des alditols acétates partiellement méthylés après hydrolyse. En effet, les fragments de l'ion moléculaire sont facilement interprétables et donnent la position précise des hydroxyles acétylés et, par conséquent, la position des substitutions. Ces analyses réalisées en impact électronique permettent de compléter les résultats obtenus en ionisation chimique.

Tableau 9: Identification de la nature du monosaccharide et du nombre de substitution en fonction des données obtenues par spectrométrie de masse CI.

Nature du monosaccharide		Méthylglycoside partiellement méthylé	Alditol acétate partiellement méthylé
		m/z	m/z
Terminal non réducteur	Hexose	$[M+NH_4]^+ = 268$	$[M+NH_4]^+ = 341$
	Hexose- d_2	$[M+NH_4]^+ = 270$	$[M+NH_4]^+ = 343$
Monosubstitué	Hexose	$[M+NH_4]^+ = 296$	$[M+NH_4]^+ = 369$
	Hexose- d_2	$[M+NH_4]^+ = 298$	$[M+NH_4]^+ = 371$
Disubstitué	Hexose	$[M+NH_4]^+ = 324$	$[M+NH_4]^+ = 397$
	Hexose- d_2	$[M+NH_4]^+ = 326$	$[M+NH_4]^+ = 399$
Terminal réducteur monosubstitué	Hexose-Aniline	$[M+H]^+ = 398$	$[M+H]^+ = 398$
	Hexose- d_2 -Aniline	$[M+H]^+ = 400$	$[M+H]^+ = 400$

Pour cette étude, seule l'analyse structurale de l'oligosaccharide D est détaillée, le principe étant le même pour tous les autres oligosaccharides.

Les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'oligosaccharide D perméthylé, méthanolysé et peracétylé sont donnés dans la figure 33. On peut observer la présence de huit pics nommés de D1 à D8 correspondants aux différents méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés. Les temps de rétention de ces produits ainsi que les données obtenues par spectrométrie de masse en mode d'ionisation chimique sont rassemblés dans le tableau 10.



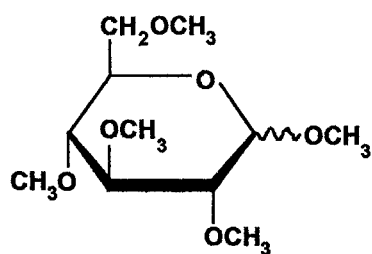
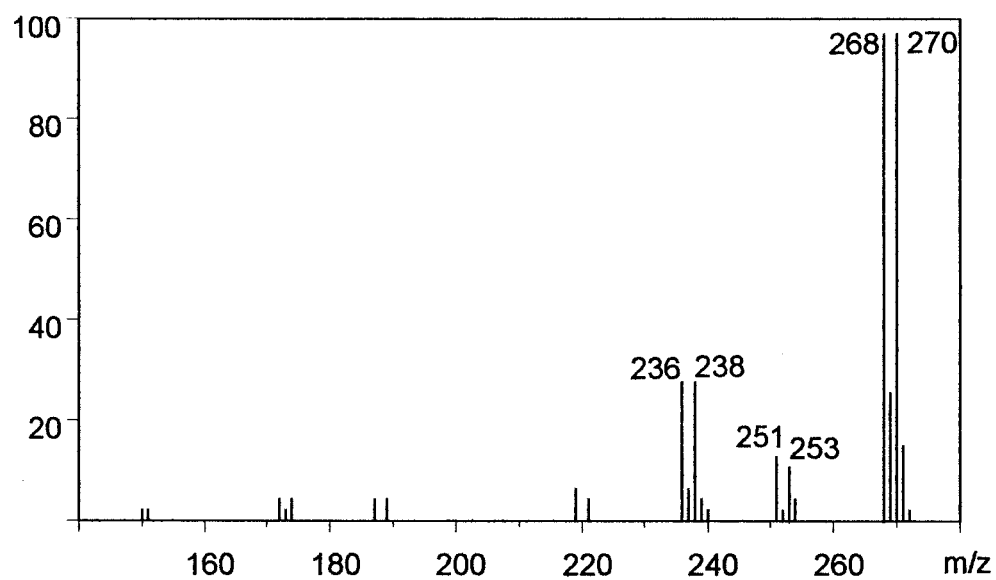
* Résidus de nature non glucidique

Figure 33: Analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'oligosaccharide D perméthylé, méthanolisé et peracétylé.

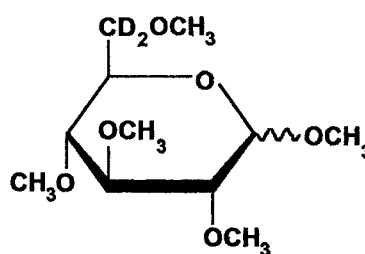
Tableau 10: Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de l'oligosaccharide D, perméthylé, méthanolysé et peracétylé.

	Temps de rétention (minutes)	m/z	Nature du monosaccharide	Position des groupes CH ₃	Rapports moliares
D1	9.51	$[M+NH_4]^+ = 268$	β -Me-Glc	2,3,4,6-Me ₄	1.7
		$[M+NH_4]^+ = 270$	β -Me-Glc- <i>d</i> ₂	2,3,4,6-Me ₄	
D2	11.14	$[M+NH_4]^+ = 268$	α -Me-Glc	2,3,4,6-Me ₄	1.7
		$[M+NH_4]^+ = 270$	α -Me-Glc- <i>d</i> ₂	2,3,4,6-Me ₄	
D3	17.00	$[M+NH_4]^+ = 298$	β -Me-Glc- <i>d</i> ₂	2,4,6-Me ₃	1.2
D4	19.45	$[M+NH_4]^+ = 298$	α -Me-Glc- <i>d</i> ₂	2,4,6-Me ₃	
D5	19.86	$[M+NH_4]^+ = 326$	Me-Gal- <i>f</i> - <i>d</i> ₂	2,6-Me ₂	1.0
D6	20.74	$[M+NH_4]^+ = 326$	β -Me-Gal- <i>d</i> ₂	2,6-Me ₂	
D7	23.30	$[M+NH_4]^+ = 326$	α -Me-Gal- <i>d</i> ₂	2,6-Me ₂	
D8	51.50	$[M+H]^+ = 398$	Gal-aniline	2,3,6-Me ₃	0.98

Les pics D1 et D2 du chromatogramme en phase gazeuse de l'oligosaccharide D perméthylé, méthanolysé et peracétylé correspondent respectivement aux deux anomères β et α du (2,3,4,6-Me₄)-Glc qui présentent des spectres de masse semblables. Le spectre de masse du pic D1 (anomère β) (Fig. 34) montre la présence de deux espèces moléculaires $[M+NH_4]^+$ à m/z 268 et 270 de même intensité, ce qui permet de conclure que l'oligosaccharide D



M = 250



M = 252

Figure 34: Spectre de masse en mode d'ionisation chimique (NH₄) des méthylglucosides perméthylés (β) correspondant au pic D1: 2,3,4,6 Me₄Glc et 2,3,4,6 Me₄Glc-*d*₂

possède une unité de glucose (Glc) et une unité de glucose deutéré (Glc- d_2) en position terminale non réductrice.

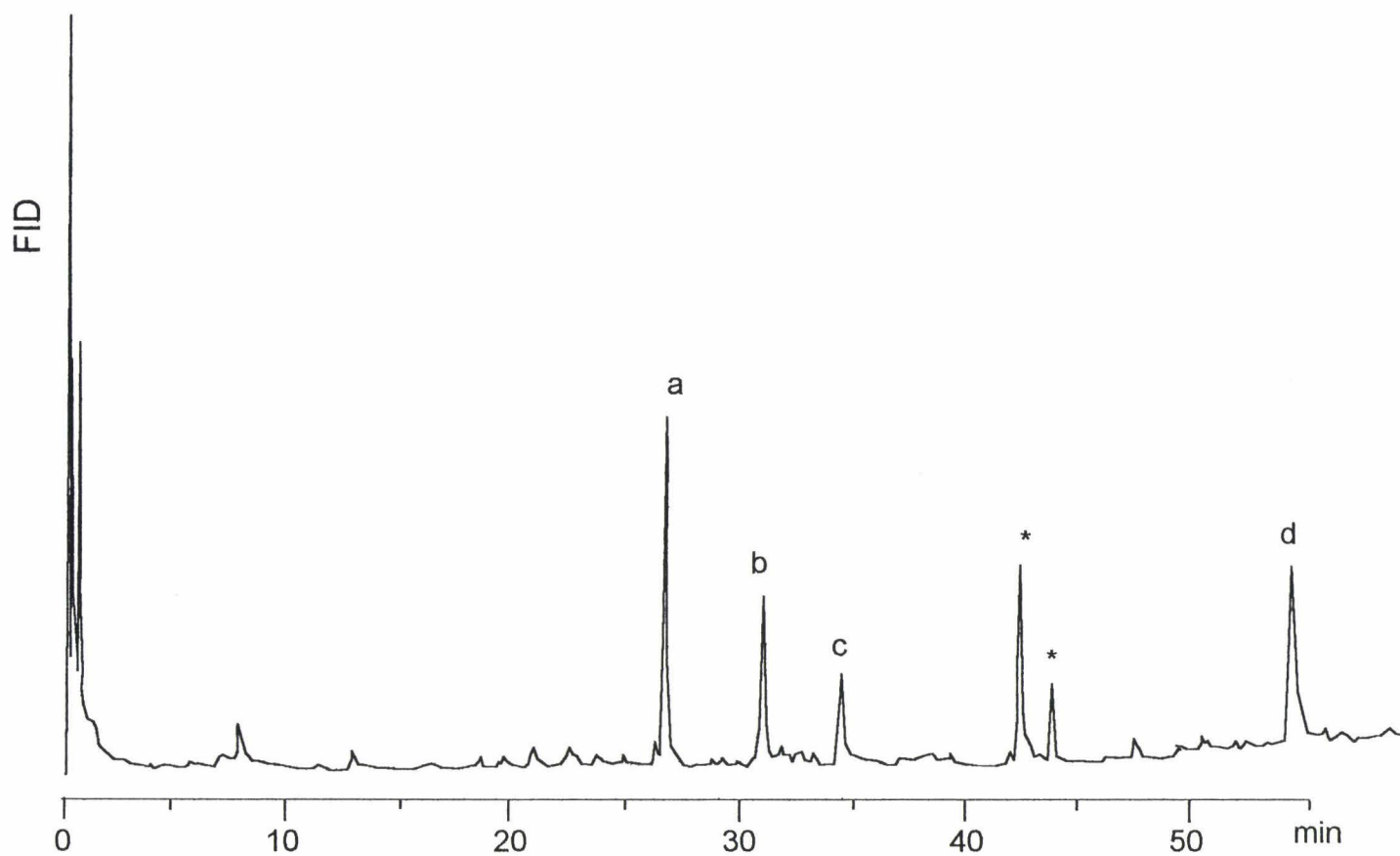
Les pics D3 et D4 sont les anomères β et α du (2,4,6-Me₃)-Glc- d_2 , qui correspondent à une unité de Glc- d_2 qui est substituée sur son carbone 3 par un monosaccharide.

Les pics D6 et D7 sont les anomères β et α du (2,6-Me₂)-Gal- d_2 pyranique qui correspond à une unité de Gal- d_2 disubstituée en 3 et 4. Le pic D5 est en fait la forme furanique du (2,6-Me₂)-Gal- d_2 . En effet, lors de la méthanolyse, les hydroxyles en 3, 4, et 5 sont libérés et le galactose qui formait à l'origine un cycle pyranique avec l'hydroxyle en 5 peut alors reformer en partie un cycle furanique avec l'hydroxyle en 4.

Enfin, le pic D8 correspond à un résidu de galactose en position terminale réductrice couplé à l'aniline. Ce produit N-acétylé et partiellement méthylé et acétylé est suffisamment volatil pour être chromatographié en phase gazeuse.

L'étude structurale de l'oligosaccharide D a également été réalisée en parallèle sur les alditols acétates partiellement méthylés obtenus après hydrolyse. Ces dérivés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode impact électronique (Fig. 35).

La figure 36 montre le spectre de masse correspondant aux dérivés méthylés (2,3,4,6-Me₄)-(1,5-Ac₂)-Glc et (2,3,4,6-Me₄)-(1,5-Ac₂)-Glc- d_2 en mélange équimolaire. On peut remarquer la présence des fragments à m/z 45, 161 et 205, ainsi que leurs homologues deutérés à m/z 47, 163 et 207.



* Résidu de nature non glucidique

a: (2,3,4,6-Me₄)-(1,5-Ac₂)-Glc / (2,3,4,6-Me₄)-(1,5-Ac₂)-Glc-d₂

b: (2,4,6-Me₃)-(1,3,5-Ac₃)-Glc-d₂

c: (2,6-Me₂)-(1,3,4,5-Ac₄)-Gal-d₂

d: (2,3,5,6-Me₄)-(1-Ac)-Gal-aniline

Figure 35: Analyse par chromatographie en phase gazeuse des alditols acétates partiellement méthylés obtenus après hydrolyse de l'oligosaccharide D perméthylé.

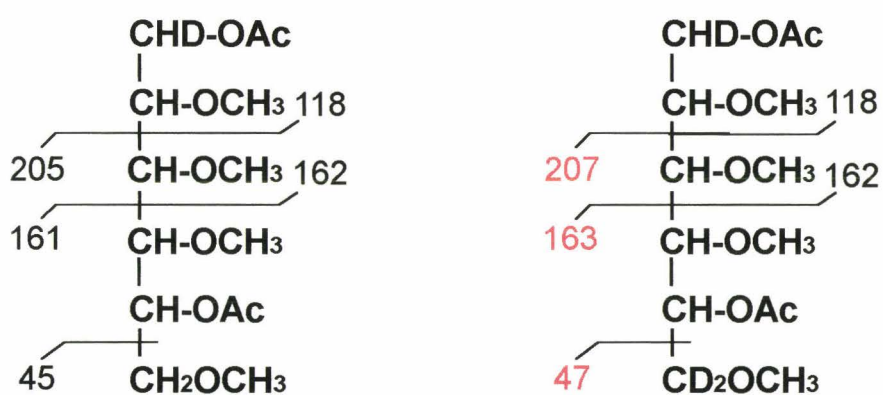
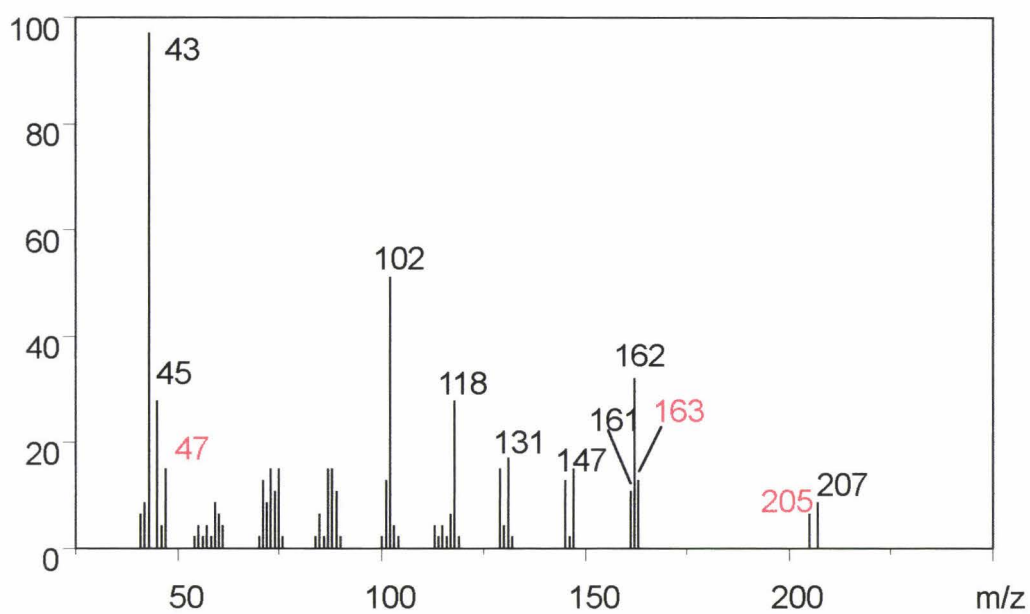


Figure 36: Spectre de masse en impact électronique du (2,3,4,6-Me₄)-(1,5-Ac₂)-Glc et du (2,3,4,6-Me₄)-(1,5-Ac₂)-Glc-d₂

La figure 37 correspond au spectre de masse du (2,4,6-Me₃)-(1,3,5-Ac₃)-Glc-*d*₂. Les fragments à *m/z* 118, 163 et 234 permettent de localiser les groupes méthylés en position 2, 4 et 6. Les groupes acétylés en position 1 et 5 correspondent aux hydroxyles qui étaient engagés dans le cycle pyranique. Par contre, le groupe acétylé en position 3 correspond à l'hydroxyle qui était engagé dans une liaison glycosidique.

Le spectre de masse donné dans la figure 38 montre les fragments à *m/z* 47, 118 et 307 qui correspondent à un (2,6-Me₂)-(1,3,4,5-Ac₄)-Gal-*d*₂. Les groupes acétylés en position 3 et 4 indiquent les substitutions.

La fragmentation du résidu galactose en position terminale réductrice N-acétylé, partiellement méthylé et acétylé, est donnée dans la figure 39. La position du carbone 1 de ce dérivé est marquée par l'aniline N-acétylée. Les fragments à *m/z* 45, 89, 192 et 205 ainsi que les fragments de faible intensité à *m/z* 236, 249 et 352 caractérisent une substitution en 4.

L'ensemble des données obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permettent de proposer pour l'oligosaccharide D la composition suivante en dérivés méthylés : (2,3,4,6-Me₄)-Glc ; (2,3,4,6-Me₄)-Glc-*d*₂ ;

(2,4,6-Me₃)-Glc-*d*₂ ; (2,6-Me₂)-Gal-*d*₂ ; (2,3,5,6-Me₄)-Gal-aniline ; avec les rapports

molaires suivants : 1/1/1/1.

L'analyse des oligosaccharides A, B, C et E, réalisée selon le même principe, a permis l'identification des dérivés méthylés rassemblés dans le tableau 11.

Il est à noter que, en ce qui concerne l'oligosaccharide C, le spectre de masse en impact électronique du résidu galactose couplé à une molécule d'aniline, N-acétylé, partiellement méthylé et acétylé, donne les fragments à *m/z* 45, 89, 133, 192, 249, 308 et 352 caractéristiques d'une substitution en 3 (Fig. 40).

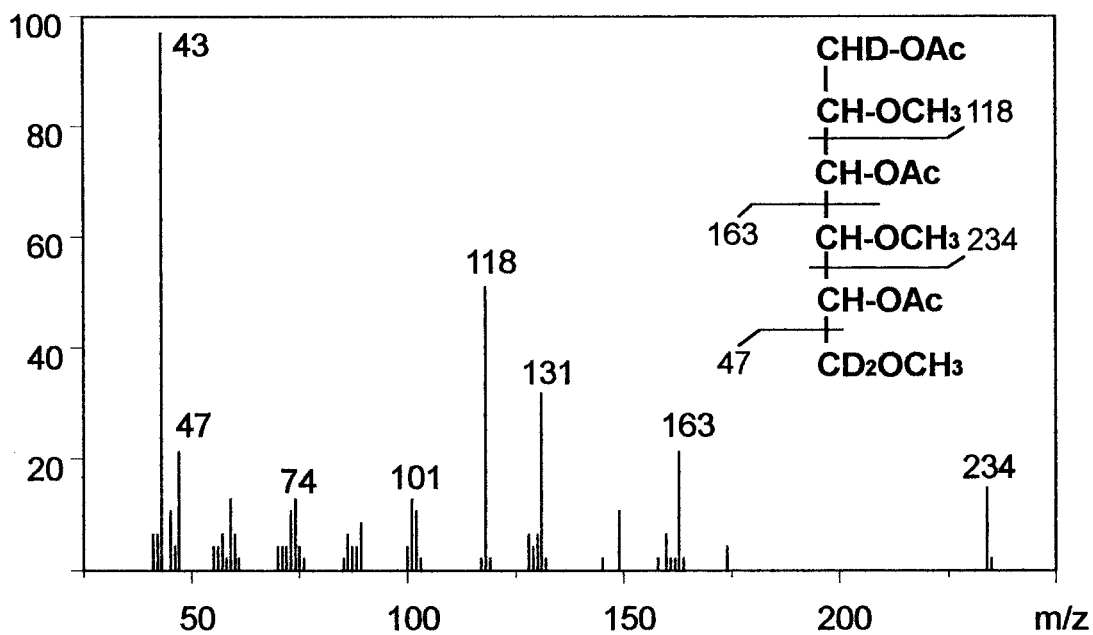


Figure 37: Spectre de masse en mode impact électronique du (2,4,6,-Me₃)-(1,3,5-Ac₃)Glc-*d*₂

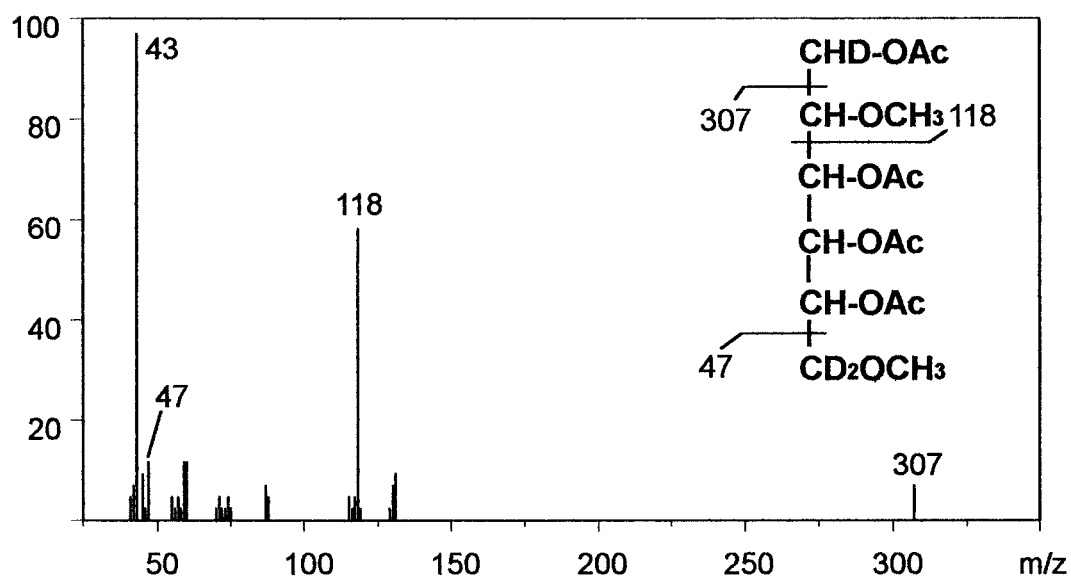


Figure 38: Spectre de masse en mode impact électronique du (2,6-Me₂)-(1,3,4,5-Ac₄)Gal-*d*₂.

