
**Etude d'oligosaccharides bioactifs issus
d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation
et relation structure/fonction**

THESE

pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline: **Chimie**
Spécialité: **Biomatériaux**

Présentée et soutenue à huis clos par

Olivier ROGER

Le 29 novembre 2002

Jury:

Rapporteurs: M. BERTHOU C., Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest.
Mme. MULLOY. B., *Directeur de recherche, NIBSC, Hertfordshire, U.K.*

Examineurs: Mme. JOZEFONVICZ J., *Directeur de recherche, CNRS, Villetaneuse.*
M. MULLER D., Professeur, Université Paris 13, Villetaneuse.
Mme COLLIEC-JOUAULT S., Cadre de recherche, IFREMER, Nantes.
M. CHEVOLOT L., Chargé de recherche, CNRS, Nantes.

RESUME

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polysaccharides sécrétés par certaines bactéries. Les applications médicales (substitut de plasma, vaccins, héparinomimétiques) sont encore au stade prospectif. De nouveaux EPS, produits par des bactéries marines mésophiles aérobies, issues du milieu hydrothermal profond, présentent des propriétés biologiques innovantes. La première étape de cette étude a consisté à identifier la structure de l'EPS GY785, produit par *Alteromonas infernus*. Une unité répétitive nonasaccharidique originale a été révélée par une analyse combinant les modifications chimiques et la résonance magnétique nucléaire. Ce polysaccharide de 10^6 g/mol est composé de glucose, de galactose, d'acide glucuronique et d'acide galacturonique. Ce polymère possède une ramification elle-même ramifiée et un groupement sulfate.

Différents procédés de modifications de ces EPS ont été mis au point pour augmenter leurs potentialités en tant que molécules bioactives. Trois EPS (le GY785, le HE800 et le HYD721) ont été modifiés par dépolymérisation radicalaire afin de préparer des dérivés de faibles masses molaires, homogènes et compatibles avec une utilisation médicale. Ces dérivés ont également été sulfatés ou phosphatés. Une étude physico-chimique, a ensuite montré qu'une activité anticoagulante (inférieure à celle de l'héparine) était observable et principalement liée au taux de sulfate, indépendamment de la structure. Une étude préliminaire des propriétés anticoagulantes a permis d'identifier un polysaccharide fortement sulfaté dont 100 % des chaînes possèdent une affinité pour l'antithrombine (principal inhibiteur d'un enzyme clé de la coagulation, la thrombine). La connaissance des relations structure/fonction est une étape essentielle avant une éventuelle utilisation thérapeutique des EPS.

Mots-clés: exopolysaccharides, bactéries, sources hydrothermales, structure, spectroscopie de RMN, dépolymérisation, sulfatation, phosphatation, activité anticoagulante.

ABSTRACT

Unusual exopolysaccharides (EPS) produced by heterotrophic aerobic and mesophilic bacteria originating from hydrothermal vent, were reviewed as a new source of polysaccharidic structures endowed with innovative biological properties. The first step of this study was the structure determination of the EPS GY785, synthesized by *Alteromonas infernus*. A highly branched nonasaccharidic repetitive unit was identified using chemical modifications and nuclear magnetic resonance spectroscopy. This 10^6 g/mol polysaccharide is composed of glucose, galactose, glucuronic acid, galacturonic acid, and contains a single branched ramification and one sulphate group.

The second step was the preparation of low molecular weight bioactive polysaccharides presenting interest in the treatment of diseases. Three chemically modified EPS (GY785, HE800, and HYD721) were prepared using free radical depolymerization, sulphation and phosphorylation. Physicochemical studies of those homogeneous derivatives showed that sulphate contents modulate the anticoagulant activity. Preliminary studies of a highly sulphated fraction of low molecular weight EPS GY785 showed a high affinity for antithrombin with a less *in vitro* anticoagulant activity than heparin. Marine exopolysaccharides are a great source of molecules endowed with biotechnological interest but a perfect knowledge of structure-activity relationships is essential before the conception of drugs.

Key-words: exopolysaccharides, bacteria, deep-sea hydrothermal vent, structure, NMR spectroscopy, depolymerization, sulphation, phosphorylation, anticoagulant activity.

Remerciements

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Biotechnologie des Molécules Marines à l'IFREMER de Nantes.

Je tiens en premier lieu à remercier Jean GUEZENNEC et Patrick DURAND pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je remercie vivement Lionel pour avoir accepté la direction de cette thèse, pour son aide, pour m'avoir transmis sa passion de la chimie structurale et m'avoir fait partager son goût pour les sciences mûrement réfléchies.