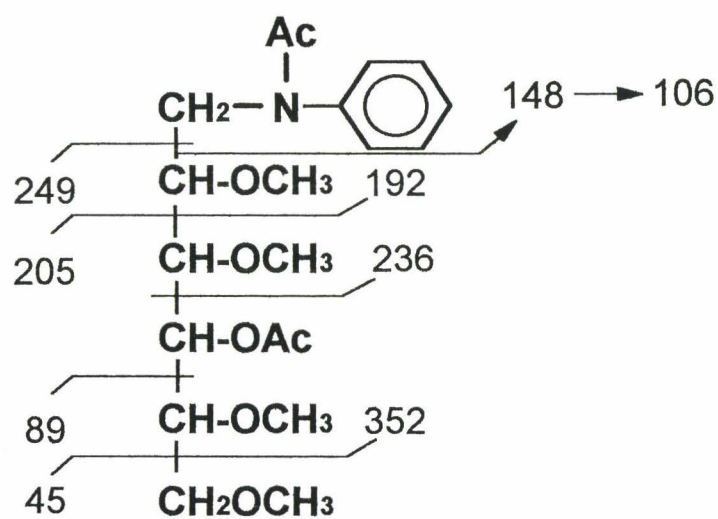
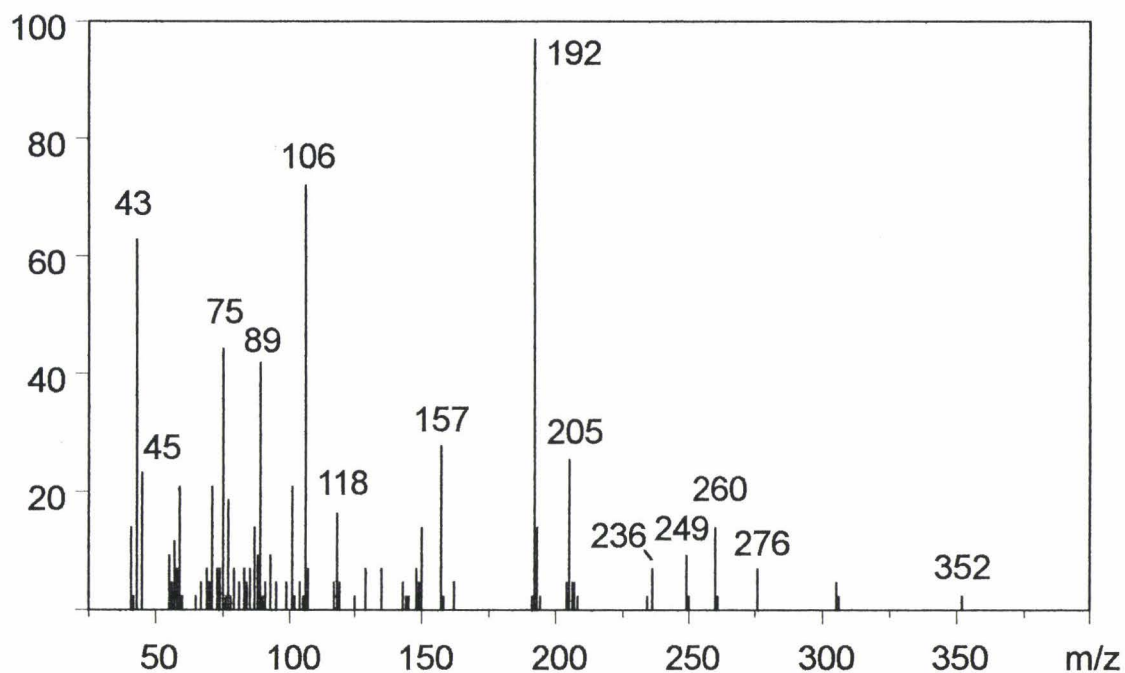


Figure 39: Spectre de masse en impact électronique du (2,3,5;6-Me₄)-(4-Ac)Gal-anilineNac.

Tableau 11: Nature des dérivés partiellement méthylés et acétylés libérés
à partir des oligosaccharides couplés, réduits et perméthylés

Dérivés méthylés	Oligosaccharides				
	A	B	C	D	E
(2,3,4,6-Me ₄)-Glc	1	-	-	1	-
(2,3,4,6-Me ₄)-Glc- <i>d</i> ₂	1	1	-	1	1
(2,4,6-Me ₃)Glc- <i>d</i> ₂	-	-	-	1	1
(2,4,6-Me ₃)Gal- <i>d</i> ₂	-	1	-	-	1
(2,6-Me ₂)-Gal- <i>d</i> ₂	1	-	-	1	-
(2,4,6Me ₃)-X- <i>d</i> ₄	-	-	1	-	-
(2,4,5,6-Me ₄)-Gal-aniline	-	-	1	-	-
(2,3,5,6-Me ₄)-Gal-aniline	1	1	-	1	1

X-*d*₄ : (Methoxy-propyl-*d*₂)-Glc-*d*₂

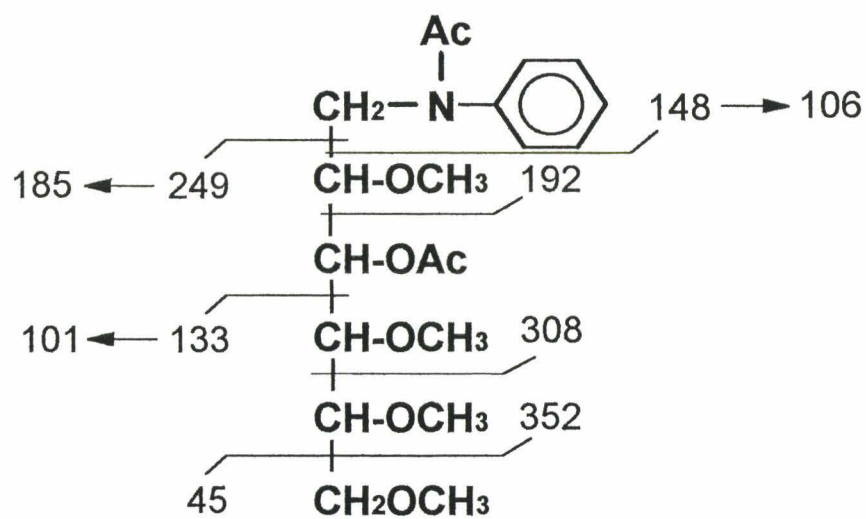
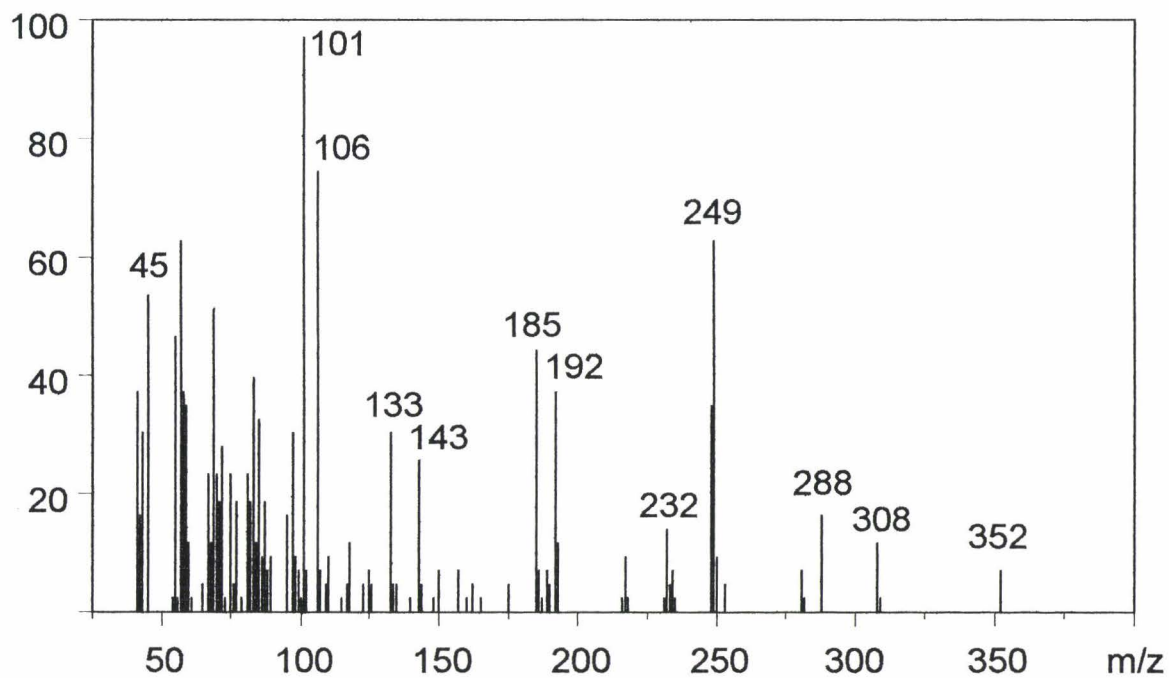


Figure 40: Spectre de masse en impact électronique du (2,4,5,6-Me₄)-(3-Ac)Gal-anilineNac.

La confrontation des résultats obtenus par les analyses de ESMS/MS des oligosaccharides perméthylés, de CPG/SM des monosaccharides partiellement méthylés permet de proposer les structures présentées dans la figure 41 pour les oligosaccharides A, B, C, D et E. Leur étude est facilitée par le fait qu'ils appartiennent à une série homologue provenant de la dégradation de l'unité de répétition.

Ainsi l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse du trisaccharide B montre qu'il est composé d'un Glc- d_2 en position terminale non réductrice, d'un Gal substitué en 4 en position terminale réductrice et enfin d'un Gal- d_2 substitué en 3. Nous pouvons donc proposer sans ambiguïté la structure suivante :

Glc- d_2 (1-3)Gal- d_2 (1-4)Gal-aniline ou plus précisément: GlcUA(1-3)GalUA(1-4)Gal

L'analyse par CPG/SM du tétrasaccharide A montre toujours la présence d'un Gal substitué en 4 en position terminale réductrice et d'un Glc- d_2 en position terminale non réductrice. Cependant, le Gal- d_2 substitué en 3 disparaît au profit d'un Gal- d_2 disubstitué en 3 et 4, et un Glc en position terminale non réductrice apparaît. L'oligosaccharide A correspond donc à l'oligosaccharide B avec un Glc supplémentaire. On peut donc proposer la structure suivante pour A : Glc- d_2 (1-3)[Glc(1-4)]Gal- d_2 (1-4)Gal-aniline ou plus précisément: GlcUA(1-3)[Glc(1-4)]GalUA(1-4)Gal

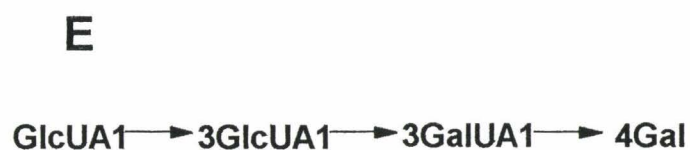
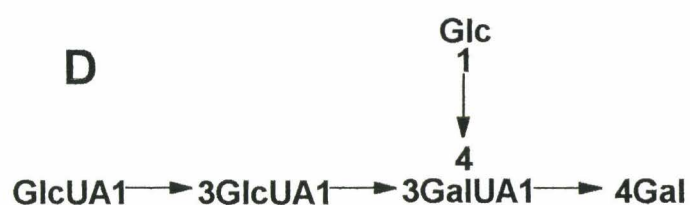
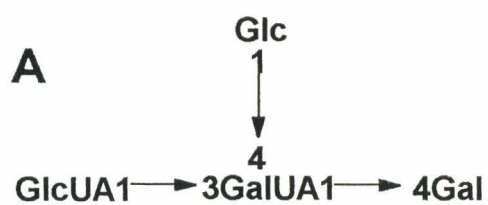
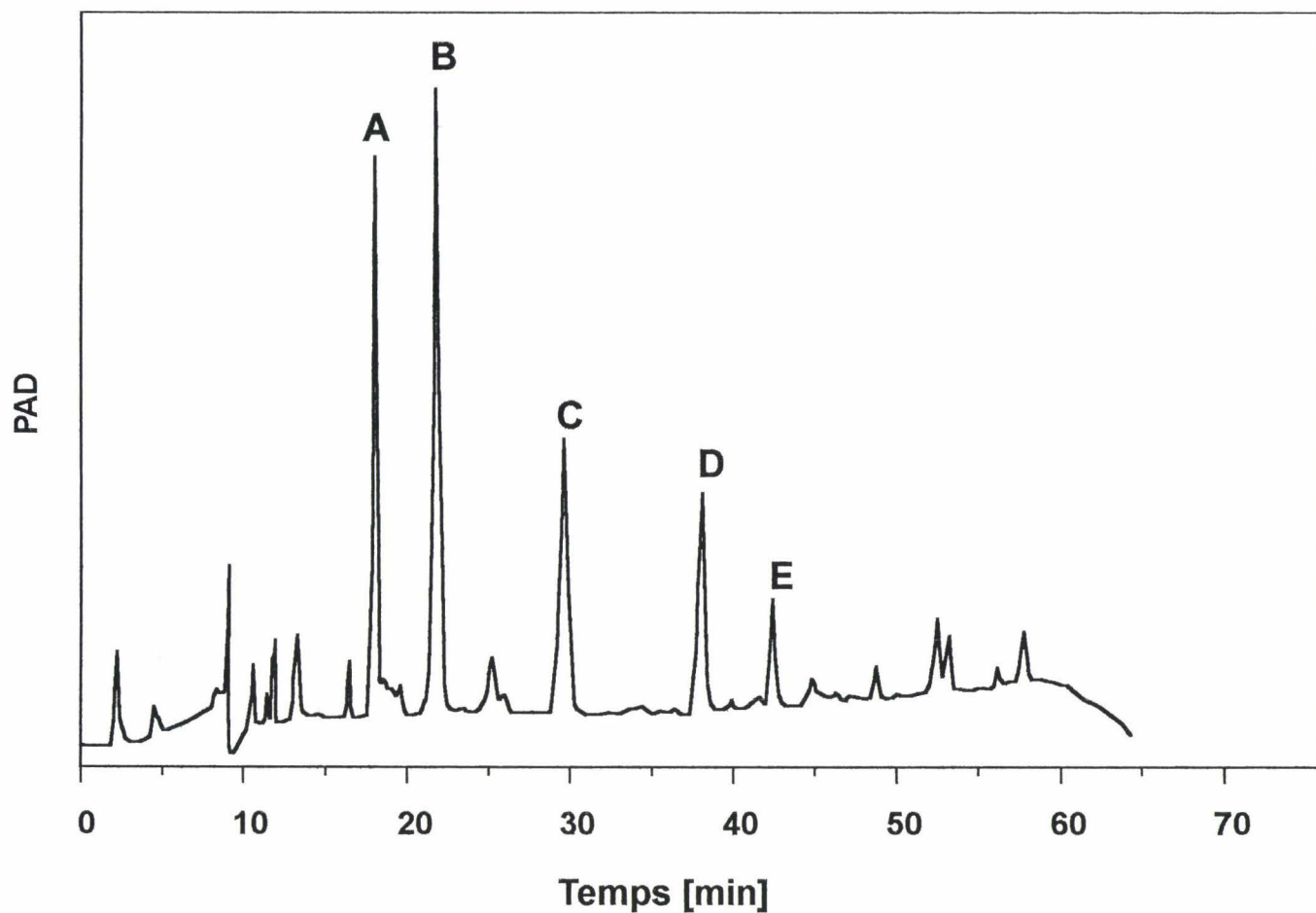
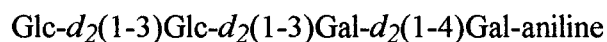


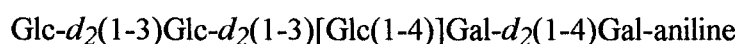
Figure 41: Structure des oligosaccharides issus du polysaccharide 1644.

L'oligosaccharide E est également un tétrasaccharide. Il possède un Gal substitué en 4 en position terminale réductrice, un Glc- d_2 en position terminale non réductrice, un Gal- d_2 substitué en 3 et un Glc- d_2 substitué en 3. Il correspond en fait à l'oligosaccharide B avec un Glc- d_2 supplémentaire, ce qui permet de proposer la structure linéaire suivante :



ou plus précisément: GlcUA(1-3)GlcUA(1-3)GalUA(1-4)Gal

Enfin, l'oligosaccharide D correspond à l'oligosaccharide E avec un Glc supplémentaire. En effet, on retrouve un Gal substitué en 4 en position terminale réductrice, un Glc- d_2 en position terminale non réductrice et un Glc- d_2 substitué en 3. Par contre, le Gal- d_2 substitué en 3 disparaît au profit du Gal- d_2 disubstitué en 3, 4 et un Glc en position terminale non réductrice apparaît. On peut donc proposer la structure branchée suivante pour D :



ou plus précisément: GlcUA(1-3)GlcUA(1-3)[Glc(1-4)]GalUA(1-4)Gal

L'oligosaccharide C quant-à lui ne possède aucune similitude avec les autres oligosaccharides. Il est composé d'un résidu de Gal substitué en 3 en position terminale réductrice et d'un résidu (Hydroxy-propyl- d_2)-Glc- d_2 en position terminale non réductrice et possède donc la structure suivante : (Hydroxy-propyl- d_2)-Glc- d_2 (1-3)Gal-aniline

ou plus précisément 3-O-Lac-GlcUA(1-3)Gal

Toutes les structures présentées dans la figure 41 ont été confirmées par les séquences oligosaccharidiques obtenues par les analyses ESMS/MS (cf. chapitre 6.2.)

6.4. Analyse RMN des oligosaccharides natifs.

Les résultats de l'analyse de résonance magnétique nucléaire sont décrits dans les figures 42 à 46 et les glissements chimiques sont donnés dans le tableau 12.

L'étude comparée des spectres COSY, COSY relayé et COSY double relais permet de mesurer les constantes de couplage entre tous les protons des hétérocycles. Ainsi, en ce qui concerne l'oligosaccharide B (Fig. 43), l'unité α -galactose est identifiée sur la base des constantes $J_{1,2}$ (3,5 Hz), $J_{2,3}$ (8 Hz), $J_{3,4}$ (\simeq 1,2 Hz) et $J_{4,5}$ (< 1 Hz). Ces valeurs permettent de préciser les angles diédraux entre les protons H-1 et H-2 (\simeq 60°), H-2 et H-3 (\simeq 180°), H-3 et H-4 (\simeq 60°) et H-4 et H-5 (\simeq 60°). En d'autres termes, nous pouvons ainsi définir les différents protons du cycle comme étant respectivement en position équatoriale (H-1), axiale (H-2 et H-3), équatoriale (H-4), définissant ainsi la configuration α du galactose. Le même raisonnement réalisé à propos des unités I β , II et III permet d'identifier ces monosaccharides au β -galactose, à l'acide α -galacturonique et à l'acide β -glucuronique. Les acides uroniques ont été en outre identifiés sur la base de l'absence de couplage H-5 / H-6,6', qui résulte naturellement de la présence d'une fonction carboxylique. Dans le cas de l'oligosaccharide A (Fig. 42), la présence d'une unité de β -glucose (résidu IV) est vérifiée par la série de corrélations entre H-1 ($J_{1,2} \sim 8$ Hz), H-2 (triplet car $J_{1,2} = J_{2,3}$), H-3 (triplet, $J_{2,3} = J_{3,4}$) et H-4 (triplet, $J_{3,4} = J_{4,5}$). Les corrélations H-4 \rightarrow H-5 \rightarrow H-6,6' permettent l'attribution des tous les déplacements chimiques des protons de ce monosaccharide, comme cela a été le cas, pour toutes les autres unités monosaccharidiques, à l'exception toutefois de l'oligosaccharide D (Fig. 45) isolé en trop faible quantité pour une analyse RMN en 2 dimensions.

Comme on peut le constater, la totalité des structures oligosaccharidiques a été établies sur la base d'analyses chimiques et d'analyses en spectrométrie de masse. Toutefois, seule la RMN permettait d'obtenir les informations concernant l'anométrie des unités monosaccharidiques.

L'analyse RMN aurait pu conduire à l'établissement de ces structures, sur la base d'expérimentations complémentaires fondées sur la spectroscopie hétéronucléaire $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ qui aurait fourni la nature des liaisons glycosidiques, la spectroscopie de corrélation NOE, qui permet de définir les séquences oligosaccharidiques, voire la spectroscopie hétéronucléaire en mode HMBC (corrélation $^3\text{J } ^1\text{H} / ^{13}\text{C}$) qui permet d'accéder en une seule étape à la séquence et au mode de liaison des différentes unités monosaccharidiques.

C'est essentiellement pour des raisons de quantités que nous leur avons préféré les analyses en spectrométrie de masse.

Tableau 12: Déplacements chimiques des protons de chaque hétérocycle des oligosaccharides du 1644.

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
Oligo. B							
GlcUA β 1-3	4.717	3.416	3.530	3.540	3.769	-	-
GalUA α 1-4	4.994	4.012	4.115	4.556	4.855	-	-
Gal α	5.302	3.850	3.930	4.111	4.142	3.840	3.840
Gal β	4.626	3.528	3.709	4.053	3.750	3.880	3.850
Oligo. A							
GlcUA β 1-3	4.704	3.408	3.551	3.735	3.860	-	-
GalUA α 1-4	4.997	4.125	4.174	4.622	4.762	-	-
Glc β 1-4	4.731	3.251	3.507	3.297	3.348	3.822	3.634
Gal α	5.303	3.852	3.920	4.111	4.140	3.840	3.840
Gal β	4.622	3.529	3.697	4.056	3.750	3.880	3.850
Oligo. E							
GlcUA α 1-3	5.176	-	-	-	-	-	-
GlcUA β 1-3	4.795	3.391	-	-	4.237	-	-
GalUA α 1-4	5.017	-	-	4.509	4.778	-	-
Gal α	5.294	-	-	-	-	-	-
Gal β	4.601	-	-	-	-	-	-
Oligo. D							
GlcUA α 1-3	5.217	3.836	4.048	3.613	4.264	-	-
GlcUA β 1-3	4.782	3.397	3.566	3.517	3.762	-	-
GalUA α 1-4	5.033	4.089	4.135	4.644	4.76	-	-
Glc β 1-4	4.693	3.284	3.425	3.313	3.350	3.826	3.644
Gal α	5.297	3.836	3.923	4.131	4.135	3.830	3.830
Gal β	4.599	3.519	3.699	4.076	3.750	3.870	3.830
Oligo. C							
Lactyl	-	4.307(CH)	1.408(CH ₃)	-	-	-	-
GlcUA β 1-3	4.703(α) 4.691(β)	3.480(a) 3.476(b)	3.428(a) 3.423(b)	3.611	3.720	-	-
Gal α	5.278	3.972	3.972	4.232	4.098	3.724	3.696
Gal β	4.621	3.645	3.772	4.169	3.683	3.780	3.780

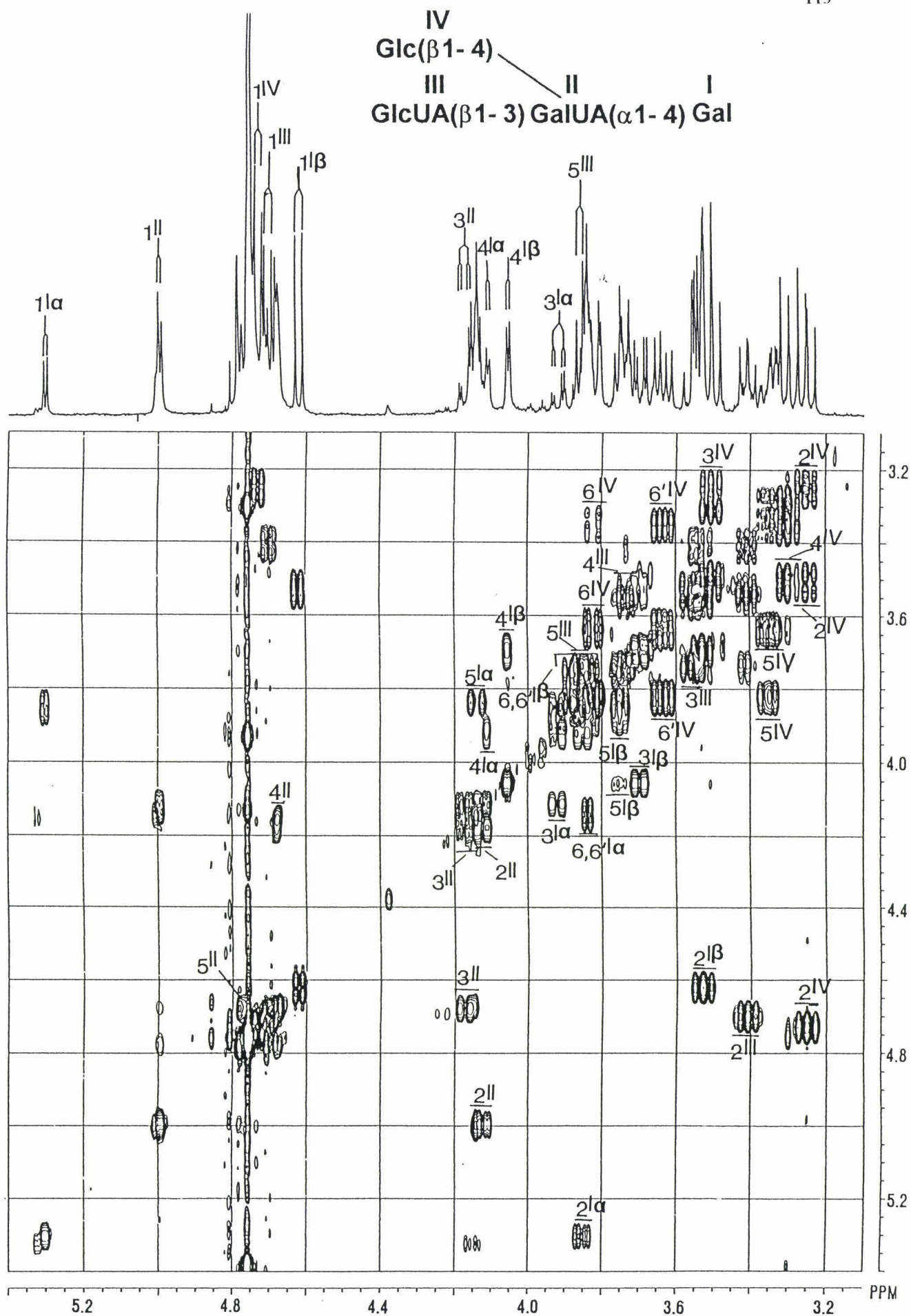


Figure 42: Spectre de résonance magnétique nucléaire COSY de l'oligosaccharide A.
Nomenclature 1Iα : proton H-1 de l'unité monosaccharidique I (anomère α).

III II I
 GlcUA(β 1-3)GalUA(α 1-4)Gal

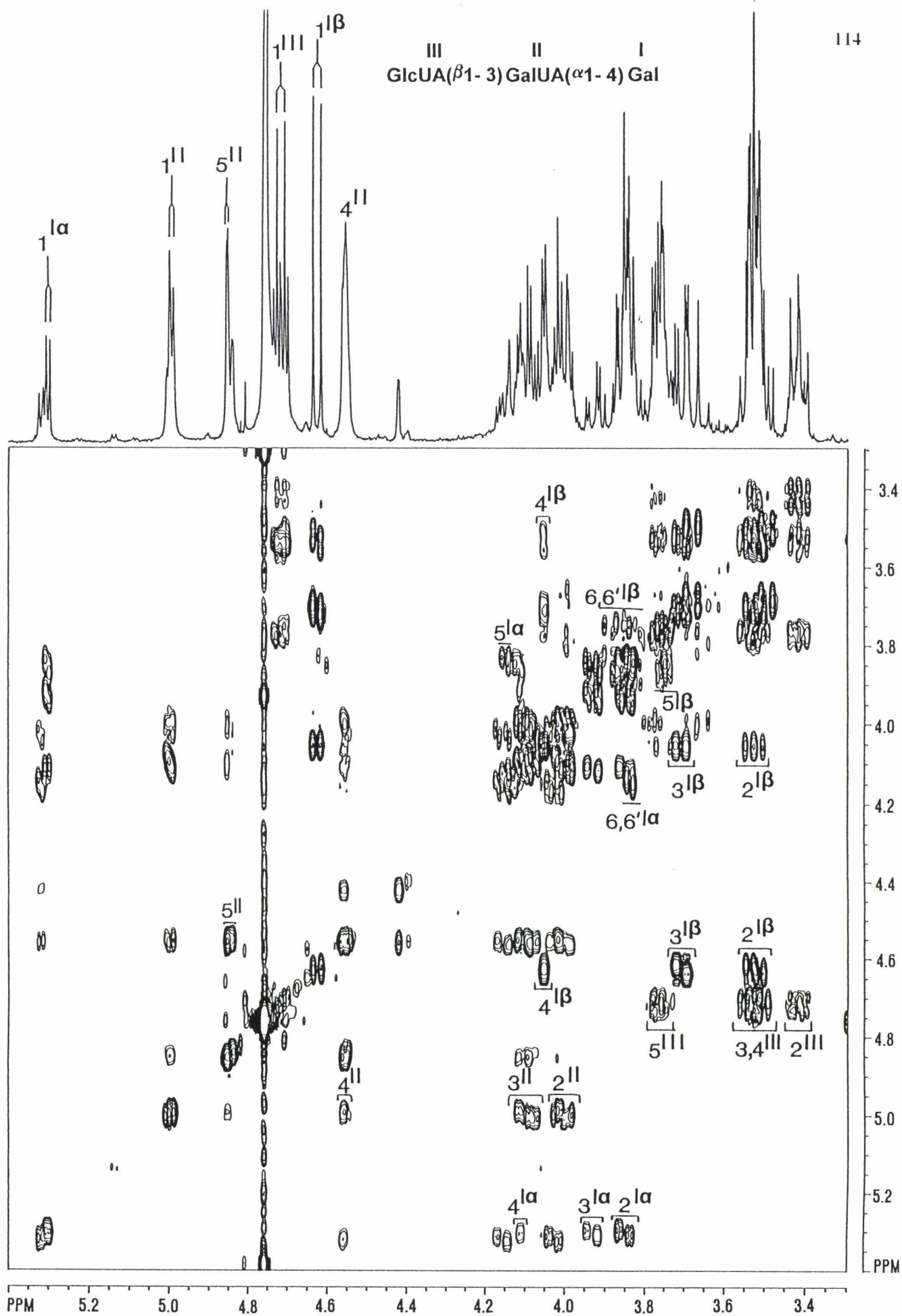


Figure 43: Spectre de résonance magnétique nucléaire COSY à 2 relais de l'oligosaccharide B.
 Nomenclature $1^{I\alpha}$: proton H-1 de l'unité monosaccharidique I (anomère α).

II I
3-O-Lac-GlcUA(β 1-3) Gal

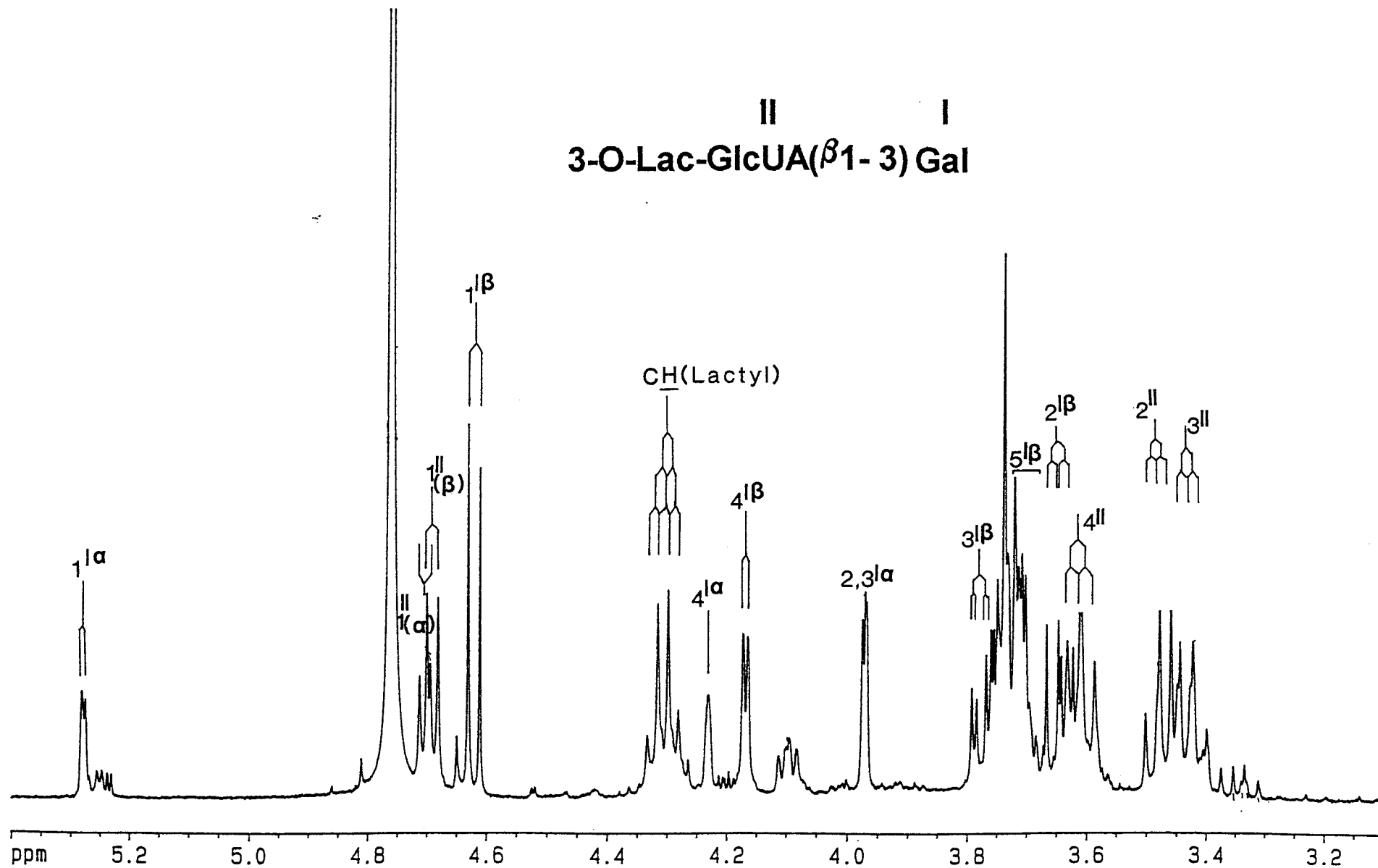


Figure 44: Spectre de résonance magnétique nucléaire de l'oligosaccharide C. Nomenclature : II α : proton H-1 de l'unité monosaccharidique I (anomère α).
 La présence de signaux (α) et (β) pour l'unité monosaccharidique est due à l'effet d'anomérisation : II(α) lié à I(α) et II(β) lié à I(β).

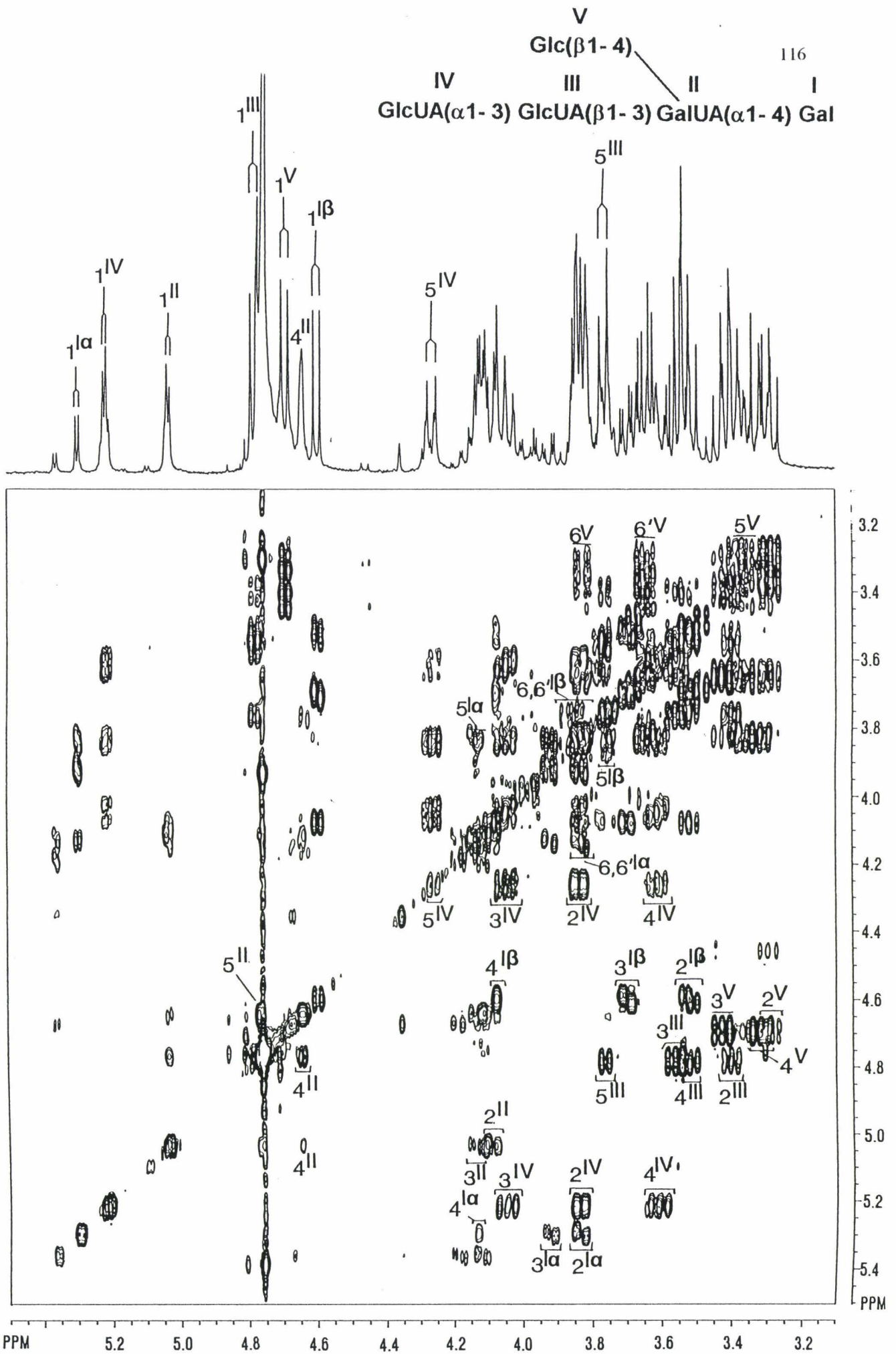


Figure 45: Spectre de résonance magnétique nucléaire COSY à 2 relais de l'oligosaccharide D.
 Nomenclature 1 α : proton H-1 de l'unité monosaccharidique I (anomère α).

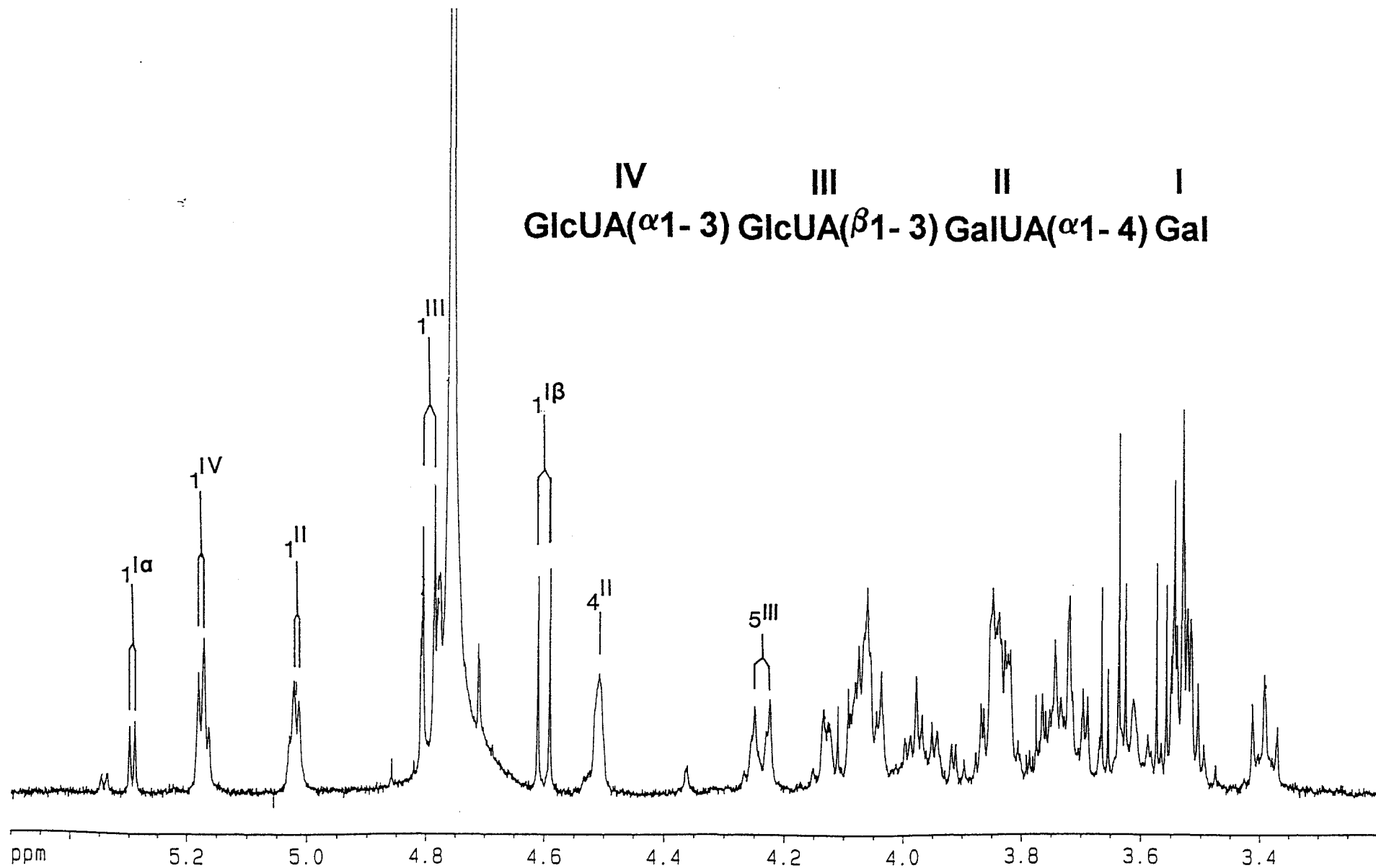


Figure 46: Spectre de résonance magnétique nucléaire de l'oligosaccharide E.

6.5. Conclusion

Les différentes analyses réalisées sur les oligosaccharides A, B, C, D et E permettent de proposer une hypothèse de structure pour l'unité de répétition du polysaccharide 1644 (Fig. 47). Cette structure octasaccharidique est composée de quatre acides uroniques présents dans les oligosaccharides et de quatre hexoses, en accord avec les dosages colorimétriques qui donnent un pourcentage d'acides uroniques identique à celui des oses neutres. La chaîne principale est composée de trois acides uroniques (2 GlcUA et 1 GalUA) consécutifs à deux hexoses (1 Gal et 1 hexose non défini). L'acide galacturonique constitue le point de branchement de l'unité de répétition sur lequel est greffée une chaîne latérale contenant l'oligosaccharide C. Cette hypothèse est en accord avec une analyse préliminaire réalisée en CPG/SM sur le polysaccharide carboxy-réduit en présence de borodéutérure de sodium, perméthylé, méthanolysé et acétylé. En effet, cette analyse montre que l'acide 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucuronique est en position terminale non réductrice. Cette analyse montre aussi la présence d'acide glucuronique substitué en 3, d'acide glucuronique substitué en 4 et de glucose substitué en 4. En revanche, elle ne permet pas de les quantifier.

L'élucidation de la structure des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle du polysaccharide 1644 a aussi permis de répondre à certaines questions qui se sont posées au cours de ce travail.

Une première remarque peut être faite en ce qui concerne la séparation des oligosaccharides par chromatographie d'échange d'anions à haut pH (Fig. 41 p.108). Elle dépend en premier lieu de la charge ; ainsi, les oligosaccharides A et B qui possèdent deux acides uroniques sont élués en premier. Puis vient le disaccharide C qui possède deux charges apportées par l'acide 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucuronique. Et enfin arrivent les oligosaccharides D et E qui possèdent trois acides uroniques. Toutefois, on peut remarquer que la substitution en 4 de l'acide galacturonique par un glucose dans les oligosaccharides A et

D, et par conséquent la présence d'oxyanions supplémentaires, ne retarde pas l'élution mais au contraire la facilite. Ce glucose pourrait en fait gêner l'accessibilité de la fonction carboxylique de l'acide galacturonique à la résine cationique de la colonne carbo Pac PA1.

La difficulté à réduire complètement l'acide galacturonique des oligosaccharides A et D s'est aussi présentée au cours de cette étude. En effet, la substitution en 4 de l'acide galacturonique par un glucose diminue le rendement de réduction. La dérivation de la fonction carboxylique par méthylestérification aurait bien lieu comme le décrit la figure 28a p.84 pour le composé AII, mais la réduction en fonction alcool primaire serait gênée par un encombrement stérique.

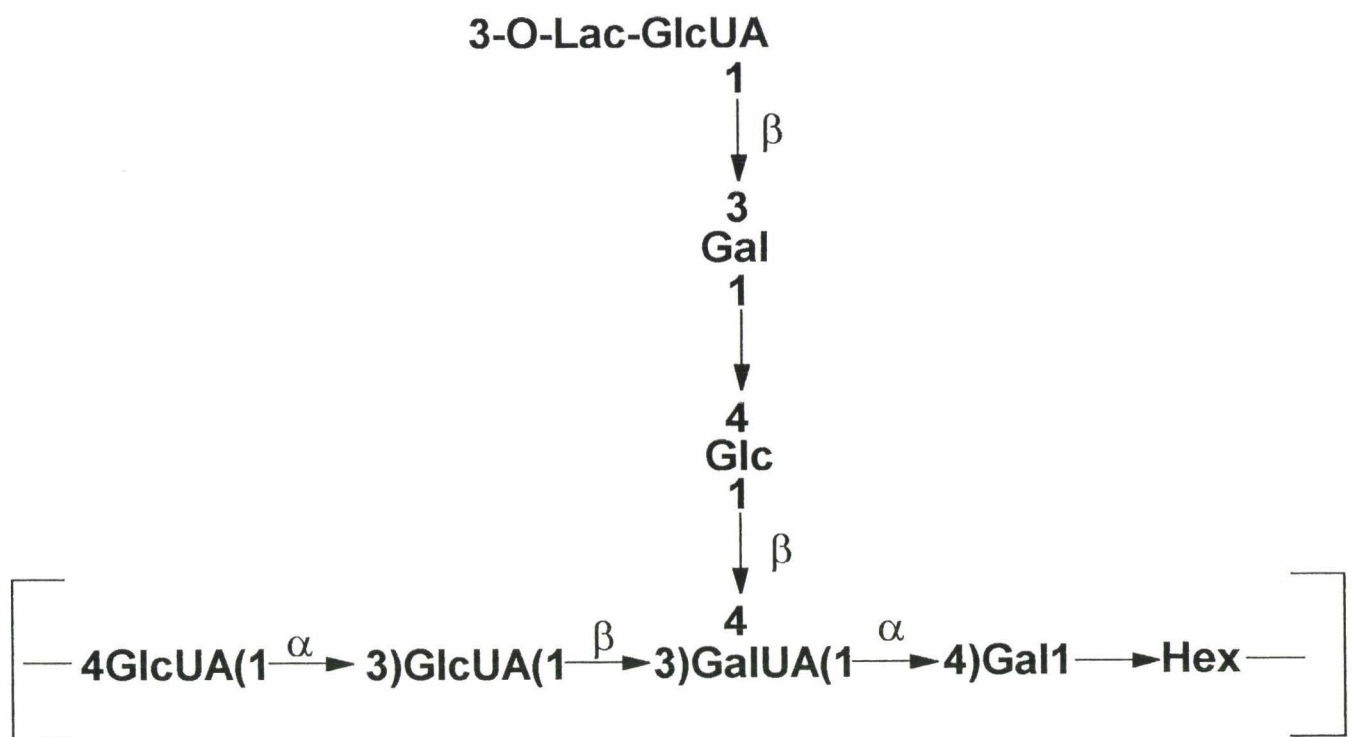


Figure 47: Hypothèse de structure pour l'unité de répétition du polysaccharide 1644.

7. ANALYSE STRUCTURALE DES ETHYLGLYCOSIDES PERMETHYLES.

La méthode des alditols acétates partiellement méthylés est une approche classique pour la détermination de la structure des oligosaccharides (Hellerqvist, 1990). Cependant, l'hydrolyse des différents types d'hexoses, (hexosamines, acides uroniques, acides sialiques) requiert des conditions différentes ; des réactions de-O-méthylation ou de destruction de sucres labiles comme les acides sialiques peuvent se produire. C'est pourquoi la méthanolyse suivie de la peracétylation a été proposée comme alternative à l'hydrolyse. Une seule étape suffit ici à libérer les sucres avec peu ou pas de dégradation (Fournet *et al.*, 1981). De plus, les méthylglycosides obtenus sont plus stables que les sucres réduits et sont dépourvus des sels provenant de la réduction. Toutefois, cette méthode a pour inconvénient de faire apparaître tous les isomères des sucres analysés (les anomères α et β , les formes furanose et pyranose), rendant les chromatogrammes plus complexes et donc leur interprétation plus difficile.

Dans ce chapitre, nous proposons une nouvelle méthode d'analyse structurale des oligosaccharides perméthylés basée sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

7.1. Méthodologie.

L'oligosaccharide perméthylé (schéma 4) est éthanolysé de façon à libérer des monosaccharides partiellement méthylés. Les éthylglycosides sont préférés aux méthylglycosides afin de d'identifier spécifiquement l'hydroxyle en position 1 et d'éviter, lors de la fragmentation de l'ion B1, des interférences avec d'autres ions obtenus par perte de méthanol en position 2, 3, 4 ou 6 (schéma 5). Les éthylglycosides sont ensuite deutérométhylés afin de marquer les hydroxyles libres. Ils sont alors analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem en mode CI.