Un grand merci à Sylvia pour avoir également encadré ce travail, pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique, ses critiques et pour avoir mis à ma disposition les ressources nécessaires à la réalisation de ce projet.

Mes remerciements s'adressent également aux autres membres du jury, : Mr C. BERTHOU et Mme B. MULLOY, qui ont bien voulu être rapporteurs, Mme J. JOZEFONVICZ, et Mr D. MULLER pour avoir accepté de juger ce travail

Merci à Jacqueline et Corinne pour leur disponibilité et leur précieuse aide au quotidien.

J'adresse également mes remerciements à Roger PICHON et Nelly KERVAREC du laboratoire de RMN de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest pour leur merveilleuse bonne humeur, leur accueil et leur patience dans la réalisation de nombreux spectres lors de nos expéditions Brestoises.

Je n'oublierai pas, les pauses café-CPC avec Luc, la bonne humeur de Jojo et Mireille, les dégustations en tous genres, Gwen et ses plans dits "à la Gwen", Rapiette et Ju, pour les pauses de fin de journées aux saveurs de la Corrèze, les grandes bouffes estivales organisées par Isabelle et tous les bons moments passés avec chacun.

Introduction	7
1. Etude bibliographique	9
1.1. Les Polysaccharides bactériens.....	10
1.1.1. Les polysaccharides de la paroi	10
1.1.2. Polysaccharides exocellulaires	13
1.2. Composition et classification des exopolysaccharides	14
1.2.1. Composition osidique	14
1.2.2. Classification	15
1.2.3. Les substituants.....	16
1.3. Rôle et utilisation des exopolysaccharides	19
1.3.1. Rôle physiologique	19
1.3.2. Les applications médicales des exopolysaccharides.....	20
1.3.2.1 Applications médicales liées aux propriétés physiques.....	21
1.3.2.2 Vaccins polysaccharidiques.....	23
1.3.2.3 Héparinomimétiques et analogues de glycosaminoglycanes.....	23
1.3.2.4 Autres applications médicales	25
1.3.2.5 Perspectives	26
1.4. Les micro-organismes marins.....	26
1.4.1. Biodiversité.....	26
1.4.2. Les micro-organismes hydrothermaux d'origine marine produisant des EPS	28
1.4.2.1 Présentation des sources hydrothermales	28
1.4.2.2 Les bactéries hydrothermales productrices d'exopolysaccharides.....	29
1.4.3. Les biopolymères issus de la modification des exopolysaccharides marins	34
2. Etude structurale de l'EPS GY785 produit par la bactérie <i>Alteromonas infernus</i>	37
2.1. Matériel et méthodes.....	38
2.1.1. Obtention et purification de l'EPS GY785 natif	38
2.1.1.1 Production et isolement de l'EPS GY 785 natif	38
2.1.1.2 Purification de l'EPS GY 785 natif	39
2.1.2. Dosage et identification des résidus glycosidiques	39
2.1.2.1 Composition globale.....	39
2.1.2.2 Caractérisation des résidus glycosidiques	44
2.1.3. Détermination de la nature des liaisons osidiques.....	48
2.1.3.1 Technique de méthylation des oses neutres.....	48
2.1.3.2 Technique de méthylation avec réduction des acides uroniques	54
2.1.4. Détermination de la séquence glycosidique.	55
2.1.4.1 Dégradation des acides uroniques par le lithium dans l'éthylène diamine	55
2.1.4.2 Cinétique d'hydrolyse.....	56
2.1.4.3 Préparation d'oligosaccharides réduits et non réduits à partir de l'EPS natif	57
2.1.4.4 Préparation et isolement de fractions de faibles masses molaires	59
2.1.4.5 Caractérisation des oligosaccharides par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC)	61