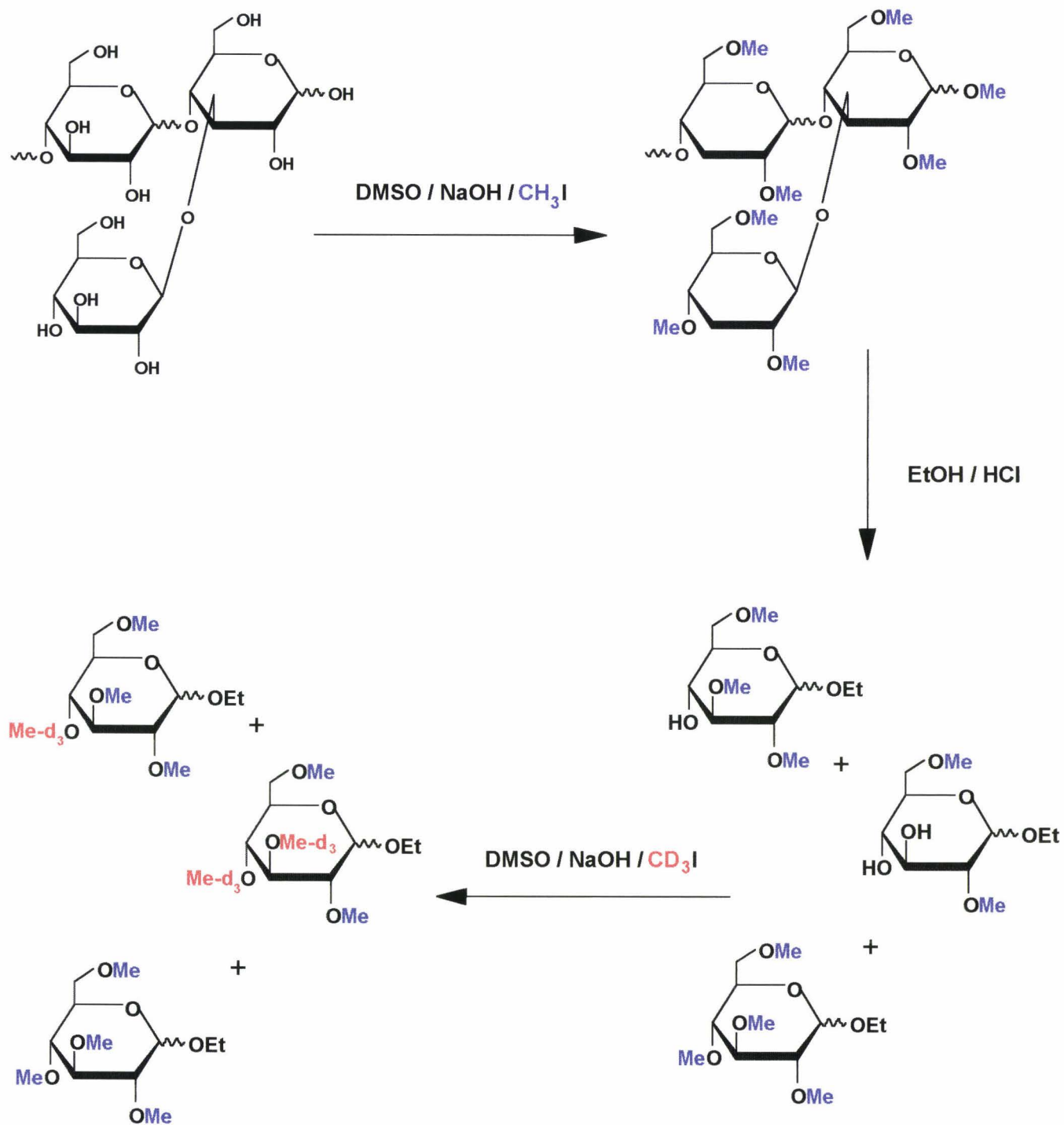


Schéma 4

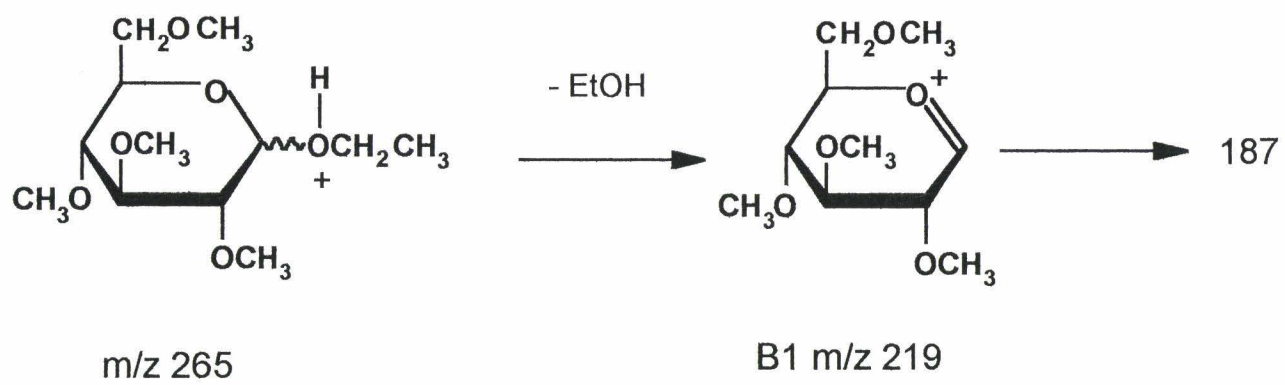


Schéma 5

La nature (Glc, Gal, Man) des éthylglycosides perméthylés est déterminée par les temps de rétention observés par chromatographie en phase gazeuse. Le tableau 13 montre l'importance du support chromatographique pour leur séparation. Les analyses réalisées sur une colonne capillaire de type OV 101 montrent clairement la coélution des formes pyranique et furanique du galactose ainsi que sa coélution avec le mannose. Par contre, les analyses menées sur une colonne de type Carbowax 20 M donnent une excellente séparation de ces mêmes produits.

Tableau 13: Temps de rétention observés par chromatographie en phase gazeuse pour les éthylglycosides perméthylés [min].

	Carbowax 20M	Silicone OV-101
α -D-Glc- <i>p</i>	12.6	12.7
β -D-Glc- <i>p</i>	15.0	13.6
α -D-Gal- <i>p</i>	16.9	14.1
α/β -D-Gal- <i>p</i>	17.9	14.5
α/β -D-Gal- <i>f</i>	16.1	14.0
α/β -D-Gal- <i>f</i>	17.6	14.5
α -D-Man- <i>p</i>	16.0	14.0
β -D-Man- <i>p</i>	19.3	14.3

Les espèces moléculaires observées par CI/MS permettent de quantifier le nombre d'atomes de deutérium apportés par CD₃I et de préciser ainsi le degré de substitutions des dérivés perméthylés. La position des deutérométhyls est quant-à elle obtenue par la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

7.2. Analyse.

7.2.1. CIMS des éthylglycosides perméthylés.

L'ionisation chimique a été choisie pour nos études car elle préserve l'intégrité des espèces moléculaires. Cependant le choix du gaz réactant utilisé lors de l'ionisation chimique est important pour notre étude car il affecte la formation de l'ion B_1 . Des analyses préliminaires de l'éthylmannoside perméthylé ont été réalisées par ionisation chimique en présence des gaz ammoniac, méthane et isobutane (Fig 48).

Le spectre réalisé en présence d'ammoniac (Fig. 48a) montre principalement les espèces moléculaires $[M+NH_4]^+$ à m/z 282 et $[M+H]^+$ à m/z 265. L'ions B_1 à m/z 219 est de faible intensité et l'on peut observer son adduit avec NH_4 à m/z 236. Le spectre obtenu avec l'isobutane (Fig. 48b) donne un signal principal à m/z 219, correspondant à l'ion B_1 . Ce dernier peut donner lieu à une élimination secondaire de méthanol et former l'ion à m/z 187. Le mélange méthane/hémioxyde d'azote, a été testé (Fig. 48c). La fragmentation est, dans ce cas, un peu plus importante, notamment en ce qui concerne l'intensité de l'ion à m/z 187.

L'ionisation chimique avec l'isobutane ou le mélange méthane/hémioxyde d'azote paraît donc adaptée pour les analyses MS/MS. Malgré les meilleurs résultats obtenus avec l'isobutane, c'est le mélange méthane/hémioxyde d'azote utilisé en routine dans le laboratoire qui a été retenu pour cette étude.

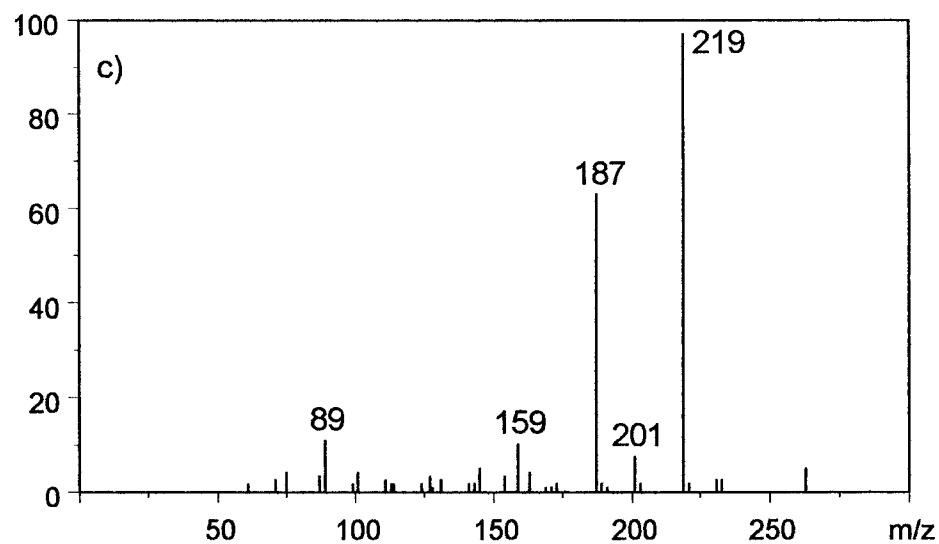
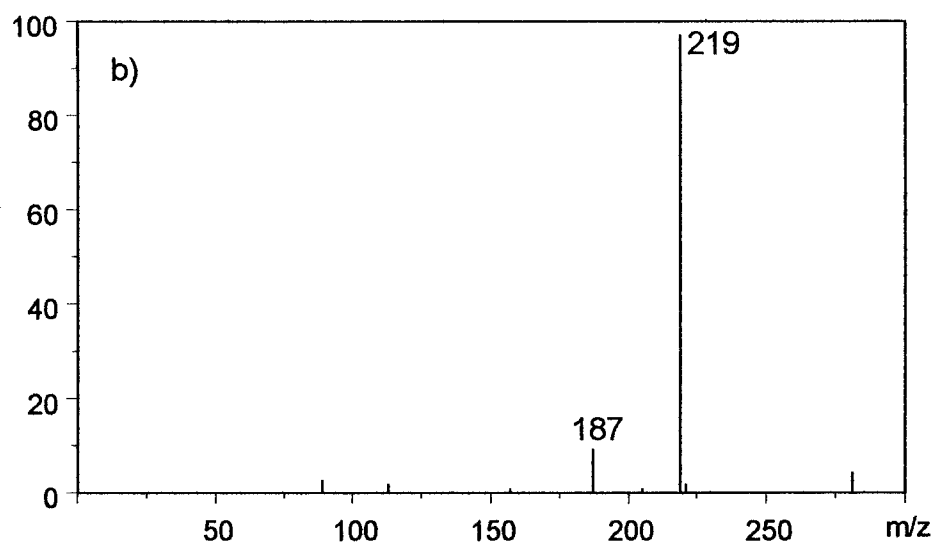
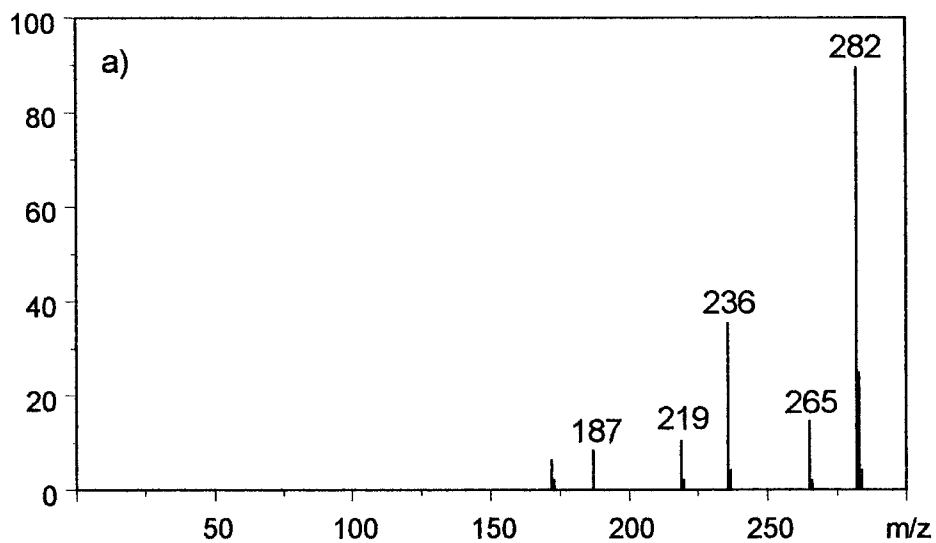


Figure 48: Spectres de masse en ionisation chimique de l'éthylmannoside perméthylé utilisant différents gaz réactants : ammoniac (a), isobutane (b), méthane/hémioxyde d'azote (c).

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la CI/MS permet de quantifier le deutérium et donc de caractériser le degré de substitution des monosaccharides concernés. De cette façon, un monosaccharide en position terminale non réductrice ne possédera aucun groupement CD_3 et sera $-d_0$, alors qu'un monosaccharide monosubstitué porteur d'un groupement CD_3 sera $-d_3$. Enfin, un monosaccharide disubstitué porteur de deux groupements CD_3 sera $-d_6$.

7.2.2. Analyses MS/MS des mono(trideutérométhyl)-tris-méthyl-éthylglycosides.

Les éthylglucosides deutérométhylés de façon spécifique en position 2, 3, 4 et 6 sont préparés à partir des disaccharides suivants : sophorose [$Glc\beta(1-2)Glc$], laminaribiose [$Glc\beta(1-3)Glc$], cellobiose [$Glc\beta(1-4)Glc$] et gentiobiose [$Glc\beta(1-6)Glc$]. Ceux-ci sont d'abord perméthylés, puis éthanolysés et enfin deutérométhylés suivant le schéma 4. L'ion B1 à m/z 222 généré en source et provenant du produit mono(trideutérométhylé) est analysé par spectrométrie de masse en tandem. La position du CD_3 affecte évidemment la fragmentation et donne des spectres caractéristiques d'une substitution en 3, en 4 et en 2 ou 6 (Fig. 49). Ces différences peuvent être traduites par le rapport des intensités des ions à m/z 111 et 114 et celui des ions à m/z [B_1-35] et [B_1-32] (Tableau 14) [-35 correspond à une perte de CD_3OH et -32 à une perte de CH_3OH]. Comme le montrent les résultats précédents, différencier la substitution en 2, de la substitution en 6 n'est pas possible. Ce problème peut être résolu en réalisant les spectres MS/MS de l'ion à m/z 190 [B_1-CH_3OH] qui constitue un fragment important dans le spectre CIMS (Fig. 50).

Les spectres MS/MS de l'ion B1 à m/z 222 des éthylgalactosides (Fig. 51) et des éthylmannosides (Fig. 52) montrent que la nature du sucre n'affecte pas la fragmentation.

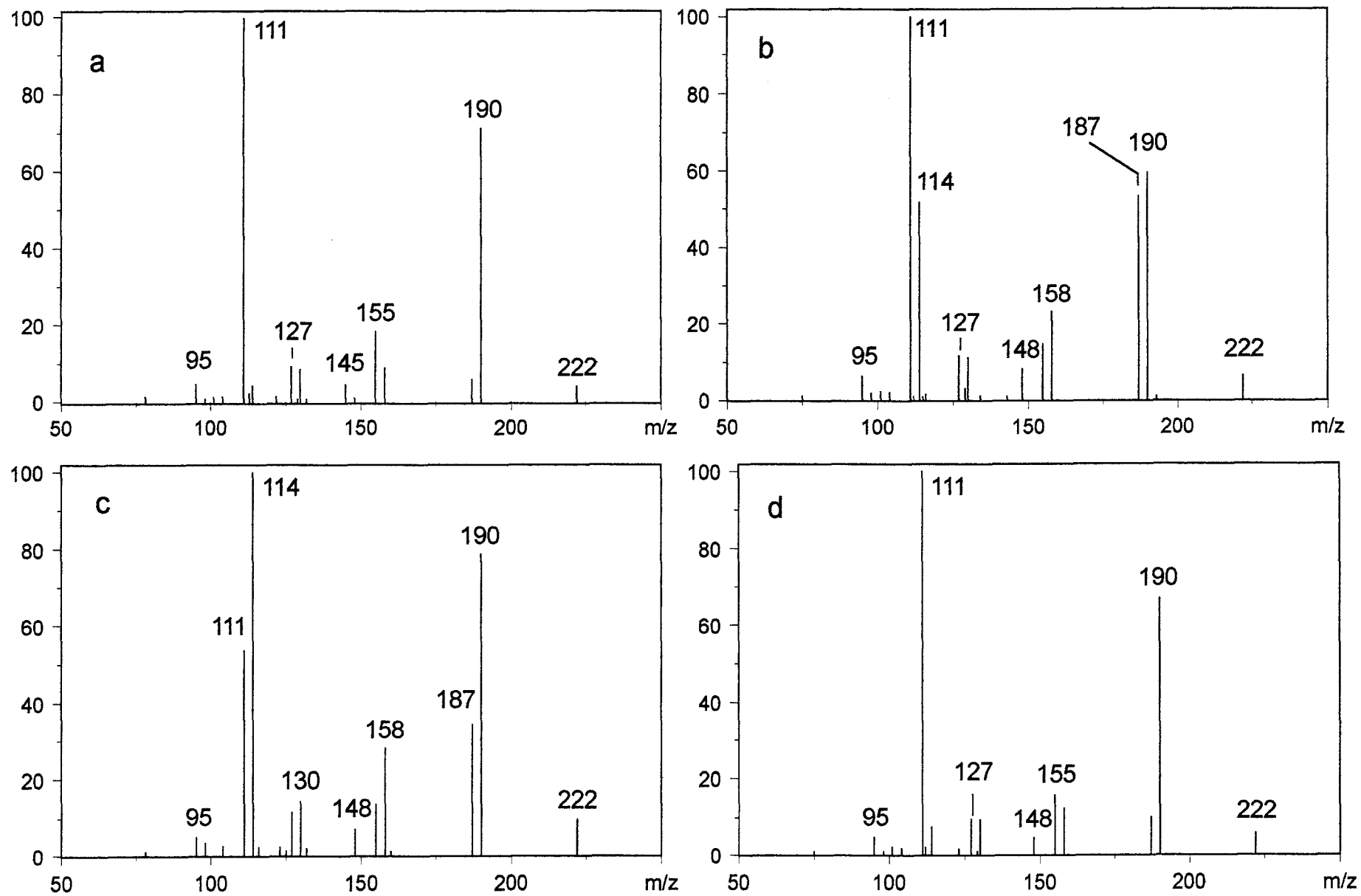


Figure 49: Spectres CIMS/MS des ions B1 des éthylglucosides perméthylés, sélectivement deutérométhylés (a) Glc-2CD₃, (b) Glc-3CD₃, (c) Glc-4CD₃, (d) Glc-6CD₃.

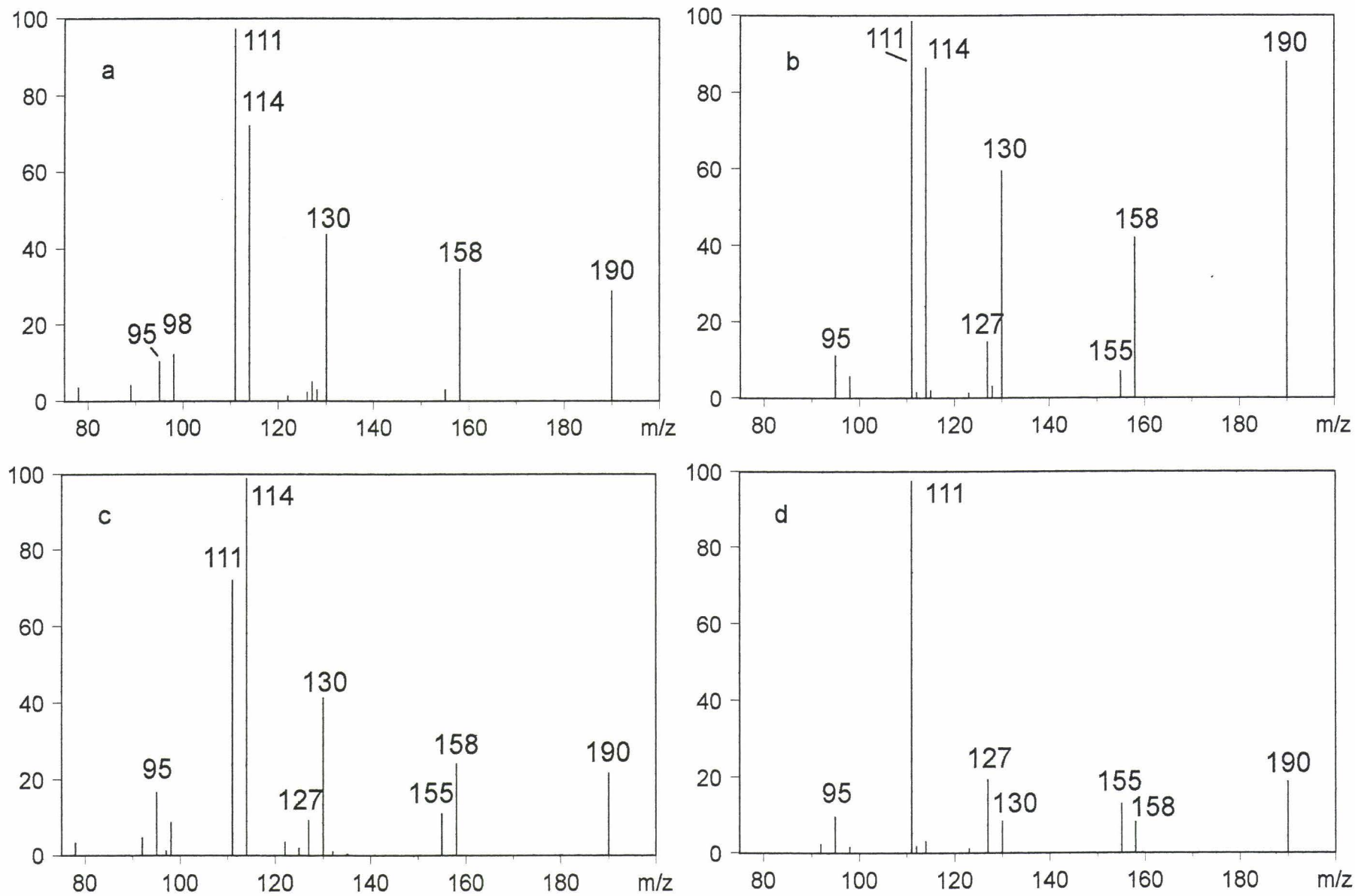


Figure 50: Spectres CIMS/MS des ions à m/z 190 des éthylglucosides perméthylés sélectivement deutérométhylés, (a) Glc-2CD₃, (b) Glc-3CD₃, (c) Glc-4CD₃, (d) Glc-6CD₃.

Ces données sont réunies dans le tableau 14. Ces observations sont aussi valables pour les spectres MS/MS de l'ion à m/z 190. Notons que les résultats décrits concernent uniquement les éthylglycosides pyraniques et que les fragmentations observées dans le cas des éthylgalactosides furaniques sont totalement différentes.

Tableau 14: Intensités relatives des paires d'ions à m/z 111/114 et $[B_1-35]/[B_1-32]$

pour les différents éthylglycosides perméthylés.

	Intensités relatives	
	m/z 111/114	m/z $[B_1-35]/[B_1-32]$
Glc-2	93 : 7	14 : 86
Glc-3	67 : 33	46 : 54
Glc-4	38 : 62	30 : 70
Glc-6	96 : 4	9 : 91
Gal-2	84 : 16	4 : 96
Gal-3	72 : 28	55 : 45
Gal-4	43 : 57	29 : 71
Gal-6	91 : 9	10 : 90
Man-2	94 : 6	10 : 90
Man-3	68 : 32	56 : 44
Man-4	36 : 64	27 : 73
Man-6	95 : 5	7 : 93

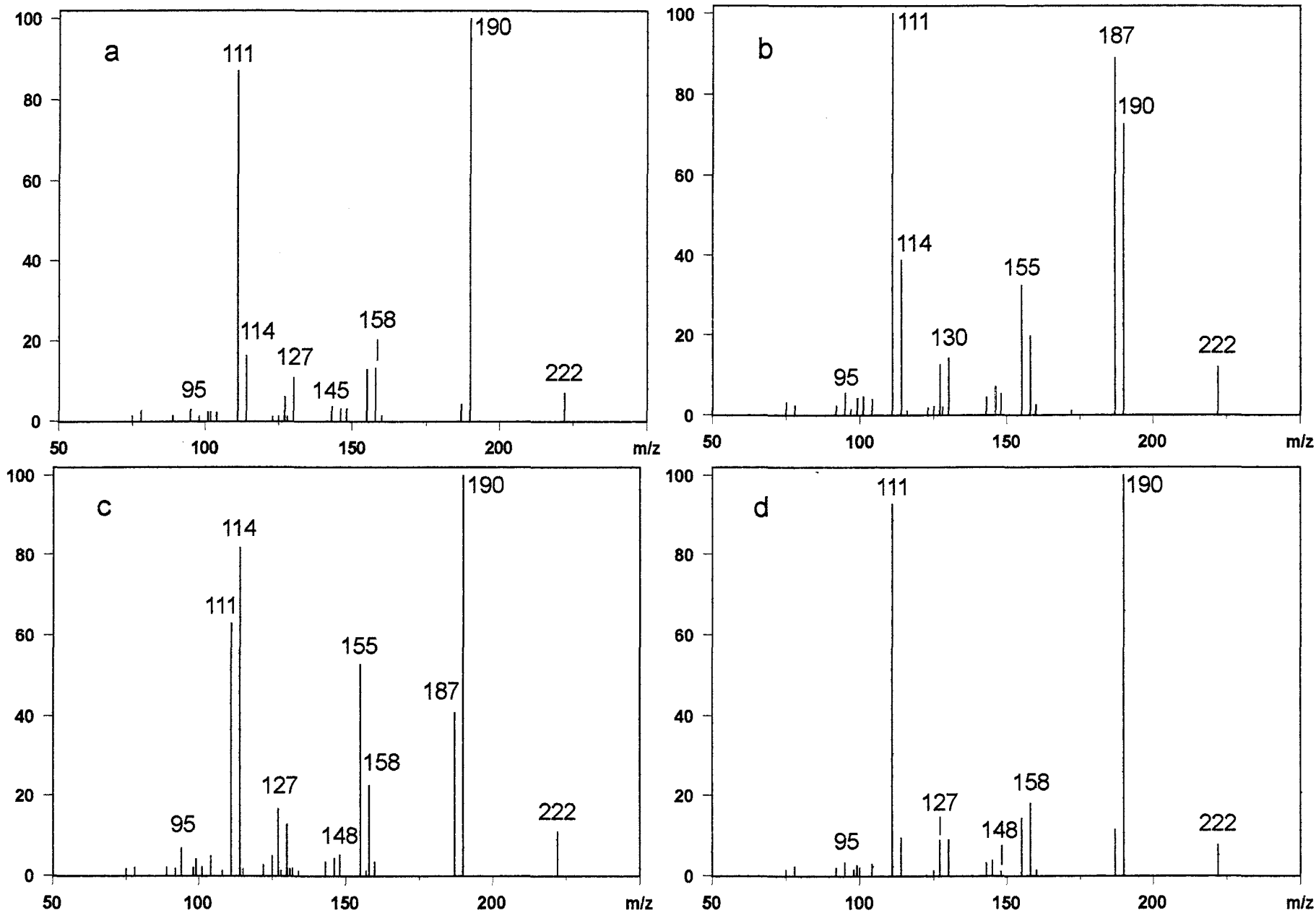


Figure 51: Spectres CIMS/MS des ions B1 des éthylgalactosides pyraniques perméthylés, sélectivement deutérométhylés, (a) Gal-2CD₃, (b) Gal-3CD₃, (c) Gal-4CD₃, (d) Gal-6CD₃.

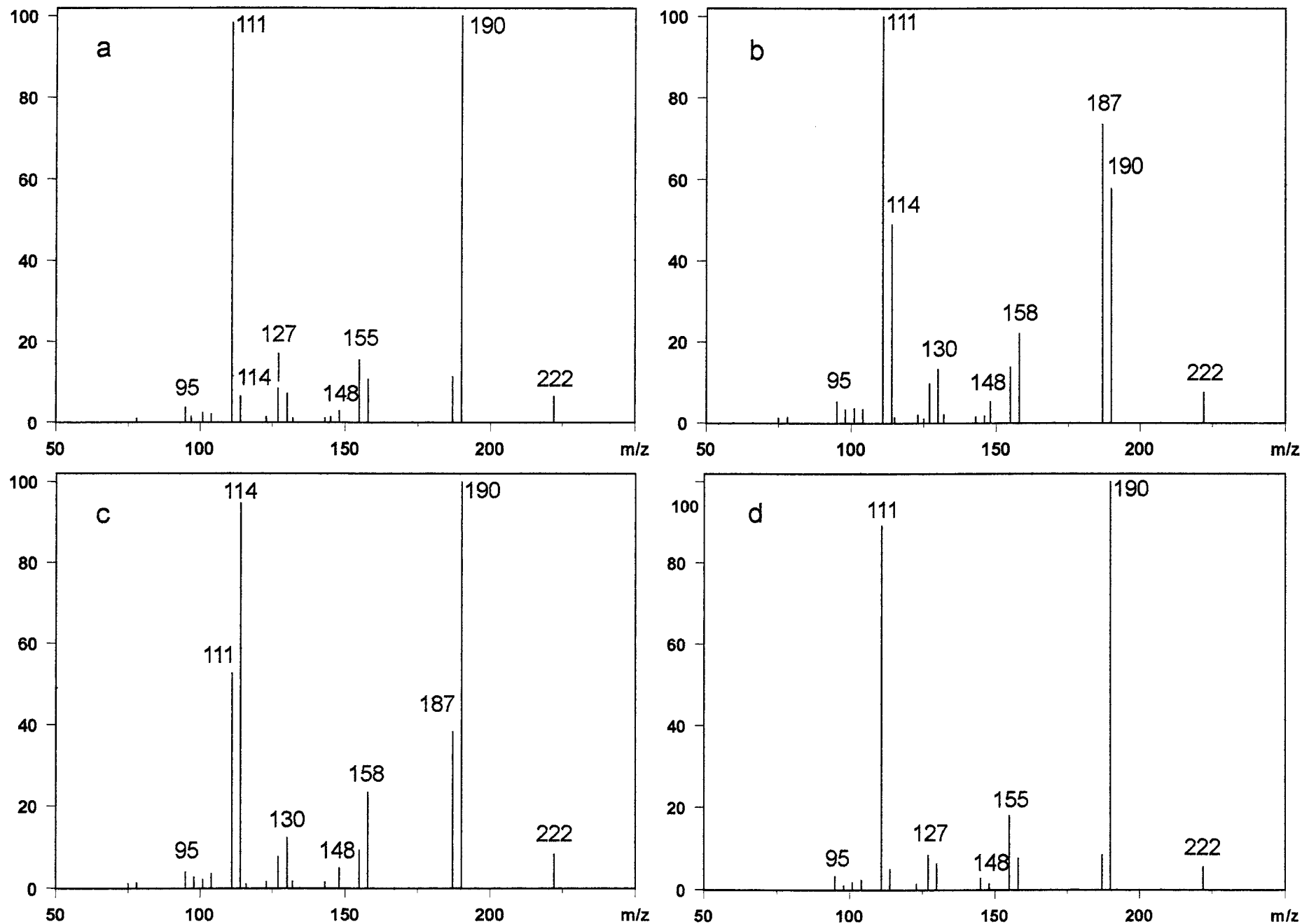


Figure 52: Spectres CIMS/MS des ions B1 des éthylmannosides perméthylés, sélectivement deutérométhylés, (a) Man-2CD3, (b) Man-3CD3, (c) Man-4CD3, (d) Man-6CD3.

7.2.3. Additivité.

Nous avons réalisé une analyse systématique de tous types d'éthylglucosides substitués incluant les bis(trideutérométhyl)-di-méthyl-éthylglucosides et les tris(trideutérométhyl)-méthyl-éthylglucosides. Les bis(trideutérométhyl)-di-méthyl-éthylglucosides marqués en position 4/6, 3/4 et 2/4 sont préparés respectivement à partir du méthyl-4,6-O-benzylidène- α D-Glc, du 3-fucosyl lactose et d'une saponine isolée de *Phytolacca dodecandra* (Domon et Hostettmann, 1984) en utilisant le protocole suivant : méthylation, éthanolyse et deutérométhylation. La préparation des dérivés marqués en position 2/3, 2/6 et 3/6 fait appel aux mêmes produits que précédemment mais utilise le protocole inverse : deutérométhylation, éthanolyse et méthylation. Enfin, les tris(trideutérométhyl)-méthyl-éthylglucosides marqués en position 2/3/4, 2/3/6, 2/4/6 et 3/4/6 sont préparés à partir du sophorose, du laminaribiose, du cellobiose et du gentiobiose suivant ce dernier protocole.

Les ions B_1 correspondant à tous ces dérivés avec m/z 225(- d_6) ou 228(- d_9) sont alors analysés par MS/MS. Les intensités relatives des ions à m/z [B_1 -35] et [B_1 -32] ainsi que celles des ions à m/z 111 et 114 sont données dans le Tableau 15. Les valeurs expérimentales obtenues pour les bis(trideutérométhyl)-di-méthyl-éthylglucosides et les tris(trideutérométhyl)-méthyl-éthylglucosides sont comparées aux valeurs calculées à partir résultats obtenus pour les quatre mono(trideutérométhyl)-tri-méthyl-éthylglucosides. Par exemple, nous considérons que la perte de méthanol- d_3 par l'ion B_1 provenant du 2,3 bis(trideutérométhyl)-4,6 diméthyl-éthylglucoside correspond à la somme des pertes d'un méthanol- d_3 en position 2 (14%) et d'un méthanol- d_3 en position 3 (46%), soit 60%, c'est-à-dire une valeur comparable aux 62% mesurés de façon expérimentale (Tableau 15). De la même manière, les rapports des ions 111 et 114 donnent 7% pour la substitution en 2, 33% pour la substitution en 3, soit une

somme de 40% comparable aux 38% obtenus expérimentalement. L'excellente cohérence de ces données démontre qu'il est possible de définir une règle d'additivité des processus de fragmentation et qu'il est possible de prévoir les intensités relatives des paires d'ions à m/z 111/114 et $[B_1-35]/[B_1-32]$.

Tableau 15: Intensités relatives des paires d'ions à m/z 111/114 et $[B_1-35]/[B_1-32]$.

Position des groupements CD_3	ion parent m/z	m/z 111/114		$[B_1-35]/[B_1-32]$.	
		cal.	exp.	cal.	exp.
2	222	-	93 : 7 ¹⁾	-	14 : 86 ¹⁾
3	222	-	67 : 33 ¹⁾	-	46 : 54 ¹⁾
4	222	-	38 : 62 ¹⁾	-	30 : 70 ¹⁾
6	222	-	96 : 4 ¹⁾	-	9 : 91 ¹⁾
2,3	225	60 : 40	62 : 38	60 : 40	62 : 38
4,6	225	34 : 66	39 : 61	39 : 61	37 : 63
2,4	225	31 : 69	24 : 76	44 : 56	45 : 55
3,6	225	63 : 37	65 : 35	55 : 45	45 : 55
2,6	225	89 : 11	92 : 8	23 : 77	17 : 83
3,4	225	5 : 95	5 : 95	76 : 24	81 : 19
2,3,4	228	4 : 96	7 : 93	91 : 9	83 : 17
2,3,6	228	62 : 38	54 : 46	70 : 30	73 : 27
2,4,6	228	33 : 67	30 : 70	54 : 46	57 : 43
3,4,6	228	7 : 93	7 : 93	86 : 14	83 : 17

¹⁾Base pour les calculs

7.2.4. Application à l'oligosaccharide E issu du polysaccharide 1644.

La méthodologie développée ci-dessus a été appliquée à l'oligosaccharide E issu du polysaccharide 1644. Pour cela, ce dernier a été préalablement couplé à l'aniline et les acides uroniques ont été réduits en hexoses à l'aide d'un borohydrure de potassium afin d'obtenir l'oligosaccharide suivant: Glc(α 1-3)Glc(β 1-3)Gal(α 1-4)Gal-aniline.

Ce produit a ensuite été N-acétylé, perméthylé, éthanolysé et deutérométhylé. Les éthylglycosides perméthylés sont analysés par CIMS/MS.

Le chromatogramme obtenu indique la présence de quatre pics. Les temps de rétention observés permettent d'attribuer les deux premiers pics au glucose et les deux suivants au galactose. L'intégration des pic en GC donne la composition suivante : 1 Gal/ 2Glc.

L'analyse CIMS montre la présence d'un résidu de glucose en position terminale non réductrice ($-d_0$), d'un résidu de glucose monosubstitué ($-d_3$) et d'un résidu de galactose monosubstitué ($-d_3$). Le résidu galactose couplé à l'aniline n'est pas retrouvé dans cette analyse car il est désacétylé lors de l'éthanolyse. Son étude fera l'objet du chapitre suivant.

Afin de préciser la nature de la substitution des monosaccharides ou plus précisément la position du groupement CD_3 , les ions B_1 à m/z 222 des résidus de glucose et de galactose sont analysés par spectrométrie de masse en tandem. La figure 53 montre le spectre MS/MS de l'ion B_1 du glucose monosubstitué présent dans l'oligosaccharide E ainsi que le spectre MS/MS du dérivé de référence. Nous pouvons immédiatement identifier par son empreinte la substitution en 3 du glucose. Des résultats similaires ont été obtenus pour le galactose monosubstitué qui est substitué en position 3. L'oligosaccharide E possède donc un glucose en position terminale non réductrice, un glucose substitué en 3 et un galactose substitué en position 3.

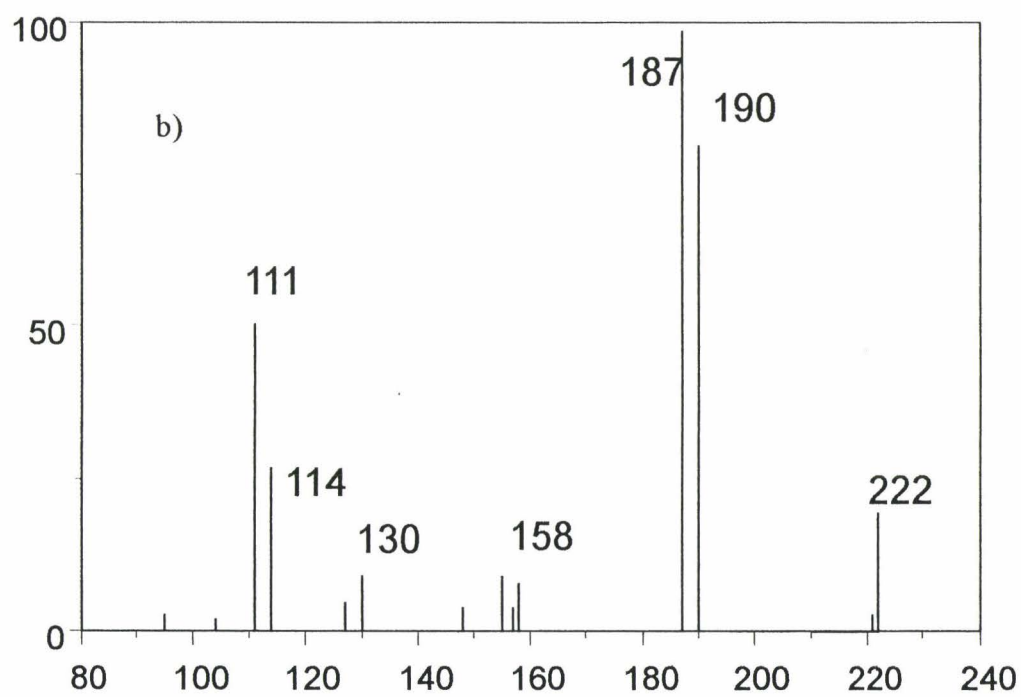
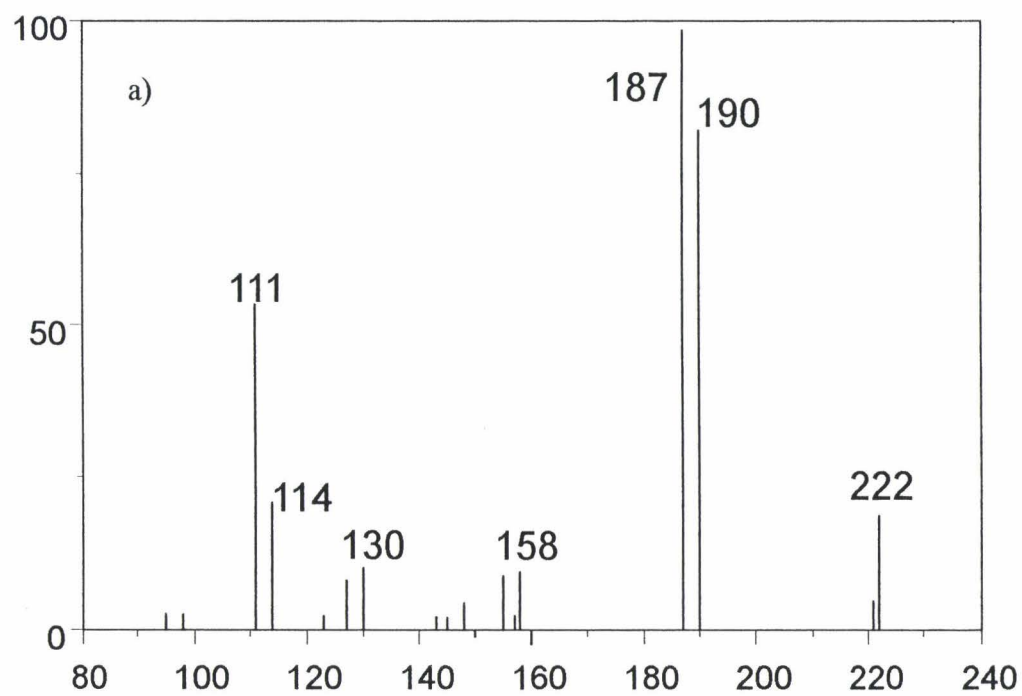


Figure 53: Spectres CIMS/MS des ions à m/z 222 de l'éthylglucoside perméthylé de l'oligosaccharide E (a) et du dérivé témoins Glc-3-CD3 (b)

Cette étude a aussi été réalisée sur l'oligosaccharide E réduit en présence d'un borodeutériure de sodium. L'analyse CIMS montre la présence d'un résidu de glucose- d_2 en position terminale non réductrice ($-d_2$), d'un résidu de glucose- d_2 monosubstitué ($-d_5$) et d'un résidu de galactose- d_2 monosubstitué ($-d_5$).

Le spectre MS/MS de l'ion B1 à m/z 225 est donné dans la figure 54. On peut observer les ions à m/z 189 et 192 correspondant aux ions à m/z 187 et 190 deutérés. Cependant, on ne retrouve pas les mêmes intensités relatives observées pour la référence. Les deutériums en position 6 interviendraient rapidement dans le processus de fragmentation. L'étude de ce type de dérivé reste donc à approfondir.

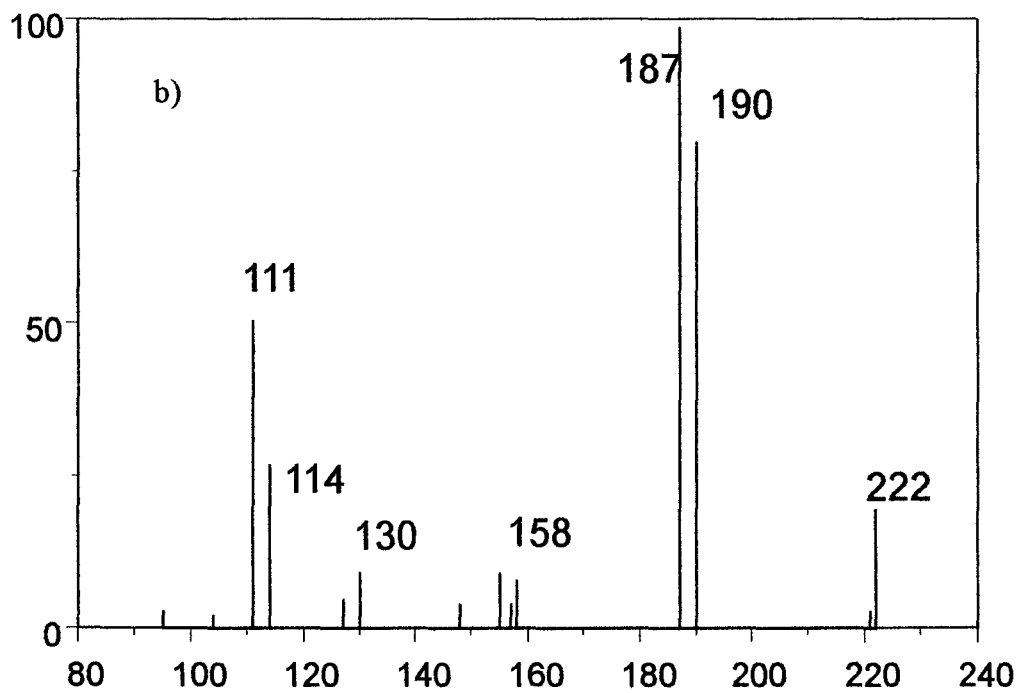
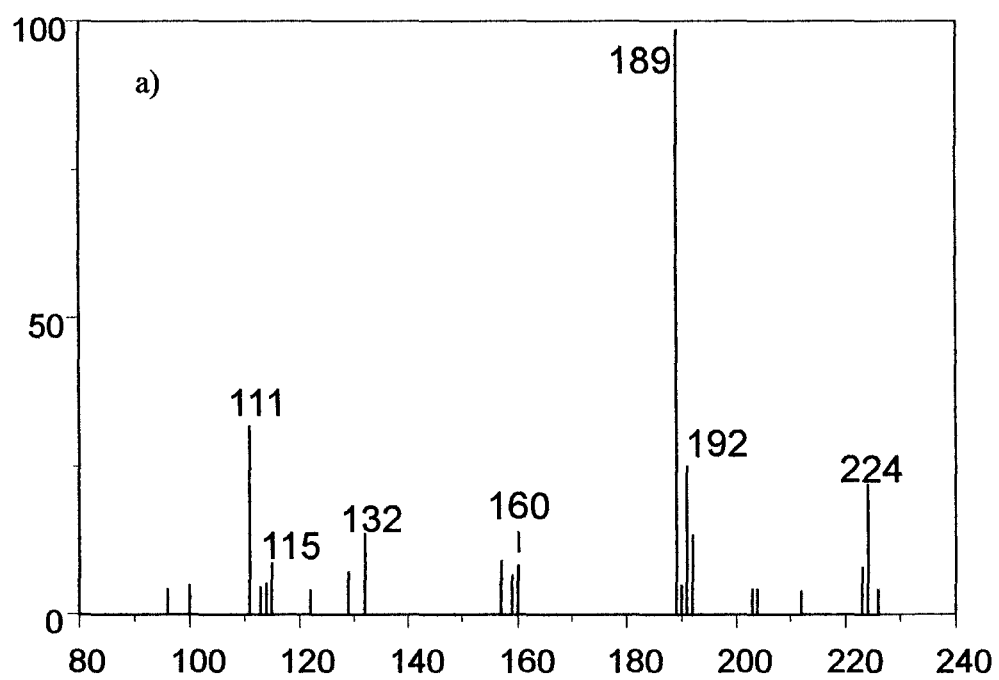


Figure 54: Spectres CIMS/MS de l'ions à m/z 225 de l'éthylglucoside- d_2 perméthylé de l'oligosaccharide E (a) et spectre CIMS/MS de l'ion à m/z 222 du dérivé témoins Glc-3-CD3 (b)

7.2.5. Analyse du monosaccharide en position terminale réductrice.

Comme nous l'avons précisé, le protocole de préparation des échantillons en vue d'une analyse CIMS/MS ne peut être appliqué tel quel aux oligosaccharides couplés à l'aniline. En effet, l'éthanololyse libère l'acétyle présent sur l'azote de l'aniline. Ce dernier donne un ammonium quaternaire lors de la deutérométhylation. Ceci rend polaire le monosaccharide couplé à l'aniline et donc impossible à analyser par chromatographie en phase gazeuse. Pour ce monosaccharide en position terminale réductrice et couplé à l'aniline, une étape supplémentaire de N-acétylation est donc nécessaire. Elle est effectuée après l'éthanololyse et avant la deutérométhylation. Le composé obtenu peut alors être analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode impact électronique. Pour cette étude, quatre témoins glucose couplés à l'aniline et marqués en position 2, 3, 4 ou 6 ont été préparés et analysés par spectrométrie de masse en mode impact électronique. Les spectres de masse donnés dans la figure 55 montrent des fragments caractéristiques de chaque substitution (Fig 56). Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats obtenus pour le galactose couplé à l'aniline et substitué en position 3 dans le cas de l'oligosaccharide C ou substitué en position 4 dans le cas de l'oligosaccharide E (Fig. 57).