2.1.4.6 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	62
2.1.4.7 Spectrométrie de masse.....	63
2.2. Résultats de l'étude structurale de l'EPS GY785.....	65
2.2.1. Caractérisation de l'EPS GY 785 natif.....	65
2.2.1.1 Composition globale.....	65
2.2.1.2 Composition osidique.....	65
2.2.1.3 Analyse des acétates d'alditol partiellement méthylés par GC/MS.....	66
2.2.1.4 Identification des séquences composées d'oses neutres.....	69
2.2.1.5 Cinétique d'hydrolyse et démarche de la caractérisation structurale adoptée.....	71
2.2.2. Préparation et étude structurale des oligosaccharides de l'hydrolysate réduit, H-GY785red.....	73
2.2.2.1 Obtention des oligosaccharides.....	73
2.2.2.2 Estimation de la masse molaire par HPSEC du H-GY785red.....	73
2.2.2.3 Détermination de la composition glycosidique du H-GY785red.....	74
2.2.2.4 Nature des liaisons glycosidiques du H-GY785red.....	75
2.2.2.5 Spectrométrie de masse.....	77
2.2.2.6 Caractérisation du H-GY785red par spectroscopie de RMN.....	80
2.2.2.7 Conclusion.....	84
2.2.3. Caractérisation des oligosaccharides du H-GY785.....	85
2.2.3.1 Caractérisation chimique des oligosaccharides.....	85
2.2.3.2 Attribution des signaux et identification des différents résidus glycosidiques par RMN.....	85
2.2.3.3 Détermination de l'enchaînement des résidus.....	87
2.2.3.4 Identification du résidu terminal réducteur (R).....	91
2.2.3.5 Conclusion.....	92
2.2.4. Etude des fractions de faible masse molaire (LMW-GY785).....	95
2.2.4.1 Analyse des constituants du polysaccharide de faible masse molaire.....	95
2.2.4.2 Purification du LMW-GY785 (préparation de EI-GY785).....	95
2.2.4.3 Purification par perméation de gel (préparation du SE-GY785).....	99
2.2.4.4 Mise en évidence des deux polymères.....	102
2.2.5. Caractérisation du polymère majoritaire.....	104
2.2.5.1 Identification et dosage des résidus glycosidiques de la fraction EI-GY785.....	104
2.2.5.2 Détermination de la nature des liaisons glycosidiques.....	105
2.2.5.3 Etude des spectres de RMN.....	106
2.2.5.4 Conclusion.....	120
3. Modifications et Activité biologique des EPS.....	122
3.1. Matériel et méthodes.....	123
3.1.1. Modifications chimiques des EPS.....	123
3.1.1.1 Préparation de polysaccharides de faible masse molaire par dépolymérisation radicalaire.....	123
3.1.1.2 N-désacétylation par l'hydrazine de HE800DR.....	127
3.1.1.3 N-désacétylation par la soude du HE800DR.....	128
3.1.1.4 Sulfatation des EPS de faible masse molaire.....	130
3.1.1.5 Phosphatation des EPS de faible masse molaire.....	131
3.1.2. Caractérisation physico-chimique des dérivés.....	132
3.1.2.1 Détermination de la masse molaire par HPSEC.....	132
3.1.2.2 Détection des ions libres.....	133
3.1.2.3 Spectroscopie Infrarouge.....	134
3.1.3. Etude de l'activité anticoagulante.....	134

3.2. Résultats et discussion	140
3.2.1. Dépolymérisation des EPS	141
3.2.1.1 Dépolymérisation radicalaire du HE 800	141
3.2.1.2 Dépolymérisation radicalaire du GY785 et du HYD721	147
3.2.2. Sulfatation des EPS.....	149
3.2.2.1 N-désacétylation du HE800	150
3.2.2.2 Sulfatation des HE800 de faibles masses molaires.....	156
3.2.2.3 Sulfatation du GY785 et du HYD721	162
3.2.3. Phosphatations du HE800 et du GY785	164
3.2.3.1 Caractérisation physico-chimique	164
3.2.3.2 Caractérisation par RMN.....	167
3.2.4. Propriétés anticoagulantes	169
3.2.4.1 Temps de céphaline activée des EPS sulfatés de faible masse molaires	169
3.2.4.2 Temps de céphaline activée des dérivés phosphatés	173
3.2.4.3 Temps de thrombine	176
3.2.5. Interaction des dérivés sulfatés avec les serpins	177
3.2.5.1 Affinité des dérivés sulfatés avec l'antithrombine	178
3.2.5.2 Interaction avec le deuxième cofacteur de l'héparine	182
 Conclusion et perspectives.....	 185
Bibliographie.....	189