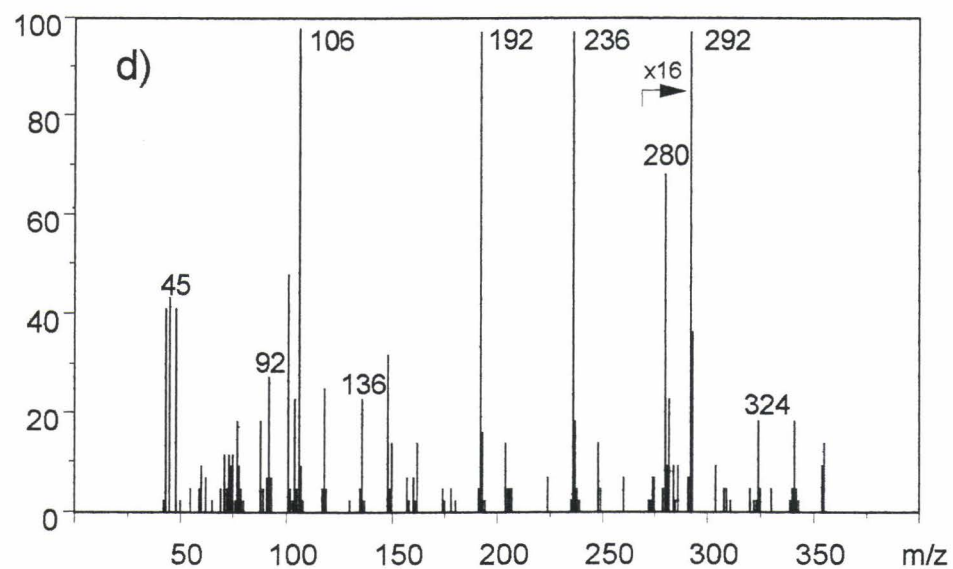
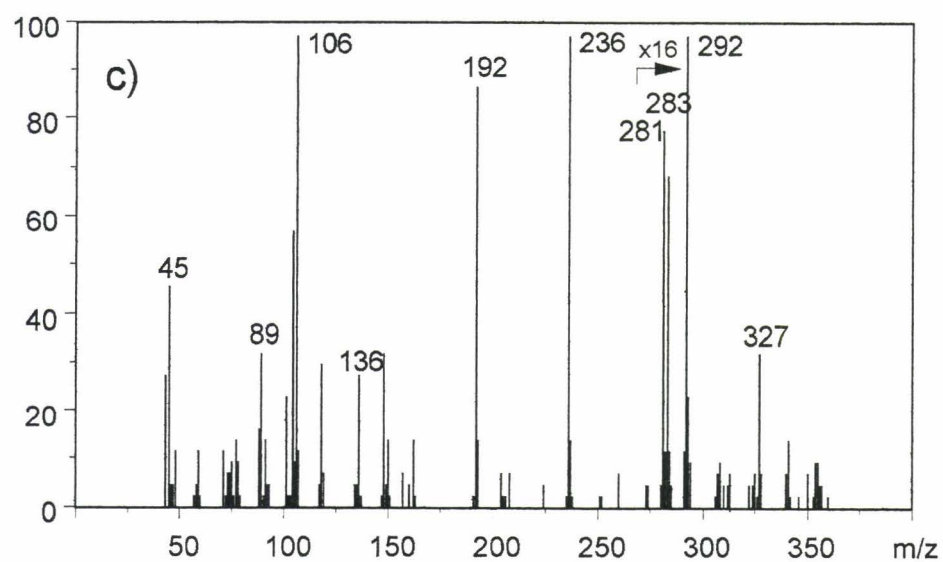
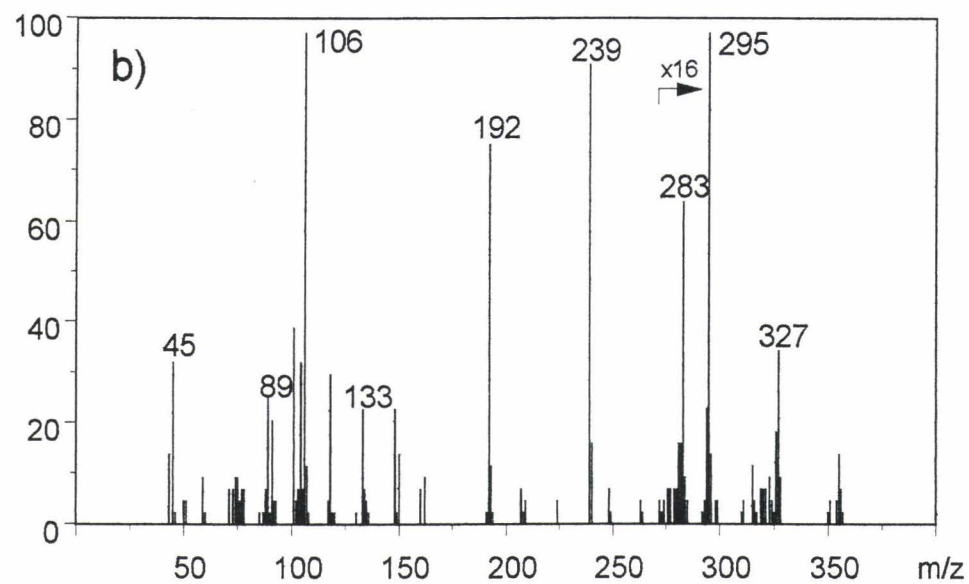
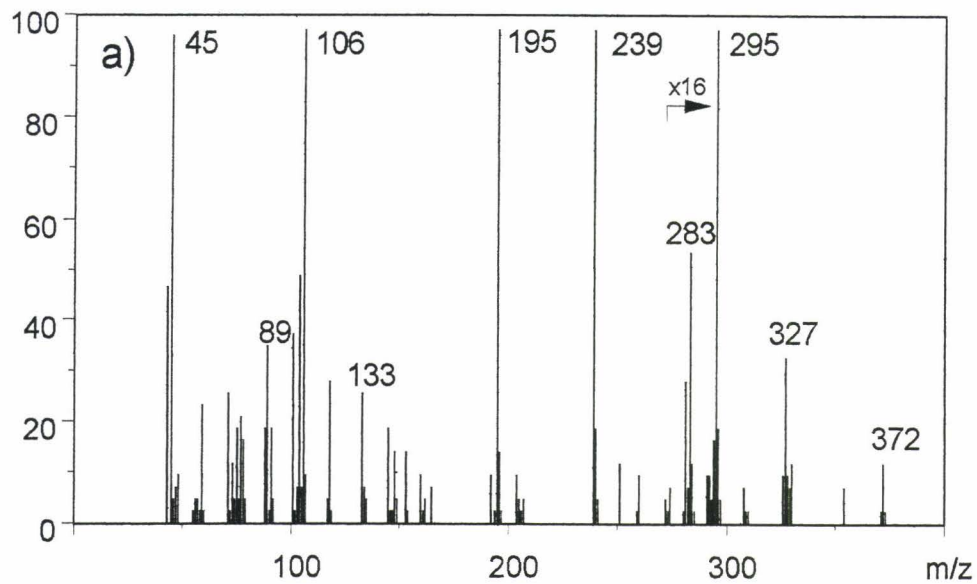


Figure 55 : Spectres EIMS des glucoses couplés à l'aniline, N-acétylés, perméthylés et sélectivement deutérométhylés en 2 (a), 3 (b), 4 (c) et 6 (d).

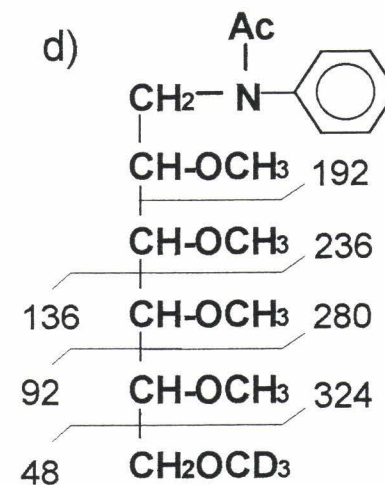
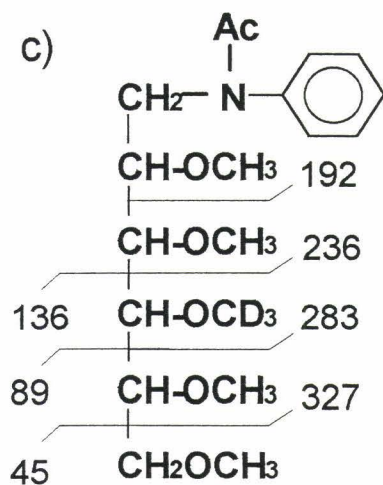
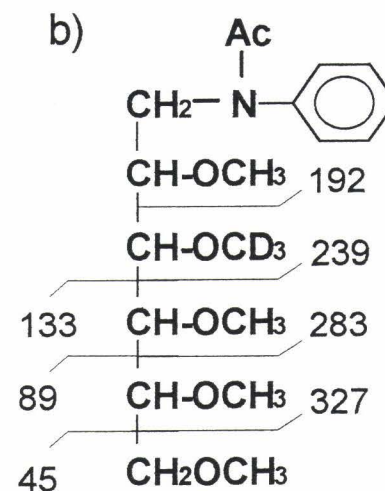
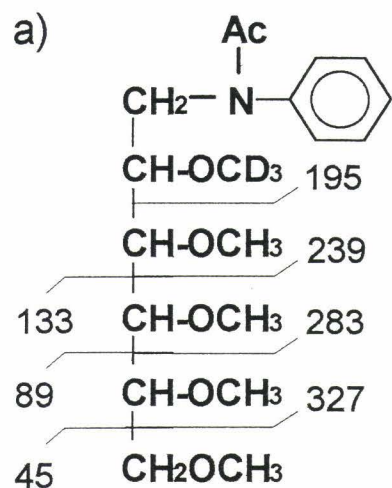


Figure 56 : Fragmentations obtenues par spectrométrie de masse en impact électronique pour les glucoses couplés à l'aniline, N-acétylés, perméthylés et sélectivement deutérométhylés en 2 (a), 3 (b), 4 (c) et 6 (d).

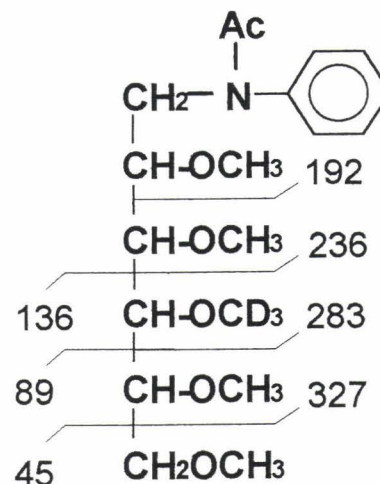
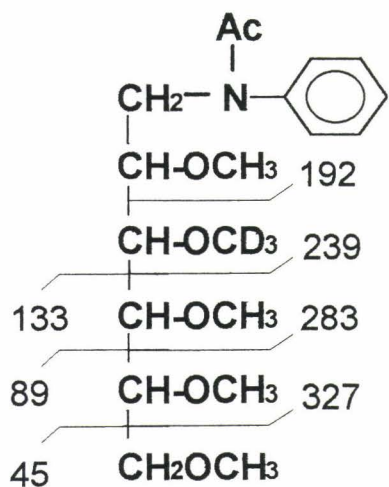
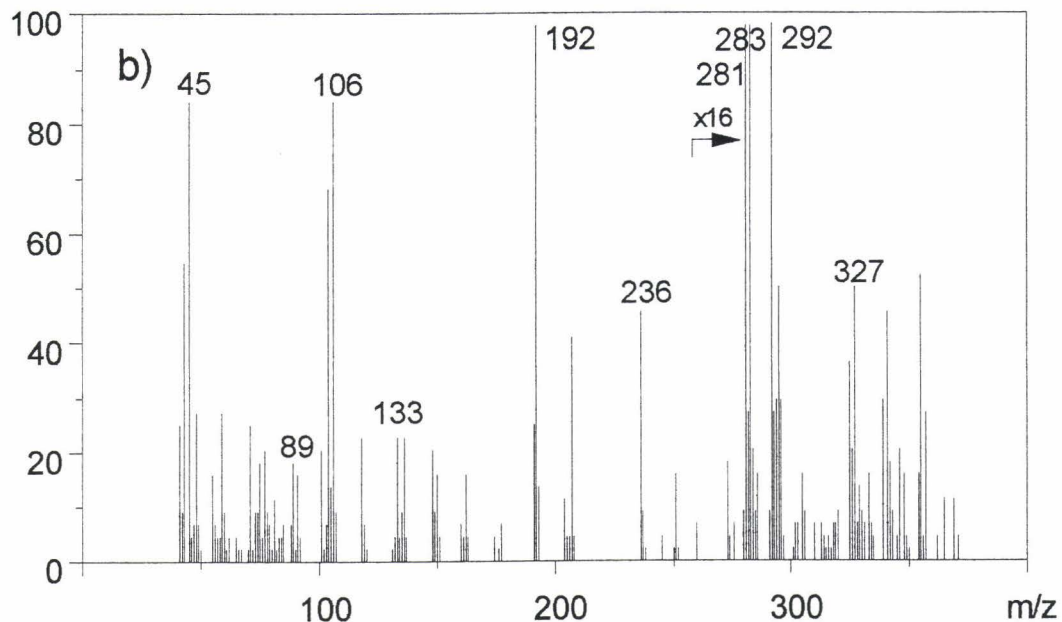
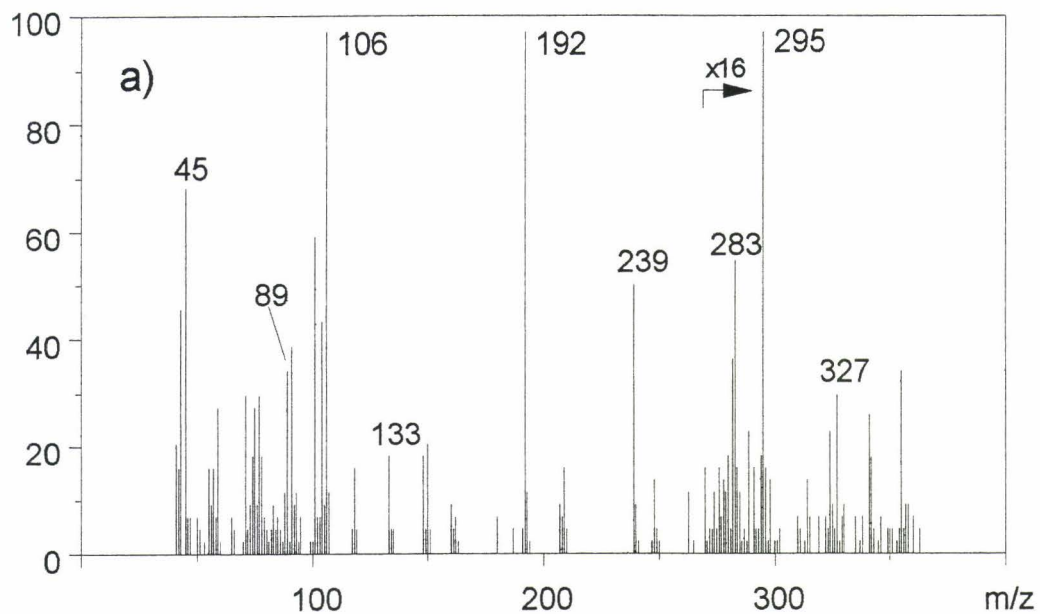


Figure 57 : Analyse par spectrométrie de masse en impact électronique des galactoses couplés à l'aniline, N-acétylés, perméthylés et sélectivement deutérométhylés, provenant de l'oligosaccharide C (a) et de l'oligosaccharide E (b).

7.3.2. Conclusion.

Notre étude montre que la détermination des liaisons glycosidiques par CIMS/MS est une alternative valable à la méthode des alditols acétates partiellement méthylés. Cette nouvelle méthode a pour premier avantage de simplifier l'analyse des chromatogrammes. En effet, puisqu'ils sont uniquement perméthylés, les éthylglycosides de même nature sont élués ensemble quelque soit leur degré de substitution. Dans ce cas, les références chromatographiques utilisées pour déterminer la nature des monosaccharides sont assez simples et correspondent par exemple à l'éthylglucoside perméthylé, l'éthylgalactoside perméthylé et l'éthylmannoside perméthylé.

Les spectres CIMS de ces dérivés permettent, quant-à eux, de déterminer le nombre de deutérium ($-d_0$, $-d_3$, $-d_6$) apportés par CD_3I et de caractériser le nombre de substitutions. Dans le cas des acides uroniques convertis en hexoses par un borodeutérure de sodium, il suffit d'ajouter 2 pour que cette règle soit toujours valable ($-d_2$, $-d_5$, $-d_8$).

Enfin, la nature des liaisons glycosidiques est déterminée par l'analyse des spectres MS/MS des ions B_1 ou de l'ion à m/z 190 dans le cas où le monosaccharide est substitué en position 2 ou 6. Cette étude MS/MS a permis de montrer que la fragmentation des éthylglycosides est indépendante de leur nature. Cette étude a aussi montré qu'une règle d'additivité peut être établie afin de prévoir la fragmentation des monosaccharides di-et trisubstitués à partir des monosaccharides monosubstitués.

Cependant, cette méthode connaît des limites lorsque l'on est en présence d'un mélange de monosaccharides de même nature mais monosubstitués à des positions différentes (Glc substitué en position 3 et Glc substitué en position 4 par exemple). Les deux éthylglucosides vont être élués en même temps par chromatographie en phase gazeuse et c'est un mélange d'ions B_1 de même masse qui va être analysé par MS/MS donnant des résultats ne

correspondant à aucune référence. Ce problème peut être résolu en éthylant au lieu de deutérométhyle et on peut alors séparer ces dérivés par chromatographie en phase gazeuse (Viseux, 1996).

CONCLUSION GENERALE

Lors de cette étude, il a été possible d'isoler, de purifier et de caractériser partiellement un exopolysaccharide excrété par la bactérie *Alteromonas sp.* 1644 qui se développe au niveau de l'épiderme de l'annélide polychète *Avinella caudata*.

Ce polymère très anionique dont la masse moléculaire avoisine 3000 kDa semble être constitué d'une unité de répétition octasaccharidique composée de D-glucose, de D-galactose, d'acide D-glucuronique, d'acide D-galacturonique et de l'acide 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucuronique. Ce dernier s'avère être un nouveau monosaccharide non décrit à l'heure actuelle.

L'analyse structurale des oligosaccharides constitués d'acides uroniques, préparés par l'hydrolyse partielle du polysaccharide 1644, a nécessité le développement d'une nouvelle méthodologie qui repose sur le couplage de l'oligosaccharide avec une molécule d'aniline (dérivation) afin de le rendre lipophile et détectable en UV. Les produits issus de la réduction des acides uroniques en hexoses deutérés peuvent ainsi être facilement purifiés par chromatographie liquide à haute performance. La conversion en hexoses deutérés a permis de nous affranchir des problèmes liés aux acides uroniques tels que leur β -élimination lors de la méthylation ou la résistance de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse, même drastique.

L'ESMS/MS des oligosaccharides couplés à l'aniline, réduits, N-acétylés et perméthylés a permis l'obtention d'informations relatives à la séquence des monosaccharides. La détermination des liaisons glycosidiques a été réalisée par l'analyse des monosaccharides partiellement méthylés et acétylés. Enfin, la configuration des carbones anomériques a été obtenue par RMN.

Cette méthodologie possède l'avantage d'être simple à mettre en oeuvre et d'utiliser peu de produit (100 nmoles d'un oligosaccharide pour une analyse structurale). Elle est susceptible d'être appliquée à l'analyse systématique d'oligosaccharides possédant des acides uroniques.

La dernière partie de notre travail décrit une méthode permettant de déterminer le type de liaison glycosidique des monosaccharides constitutifs par l'analyse GC/MS/MS des produits

de dégradation des oligosaccharides perméthylés obtenus par éthanolyse suivie d'une deutérométhylation.

Cette approche livre des chromatogrammes simples puisque seuls des éthylglycosides perméthylés sont générés. Elle nécessite donc l'utilisation d'un nombre limité de standards chromatographiques. Le degré de substitution est indiqué par la masse moléculaire de l'éthylglycoside perméthylé. Les spectres MS/MS des ions B_1 permettent quant-à eux d'identifier la position des substituants sélectivement deutérés.

Cette étude développée sur les hexoses est susceptible d'être généralisée à d'autres types d'oligosaccharides, plus particulièrement les N-glycannes.

MATERIEL ET METHODES

1. CULTURE DES BACTERIES ET ISOLEMENT DU POLYSACCHARIDE 1644.

1.1. Matériel Biologique.

La souche *Alteromonas sp.* 1644 a été isolée lors de la campagne « Hydronaute » effectuée en décembre 1987 sur le site 13°N de la dorsale Est Pacifique (12°48'56''N, 103°56'72''E). Elle provient de l'épiderme de l'annélide polychète *Alvinella caudata*.

1.2. Production d'exopolysaccharide.

La production d'exopolysaccharide est réalisée au CERMAV de Grenoble. La souche est cultivée sur un milieu marin synthétique contenant 4g/l de peptone, 1g/l d'extraits de levure, 30 g/l de sel de mer (SIGMA), 30 g/l de glucose et 5g/l de tampon MOPS (acide 3-[N-morpholino]propane sulfonique). La production de polysaccharide est effectuée à 25°C en fermenteur de 2 litres contenant 1.2 litres de milieu. Le pH initialement ajusté à 7,0 est maintenu à 6,6 par addition de NaOH 2,5 N. La vitesse d'agitation est de 1100 tours/min et l'aération de 0,5 l/min. L'excès de mousse est évité par l'addition d'huile de silicone.

1.3. Extraction du polysaccharide.

Après centrifugation du milieu de culture (20 000g, 2h), le surnageant est filtré sur membrane *Sartorius* de porosité décroissante (3 - 1,2 - 0,8 - 0,45 µm). Du NaCl est ajouté au filtrat afin d'obtenir une concentration de 20 g/l et le polysaccharide est précipité par 30% d'éthanol. Le précipité est récupéré par centrifugation et lavé avec le mélange éthanol/eau (vol/vol) 70, 75, 80, 90, 95, 100 %. Le séchage s'effectue 48 h sous vide à 30°C.

1.4. Purification du polysaccharide.

1.4.1. Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-Trisacryl.

144 mg de la fraction brute extraite selon le protocole précédent sont dissous dans 150 ml de tampon Tris HCl 50 mM pH 8,6. Etant donnée la viscosité de la solution ainsi obtenue et

afin d'éviter le tassement du gel, la chromatographie sur colonne de DEAE-Trisacryl (3.5 x 36 cm) est effectuée sur 50 ml de solution. L'élution, à un débit de 15 ml/h, se fait par application d'un gradient discontinu et croissant de NaCl (100 mM, 200 mM, 300 mM, 500mM, 1M) dans le tampon Tris HCl. Une aliquote de chaque fraction collectée (5 ml) est analysée par la méthode au phénol sulfurique (Dubois *et al.*, 1956). Les fractions contenant le matériel glucidique sont recueillies et dialysées pendant 4 jours à 4°C contre de l'eau désionisée, l'adialysat est ensuite lyophilisé.

1.4.2. Chromatographie de gel filtration.

L'homogénéité du polysaccharide purifié par chromatographie d'échange d'anions a été vérifiée par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sepharose 4B dans un tampon acétate de Sodium 50 mM, azide de sodium). L'étalonnage de la colonne est réalisé avec différents dextrans de masse moléculaire $5-40 \times 10^6$, 2×10^6 , 5×10^5 , 2×10^5 , 7×10^4 Da et le lactose. La détection se fait par réfractométrie.

2. SPECTROMETRIE DE MASSE.

2.1 Analyse des monosaccharides dérivés par GC/MS.

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sont effectuées sur un appareil de type quadripôle (NERMAG R 10-10S) couplé à un chromatographe en phase gazeuse Delsi DI 700. La chromatographie est réalisée sur une colonne capillaire OV101 (25 m x 0.3 mm DI) avec une programmation de température (120-240 °C à raison de 2°C /min). L'ionisation par impact électronique utilise une énergie d'ionisation de 70 eV et l'ionisation chimique se fait à l'aide de l'ammoniac comme gaz réactant.

2.2. Analyse des oligosaccharides dérivés par GC/MS/MS.

Les spectres GC/MS et GC/MS/MS sont mesurés sur un appareil triple-quadrupôle TSQ-700 (Finnigan MAT) en mode d'ionisation chimique. Le gaz réactant utilisé est le mélange méthane/hémioxydes d'azote 75:25. Les spectres MS/MS sont obtenus avec une énergie de collision variant de 5 à 20eV suivant le cas, en utilisant le xénon comme gaz de collision.

La chromatographie en phase gazeuse est réalisée sur une colonne capillaire Carbowax 20M (0.32 mm D.I. x 25 m) avec un gradient en température de 2°C/min de 120 à 240°C.

2.3. Analyse des oligosaccharides natifs par spectrométrie de masse en mode d'ionisation FAB.

L'analyse en FAB-MS a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse 4 secteurs Kratos Concept II HH à haute résolution (Kratos, Manchester, U.K.), équipé d'un système de données DS90 (DG : DG 30). L'appareil opère avec un potentiel d'accélération de 8 KeV. Le canon à atomes rapides est utilisé avec du Xénon comme gaz de bombardement dans les conditions suivantes : 7 kV- 1mA. La calibration de l'appareil en mode négatif est réalisée à l'aide des amas ioniques $(CsI)_nI^-$. Les échantillons lyophilisés sont dissous dans de l'eau de manière à obtenir une concentration finale de 10 µg/µl. 1 µl est déposé sur la canne d'introduction directe et après séchage sous courant d'air chaud, 2 µl de matrice sont ajoutés. La matrice utilisée est du thioglycérol saturé en triéthylamine puis dilué à 50% par de l'eau ; la phase thioglycérol constitue la matrice.

2.4. Analyse des oligosaccharides dérivés par MALDMS.

Les analyses en MALDMS sont réalisées sur un appareil à temps de vol Vision 2000 (Finnigan MAT). Les échantillons sont déposés sur une cible mobile permettant l'irradiation de zones sélectives. Un faisceau laser à azote de longueur d'onde d'émission 337 nm et de durée de pulse 3ns est utilisé. Les spectres sont mesurés en mode positif avec une énergie d'accélération de 5 keV. Les oligosaccharides à une concentration de 50-100 pmole/ μ l sont dissous dans du méthanol ou un mélange méthanol/eau suivant les dérivés étudiés, puis mélangés avec une solution de matrice (12 mg/ml d'acide 2,5 dihydroxybenzoïque dissous dans un mélange méthanol/eau 80:20).

2.5. Analyse des oligosaccharides dérivés par ESMS/MS.

Les spectres ESMS et ESMS/MS sont mesurés sur un appareil à triple-quadrupôles TSQ 7000 (Finnigan MAT) équipé d'un système HPLC AS3000 Spectrasystem (Thermo Separation Products).

Les échantillons sont chromatographiés sur une colonne de RP-HPLC de type C18 et élués isocratiquement dans le solvant $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:20 (v/v) contenant 1% d'acide acétique. La différence de potentiel appliquée sur le capillaire est de 5 kV et le potentiel d'extraction est de 20 V. La dissociation induite par collision est obtenue en utilisant le xénon comme gaz de collision à une pression de 1 mTorr.

3. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES OLIGOSACCHARIDES.

Les spectres COSY ont été réalisés sur un spectromètre ASX 400 conformément aux programmes de pulses standards fournis par la firme Bruker. La durée de l'impulsion 90° est de 7 μ s pour le COSY simple (90°) et de 7 et 14 μ s pour le COSY 1 relais. Les déplacements chimiques (δ) sont mesurés par rapport à la référence interne en l'occurrence les protons de

l'acétone à $\delta = 2.225$ ppm à 25°C. Les échantillons sont préalablement dissous dans D₂O et lyophilisés deux fois puis finalement repris dans 500 µl de D₂O. Les mesures sont effectuées à 25°C.

4. CARACTERISATION DES MONOSACCHARIDES.

4.1. Identification et dosage des monosaccharides par colorimétrie.

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

Les acides uroniques réagissant avec le réactif à l'orcinol sulfurique, une correction doit être effectuée. La correction est réalisée après le dosage des acides uroniques par la méthode au carbazole-sulfurique, en appliquant l'équation à deux inconnues ci-dessous (Spik, 1995).

Réactifs:

*solution d'orcinol.

Dissoudre 1,5 g d'orcinol dans une solution aqueuse d'acide sulfurique pur à 30% (v/v) et compléter à 100 ml.

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

Dosage:

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

4.1.2. Dosage des acides uroniques.

- Méthode de Dische (1947).

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

Réactifs:

*acide sulfurique concentré

* solution de carbazole (Prolabo): 0,1 g. Ethanol absolu qsp 100 ml.

Dosage:

Dans les tubes de verre, sont introduits 0,1 ml de solution à doser, contenant au maximum 50 à 100 µg d'acide glucuronique et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont refroidis dans un bain d'eau glacée. L'acide sulfurique est ajouté doucement et régulièrement le long des parois du tube. Les tubes sont agités au vortex et maintenus ensuite pendant 20 min très exactement dans un bain-marie bouillant. Les tubes sont ensuite refroidis très rapidement et 0,02 ml de la solution alcoolique de carbazole sont alors ajoutés. Le mélange est soigneusement agité. Une coloration pourpre se développe qui augmente d'intensité à l'obscurité. Après un séjour de 3h à l'obscurité, la mesure de l'absorbance est effectuée à 530 nm.

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

Réactifs:

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

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

Dosage:

A 0,2 ml d'échantillon contenant 0,5 et 20 µg d'acides uroniques, on ajoute 1,2 ml de solution de tétraborate. Les tubes sont agités et réfrigérés dans de la glace. Ils sont ensuite laissés 5 min

au bain-marie bouillant. Après refroidissement dans un bain de glace, on ajoute 20 μ l de la solution de MHDp. Les tubes sont agités. Une coloration rose se développe et au bout de 5 min, la lecture peut se faire à 520 nm.

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

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

Les monosaccharides sont identifiés et dosés sous forme de méthylglycosides N-acétylés et O-triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling et al. (1975) modifiée par Montreuil et al. (1986). Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides à l'aide du méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80°C pendant 24 h. Après refroidissement du méthanolysat, le pH est amené à 6-7 à l'aide de carbonate d'argent. Les sucres aminés éventuellement présents dans le méthanolysat sont N-acétylés par l'anhydride acétique (50 μ l) pendant une nuit à température du laboratoire et à l'obscurité. Après élimination par centrifugation du chlorure d'argent formé et du carbonate d'argent en excès, le surnageant est délipidé par l'heptane.

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

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont identifiés par GC dans les conditions suivantes : appareil de chromatographie modèle Varian muni d'un détecteur à ionisation de flamme, d'une colonne capillaire imprégnée de silicone OV101 (25 m x 0,3 mm DI), température de 120 à 240°C à raison de 2°C/min, pression de gaz vecteur (hélium) 0,4 atm, les températures du détecteur et de l'injecteur sont réglées à 240°C.

4.2.2. Identification et dosage des monosaccharides sous forme de polyols acétates.

Les monosaccharides sont libérés par hydrolyse à l'aide d'acide trifluoroacétique 4 N, 4 h à 100°C en présence de méso-inositol utilisé comme témoin interne. L'acide est éliminé en excicateur sous vide en présence de soude. Le produit hydrolysé est repris par 1 ml d'une solution d'ammoniaque 0,1 M et les monosaccharides sont réduits une nuit par 2 mg de borohydrure de potassium à température ambiante. La réduction est arrêtée par addition de Dowex 50x8 (20-50 mesh, forme H⁺) ou d'acide acétique dans le cas de la présence d'hexosamines dans l'échantillon à doser. Après filtration de la résine Dowex 50x8, la solution est évaporée à l'évaporateur rotatif et l'acide borique est éliminé en présence de méthanol sous forme de méthyl-borates après plusieurs codistillations. La fraction réduite est peracétylée une nuit à température ambiante (pyridine/anhydride acétique, v/v, 300 µl).

Après évaporation des agents d'acétylation, les polyols acétates sont repris par du méthanol et analysés en chromatographie en phase gazeuse dans les mêmes conditions que l'analyse des méthylglycosides triméthylsilylés.

4.3. Détermination de la configuration absolue des monosaccharides.

Les monosaccharides sont libérés sous forme de butylglycosides à l'aide du 2(R)-butanol/HCl 1N à 80°C pendant 24 h. Après évaporation du butanol sous azote, les butylglycosides sont triméthylsilylés et analysés par chromatographie en phase gazeuse selon les conditions décrites précédemment. Dans le cas de polysaccharides insolubles dans le butanol, une libération des monosaccharides est effectuée au préalable par hydrolyse à l'acide trifluoroacétique 4N (4h, 100 °C).

5. CONVERSION DES ACIDES URONIQUES EN HEXOSES.

5.1. Conversion des acides uroniques présents dans un oligosaccharide.

Les acides uroniques présent dans 250 μg d'oligosaccharide sont estérifiés en présence de 0,5 ml de méthanol/HCl 1N, 6h à 20°C. Après élimination du réactif sous azote, le résidu est repris par 0,5 ml de méthanol anhydre et les esters méthyliques d'acide uronique sont réduits à l'aide de 1 mg de borohydrure de potassium, à température ambiante pendant une nuit. La réduction est arrêtée par addition de résine de Dowex 50x8 (20-50 mesh, forme H^+). Après filtration de la résine, les sels de borate sont éliminés par évaporations successives en présence de méthanol.

5.2. Conversion des acides uroniques présents dans le polysaccharide 1644 (Fontaine *et al.*, 1994).

Le polysaccharide est rendu acide par chromatographie d'échange de cations sur résine 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. 0,5 ml de méthanol sont ajoutés et le mélange est placé sous agitation magnétique dans un bain d'eau à 15°C. 200 mg de 1-méthyl-3nitro-1-nitroso-guanidine 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. 5 mg de polysaccharide estérifié sont dissous ou dispersés dans 1 ml de tampon imidazol/HCl 1M à pH 7. 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 KBH_4 pendant 2

heures. L'excès de KBH_4 est détruit par 0,5 ml d'acide acétique. Le polysaccharide est ensuite dialysé et lyophilisé.

6. METHYLATION.

6.1. Méthylation des oligosaccharides.

100 μg d'oligosaccharide lyophilisé sont dissous dans 100 μl de diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO) dans un tube en verre et placés dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes. L'équivalent d'un quart d'une pastille de NaOH pulvérisée est ensuite ajoutée ainsi que 200 μl de CH_3I (Merck) et le tube est remplacé 2 heures sous sonication. Toutes ces opérations s'effectuent sous atmosphère d'argon. La méthylation est arrêtée par addition d'eau et l'iode formé détruit par quelques cristaux de thiosulfate. L'oligosaccharide ainsi perméthylé est extrait par 3 fois 500 μl de chloroforme, puis lavé 10 fois par deux volumes d'eau. Le chloroforme est éliminé en dernier lieu par séchage sous azote.

6.2 Méthylation du polysaccharide 1644 réduit.

Les difficultés que nous avons rencontrées pour solvater le polysaccharide dans le DMSO, durant la méthylation, nous ont incité à effectuer préalablement une peracétylation. Pour réaliser ceci, 10 mg de polysaccharide sont dissous dans 5 ml de formamide (Merck) et peracétylés à l'aide de 4 ml du mélange pyridine-anhydride acétique (v/v) pendant 20 h à température ambiante. Le polysaccharide peracétylé est ensuite dialysé contre de l'eau distillée, puis lyophilisé avant d'être méthylé à l'aide de la méthode de Paz-Parente *et al.*, (1984).

2 mg de polysaccharide peracétylé sont dissous dans 0,5 ml de DMSO dans un tube en verre et placé dans un bain ultrasonique pendant une heure. On ajoute 0,5 ml de base (lithium méthylsulfinyl carbanion) à la solution de polysaccharide que l'on place à nouveau au bain ultrasonique pendant 2 h. Après congélation, 0,5 ml d'iodure de méthyle (Merck) sont

additionnés et l'alkylation se déroule pendant 2 h au bain ultrasonique puis pendant une nuit à température ambiante. Toutes ces opérations s'effectuent sous atmosphère d'argon.

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

6.3 Analyse des produits de méthylation.

Le polysaccharide ou l'oligosaccharide (100 µg) perméthylé est méthanolysé pendant 24 h à 80°C à l'aide de 0,5 ml de méthanol/HCl 0,5N. Après évaporation sous courant d'azote, les méthylglycosides partiellement méthylés sont acétylés par le mélange pyridine-anhydride acétique (v/v) pendant une nuit à température ambiante. L'identification des éthers méthyliques est effectuée par couplage GC/MS.

Le polysaccharide ou l'oligosaccharide perméthylé peut aussi être repris par 50 µl d'acétone puis hydrolysé pendant 4 h à 100°C à l'aide de 0,5 ml d'acide trifluoroacétique 4N. Les dérivés méthylés libérés sont réduits pendant une nuit en présence de KBD₄. La réduction est arrêtée par addition de Dowex 50 X 8 et l'élimination des borates se fait par évaporation en présence de méthanol. Les produits sont enfin peracétylés comme précédemment et analysés par GC/MS sous la forme d'alditols acétates partiellement méthylés (PMAA).

7. CARACTERISATION DU MONOSACCHARIDE DE STRUCTURE INCONNUE.

7.1. Isolement du monosaccharide de structure inconnue.

Le polysaccharide est hydrolysé par l'acide trifluoroacétique 4N pendant 4h à 100°C. L'hydrolysate est soumis à une chromatographie préparative de 18 h sur papier Whatman N°3 avec le solvant suivant : acétate d'éthyle / pyridine / acide acétique / eau (5:5:1:3 / v:v:v:v).

Les sucres sont détectés avec l'oxalate d'aniline (Patridge, 1969). La fraction principale est purifiée par chromatographie d'échange d'anion à haut pH (Dionex). Le système utilise une colonne Carbowac PA1 semi-préparative (9 mm x 25 mm) avec un débit de 2 ml/min et avec les solvants suivant A: NaOH 100mM et B: NaOH 100 mM/acétate de sodium 1M. L'élution est réalisée par gradient discontinu selon les conditions suivantes: 0-10 min: 0-30% B; 10-30 min: 30-50% B; 30-40 min: 50-100% B. L'élimination du Na⁺ se fait par passage sur une colonne de Dowex 50 x 8 (20-50 mesh, forme H⁺) et l'acide acétique est neutralisé par une solution d'ammoniaque ; l'acétate d'ammonium volatil est facilement éliminé par lyophilisation. Une étape finale de purification est réalisée par chromatographie d'exclusion sur Biogel P2.

7.2. Désalkylation du disaccharide contenant le monosaccharide de structure inconnue (Talmont and Fournet, 1991).

Le disaccharide est d'abord peracétylé afin d'augmenter sa solubilité dans le milieu réactionnel. 1 mg de disaccharide est dissout dans 0,5 ml de pyridine et 0,5 ml d'anhydride acétique durant 24 h à température ambiante. Après élimination du solvant par séchage sous azote, les produits peracétylés sont solubilisés dans 0,5 ml de dichlorométhane et 50 µl de BBr₃ sont additionnés. Après 2 minutes d'agitation à température ambiante, le mélange est évaporé sous azote. Les produits sont désacétylés par traitement au méthoxyde de sodium dans le méthanol (15 min). Après acidification par de la résine Dowex 50 x 8, (20-50 mesh, forme H⁺) de l'eau est ajoutée et la résine est éliminée par filtration. L'évaporation du filtrat donne les sucres libres.

7.3. Synthèse du 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-glucose et du 3-O-[(S)-1-carboxyéthyl]-D-glucose (Kochetkov *et al.*, 1979).

250 mg de 1,2:5,6-Di-O-isopropylidene- α -D-glucose sont dissous dans 17 ml de 1,4-dioxane et 145 mg de NaH (dans l'huile) sont ajoutés. Le mélange sous agitation est chauffé à 95 °C pendant 1h. Après refroidissement à 65 °C, 350 mg d'acide 2-chloropropionique (R ou S) sont ajoutés et le mélange est agité pendant 1 h. Dans un deuxième temps 570 mg de NaH et 7,5 ml de 1,4-dioxane sont à nouveau ajoutés et le mélange est laissé 14 h à 65 °C sous agitation. Après refroidissement, 25 ml d'eau sont ajoutés afin de détruire le NaH. Le dioxane est évaporé et la phase aqueuse restante est lavée avec du chloroforme afin d'éliminer l'excès de 1,2:5,6-Di-O-isopropylidene- α -D-glucose et l'huile apportée par NaH. La phase aqueuse est alors acidifiée à l'aide d'HCl 2,5N et le produit de synthèse est extrait par du chloroforme. Après évaporation du chloroforme, les fonctions hydroxyyles sont libérées par action de l'acide trifluoroacétique 1N (4h à 100 °C).

8. ETUDE DES OLIGOSACCHARIDES ISSUS DU POLYSACCHARIDE 1644.

8.1. Isolement des oligosaccharides.

Le polysaccharide 1644 est soumis à une hydrolyse partielle (acide trifluoroacétique 2N, 1h30, 100 °C). L'hydrolysate est évaporé en présence de méthanol afin d'éliminer l'acide trifluoroacétique. Une chromatographie de gel filtration sur G10 permet l'élimination des sels résiduels et la séparation des oligosaccharides et des monosaccharides. Le mélange d'oligosaccharides est séparé par chromatographie d'échange d'anions à haut pH (Dionex). Le système utilise une colonne Carbowac PA1 semi-préparative (9 mm x 25 mm) avec un débit de 2 ml/min et avec les solvants suivant A: NaOH 100mM et B: NaOH 100 mM/acétate de sodium 1M. L'élution est réalisée par gradient discontinu selon les conditions suivantes : 0-10 min: 0-35 % B; 10-30 min: 35-50 % B; 30-50 min: 50-100 % B; 50-55 min: 100-100 % B; 55-60 min: 100-0 % B. L'élimination du Na⁺ se fait par passage sur une colonne de Dowex 50

x 8 (20-50 mesh, forme H^+) et l'acide acétique est neutralisé par une solution d'ammoniaque afin d'obtenir un acétate d'ammonium volatil facilement éliminé par lyophilisation. Une étape finale de purification est réalisée par chromatographie d'exclusion sur Biogel P2.

8.2. Amination réductive des oligosaccharides et conversion des acides uroniques en hexoses deutérés.

Amination réductive.

Dans un premier temps deux solutions A et B sont préparées.

- Solution A: aniline (20 μ l)/méthanol (350 μ l)/acide acétique glacial (40 μ l)
- Solution B: aniline (40 μ l)/complexe borane-diméthylamine (30 mg)/ H_2O (1 ml)/
acide acétique glacial 120 μ l

250 μ g d'oligosaccharide sont dissouts dans un tube vial à capuchon de téflon, en présence de 25 μ l d'eau et de 50 μ l de solution A. Le mélange est agité et chauffé 15 min à 90 °C. 200 μ l de solution B sont ensuite ajoutés et le tube est à nouveau chauffé 1 h à 90 °C. Après refroidissement, le mélange réactionnel est évaporé à sec, puis repris dans 25 μ l de méthanol pour être chromatographié sur papier Whatman n°3 dans le solvant n-butanol/éthanol/eau (4/1/1) afin d'éliminer l'excès de réactif. L'oligosaccharide couplé à l'aniline ne migre pas dans le système solvant utilisé. La bande départ est récupérée et les oligosaccharides sont élués par de l'eau et l'éluat est lyophilisé.

Conversion des acides uroniques en hexoses deutérés.

L'oligosaccharide préparé précédemment est estérifié dans le méthanol/HCl 1N (500 μ l) pendant 6 heures à température ambiante. Le méthanol/HCl est ensuite évaporé et l'oligosaccharide est redissout dans le méthanol anhydre (500 μ l) en présence de borodéutère de sodium. Après une nuit, la réduction est stoppée par addition d'acide acétique dans le méthanol. Lorsque tout le $NaBD_4$ est détruit, le mélange est évaporé à sec puis repris par 1 ml

de solution H₂O + ATFA 0,05 % pour la chromatographie liquide à haute performance. Les oligosaccharides couplés et réduits sont purifiés par HPLC sur colonne C18 (Vydac) (250 x 4 mm, 300 Å, 5µm) à l'aide des tampons A: H₂O + ATFA 0,05 % et B: CH₃CN + ATFA 0,05 %. Le gradient utilisé est le suivant 0-10 min: 0 % B; 10-40: 30 % B, le débit est de 0,7 ml/min et la détection se fait à 254 nm.

9. PREPARATION DES ETHYLGLYCOSIDES PERMETHYLES, SELECTIVEMENT DEUTEROMETHYLES.

100 µg d'oligosaccharide lyophilisé sont dissous dans 100 µl de diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO) dans un tube en verre et placés dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes. L'équivalent d'un quart d'une pastille de NaOH pulvérisée est ensuite ajouté ainsi que 200 µl de CH₃I (Merck), puis le tube est remplacé 2 heures à sonication. Toutes ces opérations s'effectuent sous atmosphère d'argon. La méthylation est arrêtée par addition d'eau et l'iode formé est détruit par quelques cristaux de thiosulfate. L'oligosaccharide perméthylé est extrait par 3 x 500 µl de chloroforme puis lavé 10 fois par deux volumes d'eau. Le chloroforme est ensuite évaporé sous azote et les traces d'eau sont éliminées par séchage sous vide en présence de P₂O₅.

L'oligosaccharide perméthylé est éthanolysé par 500 µl d'éthanol/HCl 0,5N, (24 h à 80 °C). Le solvant est ensuite évaporé sous azote et les éthyglycosides partiellement méthylés sont soumis à une deutérométhylation suivant le protocole utilisé pour la méthylation en remplaçant les 200 µl de CH₃I par 50µl de CD₃I. Les produits ainsi obtenus sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

BIBLIOGRAPHIE

Angel A.S., Lindh F. and Nilson B., 1987.

Determination of binding position in oligosaccharides and glycosphingolipids by fast atom bombardment mass spectrometry.
Carbohydr. Res., **168**, 15-31.

Aspinall G.O. and Chaudhari A.S., 1975.

Base-catalysed degradation of carbohydrates. X. Degradation by β -elimination of methylated leiocarpan A.
Can. J. Chem., **53**, 2189-2193.

Aspinall G.O., 1982.

Chemical characterization and structure determination of polysaccharides.
In *the Polysaccharide*, Eds. Aspinall G.O., Academic press, **1**, 36-132.

Aspinall G.O., Khondo L. and Puvanesarajah V., 1989.

Selective fragmentation of methylated tobacco extracellular arabinoglucurmannan by cleavage of β -D-glucopyranosiduronic acid units.
Carbohydr. Res., **188**, 113-120.

Aspinall G.O., Puvanesarajah V., Reuter G. and Shauer R., 1984.

Selective cleavage of β -D-glucopyranosiduronic acid linkages in methylated polysaccharide acids from *Drosera* species.
Carbohydr. Res., **131**, 53-60.

Auzende J-M., Urabe T., Deplus C., Eissen J.P., Grimaud D., Huchon P., Ishibashi J., Joshima M., Lagabrielle Y., Mevel C., Naka J., Ruellan E., Tanaka T. and Tanahashi M., 1989.

Le cadre géologique d'un site hydrothermal actif : la campagne STARMER I du submersible Nautille dans le Bassin Nord-Fidjien.
C. R. Acad. Sci., **302**, 1787-1795.

Balazs E., Laurent T.C., Howe A.F. and Varga L., 1959.

Irradiation of mucopolysaccharides with ultraviolet light and electron.
Radiation Res., **11**, 149-242.

Barlett D. H. and Siverman M., 1989.

Nucleotide sequence of IS49.2, a novel insertion sequence causing variation in extracellular polysaccharide production in the marine bacterium *Pseudomonas atlantica*.
J. Bacteriol. **171** 1763.

Barlett D. H., Wright M.E. and Siverman M., 1988.

Variable expression of extracellular polysaccharide in the marine bacterium *Pseudomonas atlantica* is controlled by genome rearrangement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 3923.

Björndal H., Helleqvist C.G., Lindberg B. and Svensson S., 1970.

Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides.
Angew. Chem. Internat. Edit., **9**, 610-618.

Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G., 1973.

New method for quantitative determination of uronic acids.
Analytical Biochemistry, **54**, 484-489.

Bozzi L., 1991.

Etude de nouveaux polysaccharides bactériens fournis par l'IFREMER.
DEA Université Joseph Fourier de GRENOBLE.

Bozzi L., 1994.

Production et étude physico-chimique de nouveaux polysaccharides synthétisés par des bactéries marines.
Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble I

Bozzi L., Milas M. and Rinaudo M., 1996.

Characterization and solution properties of a new exopolysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas sp.* strain 1644.
International Journal of Biological Macromolecules, **18**, 9-17.

Bozzi L., Milas M. and Rinaudo M., 1996.

Solution and gel rheology of a new of a new exopolysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas sp.* strain 1644.
International Journal of Biological Macromolecules, **18**, 83-91.

Burgstahler A.W., Worden L.R. and Lewis T.B., 1963.

Direct reduction of carboxylic acids to aldehydes by lithium in ethylamine.
J. Org. Chem., **28**, 2918-2919.

Childress J.J. and Fisher C.R., 1992.

The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses.
Oceanogr. Mar. Biol. Rev., **30**, 337-441.

Ciucanu I. and Kerek F., 1984.

A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates.
Carbohydr. Res. **131**, 209-217.

Colegrove G.T., 1983.

Agricultural applications of microbial polysaccharides.
Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., **22**, 456-460.

Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmon J.M., Von Herzen R.D., Green K., Williams D., Baimbridg A., Crane K. and Van Andel T.H., 1979.

Submarine thermal springs on the Galapagos rift.
Science, **203**, 1073-1083.

Corpe W.A., 1970.

An acid polysaccharide produced by a primary film-forming marine bacterium.
Dev. Indust. Microbiol., **11**, 402-412.

Cottrell I.W., 1980.

Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides.

In : *Fungal polysaccharides*, Eds. Sandford P.A. and Matsuda K., *Amer. Chem. Soc.*, **126**, 251-270.

Curvall M., Lindberg B. and Lönnngren J., 1975.

Modification of polysaccharides containing uronic acid residues.

Carbohydr. Res., **41**, 235-239.

De Hoffmann E., Charette J. et Stroobant V., 1994.

Spectrométrie de masse. Ed. Masson, Paris.

Dell A., 1987.

F.A.B. mass spectrometry of carbohydrates.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., **45**, 20-71.

Dell A., 1990.

Preparation and desorption mass spectrometry of permethyl and peracetyl derivatives of oligosaccharides.

Methods in Enzymology, **193**, 647-660.

Dell A., Reason A.J., Khoo K-H., Panico M., McDowell R.A. and Morris H., 1994.

Mass spectrometry of carbohydrate-containing biopolymers.

Methods in Enzymology, **230**, 108-131.

Desbruyères D. and Laubier L., 1986.

Les Alvinellidae, une famille nouvelle d'annélides polychètes inféodées aux sources hydrothermales sous-marines : systématique, biologie et écologie.

Can. J. Zool., **64**, 2227-2245.

Desbruyères D., 1984.

Relations trophiques dans l'écosystème hydrothermal à l'axe des dorsales océaniques du Pacifique oriental.

Océanis, **10**, 663-673.

Desbruyères D., Crassous P., Grassle J., Khripounoff A., Reyss D., Rio M. and Van Praet M., 1982.

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

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

Dische Z., 1947.

A new specific color reaction of hexuronic acids.

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

Domon B. and Hostettmann K., 1984.

New saponins from *Phytolacca dodecandra* l'hérit.

Helv. Chim. Acta, **67**, 1310-1315.

Domon B. et Costello C., 1988.

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

Glycoconjugate J. **5**, 397-409.

Domon B., 1994.

L'analyse de glycannes libres et conjugués par spectrométrie de masse.

Cahier IMABIO: Spectrométrie de masse des macromolécules biologiques.II. CNRS, **2**, 67-71.

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., 1956.

Colorimetric method for determination of sugars and related substances.

Anal. Biochem., **28**, 350-356.

Dutton G.G.S., Parolis H. and Parolis L.A.S., 1986a.

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

Carbohydr. Res., **152**, 249-259.

Dutton G.G.S., Parolis H., Joseleau J.P. and Marais M-F., 1986b.

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

Carbohydr. Res., **149**, 411-423.

Edmon J.M. et Von Damm K.I., 1983.

Les sources chaudes des fonds océaniques.

Pour la Science, **68**, 34-49.

Edmond J.M., Von Damm K.L., Mc Duff R.E. and Measures C.I., 1982.

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

Nature, **297**, 187-191. Eds. Marshall K.C., 51-70.

Fazio S.A., Uhlingen D.J., Parker J.H. and White D.C., 1982.

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

Appl. Environ; Microbiol., **43**, 1151-1159.

Filisetti-Cozzi T.M.C.C. and Carpita N.C., 1991.

Measurement of uronic acids without interference from neutral sugar.

Analytical Biochemistry, **197**, 157-162.

Fontaine T., Wieruszkeski J.M., Talmon F., Saniez M.H., Duflot P., Leleu J.B. and Fournet B., 1991.

Exopolysaccharide structure from *Bacillus circulans*. E

Eur. J. Biochem., **196**, 107-113.

Fontaine T., 1991.

Contribution à l'étude structurale de polysaccharides. Etude de l'exopolysaccharide produit par *Bacillus Circulans*. Application au séquençage des polysaccharides acides.

Thèse de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Fontaine T., Fournet B. and Karamanos Y., 1994.

A new procedure for the reduction of uronic acid containing polysaccharides.
Journal of Microbiological Methods, **20**, 149-157.

Fournet B., Strecker G., Leroy Y. and Montreuil J., 1981.

Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans.
Analytical Biochemistry, **116**, 489-502.

Fustec A., Desbruyères D. and Laubier L., 1988.

Estimation de la biomasse des peuplements associés aux sources hydrothermales profondes de la dorsale du Pacifique oriental à 13°N.
Oceanol. Acta., **8**, 15-21.

Gacesa P., Squire A. and Winterburn P.J., 1983.

The determination of uronic acid composition of alginate by anion-exchange liquid chromatography.
Carbohydr. Res., **118**, 1-8.

Garozzo D., Giuffrida M., Impallomeni G., Ballistreri A. and Montaudo G., 1990.

Determination of linkage position and identification of the reducing end in linear oligosaccharide by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry.
Anal. Chem., **62**, 279-286.

Garozzo D., Impallomeni G. and Spina E., 1991.

Linkage analysis in disaccharides by electrospray mass spectrometry.
Carbohydr. Res., **221**, 253-257.

Geyer R. and Geyer H., 1994.

Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques.
Methods in Enzymol., **230**, 87-108.

Gillece-Castro B.L. and Burlingame A.L., 1990.

Oligosaccharide characterization with high-energy collision-induced dissociation mass spectrometry.
Methods in Enzymology, **193**, 688-712.

Gloagen V., Vebret L., Hoffman L, Morvan H., Plancke Y., Wieruszeski J.M. and Strecker G., 1996.

Identification by NMR spectroscopy of oligosaccharides obtained by acidolysis and lithium degradation of the capsular polysaccharide of a thermal biomass (*Mastigogladus Laminosus*). XVIII International Carbohydrate Symposium Milan July 21-26.

Goldstein I.J., Hay G.W., Lewis B.A. and Smith F., 1965.

Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxydation, reduction, and hydrolysis.
Methods Carbohydr. Chem., **5**, 361-370.

Gunnarsson A., 1987.

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

Glycoconjugate J. **4**, 239-245.

Hakomori S-I., 1964.

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

J. Biochem., **55**, 205-208.

Harvey D.J., 1993.

Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides.

Rapid Commun. Mass Spectrom., **7**, 614-619.

Hellerqvist C.G., 1990.

Linkage analysis using Lindberg method.

Methods in Enzymology, **193**, 554-573.

Hessler R.R. and Smithey W.M.jr., 1983.

The distribution and community structure of megafauna at the Galapagos Rift hydrothermal vents.

In *Hydrothermal processes at seafloor spreading centers*, Ed. Rona P.A., Bostrom K., Laubier L., Smith K.L.jr., Plenum Press New York 735-770.

Hessler R.R., Lonsdale P. and Hawkins J., 1988.

Patterns on the ocean floor.

New Sci., **1605**, 47-48.

Huddleston M.J., Bean M.F. and Carr S.A., 1993.

Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests.

Anal. Chem., **65**, 877-887.

Jansson P., Lindberg B., Lönngren J., Ortega C., 1984.

Structural studies of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* Type 66.

Carbohydr. Res. **132**, 297-305.

Jarman T.R., Deavin L., Slocombe S. and Righelato R.C., 1978.

Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*.

J. Gen. Microbiol., **107**, 59-64.

Jones G.W., 1977.

The attachment of bacteria to the surface of animals cells.

In : *Microbial interaction. Receptor and recognition*. Eds. Reissing J.L., Chapman and Hall, London, **3**, 139-176.

Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegenthart J.F.G., Clamp J.R., 1975.

Characterization by gas liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids.
Biochem. J., **151**, 491-495.

Karas M., Bahr U and Gießmann U., 1991.

Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry.
Mass Spectrometry Reviews, **10**, 335-358.

Kebarle, P. and Tang, L., 1993.

From ions in solution to ions in the gas phase.
Anal. Chem., **65**, 972A-986A.

Kenne L. and Lindberg B., 1983.

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

Kenne L., Lindberg B., Lindqvist B., Lönnngren J., 1976.

4-O-[(S)-1-carboxyethyl]-D-Glc: a component of the extracellular polysaccharide material from *Aerococcus viridans var. homari*.
Carbohydr. Res. **51**, 287-290.

Kitagawa I., Ikenishi Y., Yoshikawa and Shi Im K., 1977.

Saponin and sapogenol. XX. Selective cleavage of the glucuronide linkage in saponin by acetic anhydride and pyridine treatment.
Chem. Pharm. Bull., **25**, 1408-1416.

Kitagawa I., Wang H.K., Saito M. and Yoshikawa M., 1983.

Saponine and sapogenol. XXXII. Chemical constituents of seeds of *Vigna angularis* (WILD) OHWI and OHASHI. Azukisaponins I, II, III and IV.
Chem. Pharm. Bull., **31**, 674-682.

Kitagawa I., Yoshikawa M. and Kadota A., 1978.

Saponin and sapogenol. XXIII. Degradation of methyl glucuronide and methyl galacturonide by lead tetraacetate oxidation followed by alkali treatment.
Chem. Pharm. Bull., **26**, 484-496.

Kitagawa I., Yoshikawa M. and Yosioka I., 1973.

Photolysis of uronide linkage in saponin.
Tetrahedron Lett., **41**, 3997-3998.

Kjelleberg S., 1984.

Adhesion to inanimate surfaces.
In *Microbial adhesion and aggregation*.
Eds. Marshall K.C., 51-70.

Klitgord L. and Mudie J.D., 1974.

The Galapagos spreading center : a near bottom geophysical survey.
Geophys. J. R. Astron. Soc., **38**, 563-586.

Kochetkov N. K., Sviridov A. F., Arifkhodzhaev K. A., Chizhov O. S., and Shashkov A. S., 1979.

The structure of the extracellular polysaccharide from *Mycobacterium lacticolum* Strain 121.
Carbohydr. Res. **71**, 193-203.

Kochetkov N.K., Chizhov O.S. and Sviridov A.F., 1967a.

An approach to the selective degradation of polysaccharide chains.
Carbohydr. Res., **4**, 362-363.

Kochetkov N.K., Chizhov O.S. and Sviridov A.F., 1967b.

Selective methods for the cleavage of polysaccharide chains (cleavage of the amide of L-menthyl- α -glucuronic acid).
Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk, **3**, 2218-2221.

Kochetkov N.K., Chizhov O.S. and Sviridov A.F., 1970.

Selective cleavage of glycuronosidic linkages.
Carbohydr. Res., **14**, 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.F., 1973.

Polysaccharides of *Lipomyces*. (structure of extracellular glucurono-mannan of *Lipomyces lipofer* strain 133).
Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk, **10**, 2304-2311.

Lau J.M., Mc Neil M., Darvill A.G. and Albersheim P., 1987a.

Selective degradation of the glycosyluronic acid residues of complex carbohydrates by lithium dissolved in ethylenediamine.
Carbohydr. Res., **168**, 219-243.

Lau J.M., Mc Neil M., Darvill A.G. and Albersheim P., 1987b.

Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine.
Carbohydr. Res., **168**, 245-274.

Laubier L., 1989.

Ecosystèmes benthiques profonds et chimiosynthèse bactérienne : sources hydrothermales et suintements froids.
Océanologie, actualité et prospectives, Denis M. (Ed).
Centre d'océanologie de Marseille, 61-91.

Lawson C.L., Mc Cleary C.W., Nakada H.I., Rees D.A., Sutherland I.W. and Wilkinson J.F., 1969.

Structural analysis of colanic acid from *Escherichia coli* by using methylation and base-catalysed fragmentation.
Biochem. J., **115**, 947-958.

Lin F.C., Malcolm Brown R. Jr., Cooper J.B. and Delmer D.P., 1985.

Synthesis of fibrils in vitro by solubilized cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*.
Science, **230**, 822-825.

Lindberg A.A., 1973.

Bacteriophage receptors.
Annu. Rec. Microbio., **27**, 205-236.

Lindberg B. and Lönngren J., 1976.

Specific degradation of polysaccharides containing uronic acid residues.
Methods Carbohydr. Chem., **VII**, 142-148.

Lindberg B., 1972.

Methylation analysis of polysaccharides.
Methods in Enzymology, **28**, 178-195.

Lindberg B., Lindh F. and Lönngren J., 1978.

Modification of polysaccharides containing uronic acid residues.
Carbohydr. Res., **61**, 81-87.

Lindberg B., Lindqvist B. and Lönngren J., 1976.

4-O-[(S)-1-carboxyethyl]-D-GlcUA: a component of the *Klebsiella* Type 37 capsular polysaccharide.
Carbohydr. Res., **49**, 411-417.

Lindberg B., Lönngren J. and Svensson S., 1975.

Specific degradation of polysaccharides.
Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry **31**, 185-240.

Lindberg B., Lönngren J. and Thompson J.L., 1973.

Degradation of polysaccharides containing uronic acid residues.
Carbohydr. Res., **28**, 351-357.

Lonsdale P., 1977.

Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading center.
Deep Sea Res., **24**, 857-863.

Maroudas, 1975.

Adhesion and spreading of cells on charged surfaces.
J. Theor. Biol., **49**, 417-424.

Marshall K.C. and Cruickshank R.H., 1973.

Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interface.
Arch. Microbiol., **91**, 29-40.

Martens D.A. and Frankenberger W.T. 1990.

Determination of glycuronic acids by high-performance anion chromatography with pulsed amperometric detection.
Chromatographia, **30**, 651-656.

Matsushima Y. and Park J. T., 1962.

Stereospecific synthesis of 2-amino-3-O-(D-1'-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose (Muramic Acid) and related Compounds.

J. Org. Chem., **27**, 3581-3583.

Maury A. et Roque J., 1986.

Les polysaccharides

Biofutur, Septembre, 17-31.

Mc Cleary C. W., Rees D.A., Samuel J.W. and Steele L.W., 1967.

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

Carbohydr. Res., **5**, 492-495.

Metzger J.W., Jung M., Schmalzing D., Bayer E. and Schurig V., 1991.

Analysis of cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) and derivatives thereof by ion-spray mass spectrometry.

Carbohydr. Res., **222**, 23-35.

Mian A.J. and Percival E., 1973.

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

Carbohydr. Res., **26**, 147-161.

Mogilevskii M. and Laufer A.L., 1951.

Action of ultraviolet on hyaluronic acid.

Chem. Abstracts, **45**, 4278.

Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G. and Strecker G., 1986. In

Carbohydrate analysis, a practical approach Eds., Chaplin, M.F. and Kennedy J.F., IRL Press, Oxford, 143-204.

Mort A.J. and Bauer W.D., 1982.

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

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

Osman S.F. and Fett W.F., 1993.

Structure of the acidic exopolysaccharide of *Pseudomonas marginalis* Strain ATCC 10844.

Carbohydr. Res. **242**, 271-275.

Parolis H., Parolis L.A.S. and Venter R.D., 1989.

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

Carbohydr. Res., **185**, 225-232.

Patridge S.M., 1969.

Nature, **164**, 443.

Paz Parente J., Cardon P., Leroy Y., Montreuil J., Fournet B., and Ricard G., 1985.
A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion.
Carbohydr. Res., **141**, 41-47.

Philipps G.O., 1963.
Photochemistry of carbohydrates.
Adv. Carbohydr. Chem., **18**, 9-43.

Philipps L.R. and Frazer B.A., 1981.
Methylation of carbohydrates with dimethyl potassium in dimethyl sulfoxide.
Carbohydr. Res., **90**, 149-152.

Phillips K.R. and Lawford H.G., 1983.
Curdlan: its properties and production in batch and continuous fermentation.
Prog. Ind. Microbiol., **18**, 201-229.

Poulter L. and Burlingame A.L., 1990.
Desorption mass spectrometry of oligosaccharides coupled with hydrophobic chromophores.
Methods in Enzymology, **193**, 661-689.

Prieur D., 1988.
Etude préliminaire de communautés bactériennes hétérotrophes associées à des invertébrés des sources hydrothermales profondes.
Oceanol. Acta., **8**, 139-145.

Prieur D., Jeanthon C. and Jacq E., 1987.
Les communautés bactériennes des sources hydrothermales profondes du Pacifique oriental.
Vie Milieu, **37**, 149-164.

Prieur D., 1992.
Physiology and biotechnological potential of deep-sea bacteria.
In : *Molecular Biology and Biotechnology of extremophiles*, Herbert R.A. and Sharp, Eds. Blackie, Glasgow and London. 163-197.

Prieur D., Chanroux S., Durand P., Erauso G., Fera Ph., Jeanthon C., Le Borgne L., Mevel G. and Vincent P., 1990.
Metabolic diversity in epibiotic microflora associated with the pompeii worms *Alvinella pompejana* and *A. caudata* (Polychaetae : Annelida) from deep-sea hydrothermal vents.
Marine Biology, **106**, 361-367.

Quintero E., Ishida K., Gordon G. and Geesey G., 1989.
Comparaison of reduction methods for gas chromatography-mass spectrometry. Identification and quantification of uronic acids in acidic polysaccharides.
J. Microbiol. Methods, **9**, 309-322.

Rau G.H., 1981.
Hydrothermal vent clam and tube worm $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: further evidence of non photosynthetic food sources.
Science, **213**, 338-339.

Reinhold B.B., Hauers C.R., Plummers T.H. and Reinhold V.N., 1995.

Detailed structural analysis of a novel, specific O-linked glycan from the prokaryote *Flavobacterium meningosepticum*.
J. Biol. Chem., **270**, 13197-13203.

Rimington C., 1931.

The carbohydrate complex of serum proteins. II : Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of blood.
Biochem. J., **25**, 1062-1071.

Rona P.A., Klinkhammer G., Nelsen T.A., Trefry J.H. and Elderfield H., 1986.

Black smokers, massive sulfides and vent biota at the Mid-Atlantic Ridge.
Nature, **321**, 33-37.

Saady J.J. and Blanke R.V., 1990.

Measurement of glucuronic acid metabolite by high resolution gas chromatography.
J. Chromatogr. Sci., **28**, 282-287.

Saeman J.F., Moore W.E, Mitchell R.L. and Millet M.A., 1954.

Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography.
Tappi, **37**, 336-343.

Smith H.A., Huff B.J.L., Powers W.J. and Caine D., 1967.

The reduction-methylation of cyclohexenone derivatives.
J. Org. Chem., **32**, 2851-2856.

Somme R., 1986.

Degradation of glucuronic acid containing exopolysaccharide from *Rhizobium* by Hakomori methylation procedure.
Carbohydr. Res. **152**, 237-241.

Spik G., 1995

Colorimetric micro methods.

In *Methods on glycoconjugates, a laboratory manual*. Eds., Verbert A., Harwood academic publishers, 27-30.

Strecker G., 1993.

Analyse structurale des chaînes glycaniques.
Biofutur, **125**, 46-53.

Strecker G., 1995.

Chemical cleavage of O- and N-glycosidic linkages.

In *Methods on glycoconjugates, a laboratory manual*. Eds Verbert A., Harwood academic publishers, 47-50.

Sutherland I.W., 1972.

Bacterial exopolysaccharides.

Adv. Microb. Physiol., **8**, 143-214.

Sutherland I.W., 1983.

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

Crit. Rev. Microbiol., **10**, 173-202.

Sutherland I.W., 1986.

Industrially useful microbial polysaccharides.
Microbiological Sciences, **3**, 5-9.

Sutherland I.W., 1988.

Bacterial surface polysaccharide : structure and function.
In: *International review of cytology*, Academic Press INC, **113**, 187-231.

Talmon F. and Fournet B., 1991.

Isolation and characterization of methylated sugars from the tube of the the hydrothermal vent tubicolous annelid worm *Alvinella pompejana*.
FEBS., **281**, 55-58.

Taylor R.L. and Conrad H.E. 1972.

Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-actived carboxyl groups.
Biochemistry, **11**, 1383-1388.

Tillmans J. and Philippi K., 1929.

Über den Gehalt der Wichtigsten Protein der Nahrungsmittel an Kohlehydrat and über ein kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Beshimmung von stckstoffreiem zucker in elweiss.
Biochem. Z., **215**, 36-60.

Tsien H.C. and Schmidt E.L., 1981.

Localization and partial characterization of soybean lectin binding polysaccharidees of *Rhizobium Japonicum*.
J. Bacteriol., **145**, 1063-1074.

Tunnicliffe V., Chastain R.A. and Yayanos A.A., 1985.

The hydrothermal vent community on axial seamount, Juan de Fuca Ridge.
Biol. Soc. Wash. Bull., **6**, 453-464.

Uhlinger D.J. and White D.C., 1983.

Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalix in *Pseudomonas atlantica*.
Appl. Environ. Microbiol., **45**, 64-70.

van Halbeek H., 1994.

¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbohydrate chains of glycoproteins.
Methods in Enzymology, **230**, 132-168.

Vanlaeke G., Cuppens H., Leysens L. and Raus J., 1989.

Identification of polysaccharides in pharmaceuticals by capillary gas chromatography.
J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **7**, 1641-1649.

Vincent P., 1993.

Etude d'Eubactéries productrices d'exopolysaccharides originaires d'un site hydrothermal profond (13°N).
Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale.

Viseux N., 1996.

Développement d'une stratégie intégrée pour l'analyse structurale des glycannes.
Thèse de l'Université des Sciences et technologies de Lille.

Vliegthart J.F.G., Dorland L. and Van Halbeek H., 1983.

High-resolution, H1-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related glycoproteins.
Adv. in Carbohydr. Chem. and Biochem., **41**, 209-374.

Wait, R., 1991.

Structural analysis of carbohydrate by mass spectrometry.
Advance in Carbohydrate Analysis, **1**, 335-400.

Whitfield C. and Valvano M.A., 1993.

Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria.
Adv. Microb. Physiol., **35**, 135-246.

Whitfield D.M., Stojkovski S., Pang H., Baptista J. and Sarkar B. 1991.

Diagnostic methods for the determination of iduronic acid in oligosaccharides.
Analytical Biochemistry, **194**, 259-267.

Williams D.L., Von Herzen R.P., Sclater J.G. and Andreson R.N., 1974.

The Galapagos spreading center : Lithospheric cooling and hydrothermal circulation.
Geophys. J. R. Astron. Soc., **38**, 587-608.

Wirsen C.O., Tuttle J.H. and Jannash H.W., 1986.

Activities of sulfur-oxidizing bacteria at the 21°N East Pacific Rise Vent site.
Mar. Bio., **91**, 449-456.

York W.S., Darvill A.G., Mc Neil M., Stevenson T.T. and Albersheim P., 1985.

Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall component.
Methods in Enzymol., **118**, 3-40.