Liste des abréviations

BCA :	Acide bicinchoninique
BuLi :	Butyllithium
COSY:	Correlation observed opectroscopy
CPS :	Polysaccharide(s) capsulaire(s) ("capsular polysaccharides")
Dp :	Degré de polymérisation
DMPH :	<i>mé</i> ta-hydroxydiphényl
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
EPS :	Exopolysaccharide(s)
FID :	Détecteur à ionisation de flamme ("flam ionisation detector")
GAG :	Glycosaminoglycane(s)
Gal :	Galactose
GalA:	Acide galacturonique
Gal-NAc :	<i>N</i> -acétyl galactosamine
GC :	Chromatographie en phase gazeuse ("Gas chromatography")
GC/MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse ("Gas chromatography masse spectrometry detection")
Glc :	Glucose
GlcA :	Acide glucuronique
GlcNAc :	<i>N</i> -acétyl glucosamine
HMBC :	"Heteronuclear multiple bond correlation"
HMQC :	"Heteronuclear multiple quantum coherence"
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance ("High performance liquid chromatography")
HPSEC :	Chromatographie d'exclusion stérique haute performance
HSQC :	"Heteronuclear single quantum coherence"
I :	Polydispersité
LPS :	Lipopolysaccharide(s)

Mn :	Masse molaire moyenne en nombre
MS/MS :	Spectrométrie de masse en tandem
Mp :	Masse molaire au pic
Mw :	Masse molaire moyenne en poids
<i>p</i> :	Forme pyranose
PMAA :	Acétates d'alditols partiellement méthylés ("alditol acetate partially methylated")
Rham :	Rhamnose
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROESY :	Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
Rpm:	Rotation par minute
T.A. :	Température ambiante
TFA :	Acide trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
TMS :	Triméthylsilylé
TOCSY:	"Total observed correlation spectroscopy"
Tr :	Temps de rétention relatif

Introduction

Les propriétés des polysaccharides sont largement exploitées dans différents secteurs industriels, aussi bien en agroalimentaire (comme agents texturants) que dans le domaine pharmaceutique (substances biocompatibles, thérapeutiques). En effet, les interactions polysaccharides-protéines ont un rôle primordial dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (thrombose, inflammation, métastases, stérilité...).

L'héparine est un polysaccharide sulfaté, qui fut découvert au début du 20^{ème} siècle. Elle est très largement utilisée en médecine comme agent anticoagulant et antithrombotique. La majeure partie des héparines commercialisées actuellement est extraite de muqueuses intestinales de porc. Cependant, plusieurs programmes de recherche ont abouti à la synthèse par voie chimique et/ou enzymatique de la séquence pentasaccharidique responsable de l'activité de l'héparine (Petitou *et al.*, 1999). Cette alternative à l'utilisation de produits d'origine animale, présente plusieurs avantages. Elle supprime notamment le risque de contamination par des agents pathogènes non conventionnels. Cette synthèse est très reproductible et malgré un grand nombre d'étapes, ce pentasaccharide de synthèse est commercialisé par les laboratoires Sanofi. L'évolution évoquée par cet exemple laisse présager une diminution progressive de l'utilisation de médicaments préparés à partir de matière première animale. Avec l'essor de la biotechnologie, la recherche de nouvelles sources de molécules bactériennes se développe afin de mettre au point de nouveaux principes actifs ou de découvrir des analogues de structure des molécules existantes. De surcroît, l'utilisation de polysaccharides extraits de bactéries réduit le risque de contamination par le prion ou les virus. L'étude et l'exploitation des exopolysaccharides (EPS) bactériens se positionne dans cet axe de recherche de structures innovantes, notamment pour la conception de nouveaux médicaments.

La découverte de nouvelles niches écologiques à très forte concentration bactérienne a conduit à l'identification de nouvelles espèces de bactéries productrices d'EPS. Le laboratoire de Biotechnologie des Molécules Marines de l'IFREMER (Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer) a pour objectif l'étude et la valorisation des EPS bactériens issus du

milieu hydrothermal profond dans le domaine de la biotechnologie. Un criblage a permis d'isoler plus de 1100 bactéries capables de produire des EPS à pression atmosphérique et à température ambiante. Certains polymères ont déjà fait l'objet de dépôts de brevets au regard de leurs caractéristiques physico-chimiques et/ou rhéologiques innovantes.

Mais l'intérêt majeur de ces nouveaux polysaccharides réside dans leur diversité de structure, qui offre un large spectre de propriétés et d'applications. Par exemple, l'un d'entre eux, le GY785 est produit par une bactérie anaérobie facultative, hétérotrophe et mésophile (*Alteromonas infernus*). Cet EPS présente, au regard d'une étude menée par Guezennec *et al.* (1998), et Collic-Jouault, *et al.* (2001) des propriétés anticoagulantes prometteuses. Mais une valorisation de ce polymère n'est pas envisageable sans la connaissance de la structure de son unité répétitive.

La première partie de cette étude est consacrée à l'analyse structurale de l'EPS GY785. Plusieurs étapes ont été nécessaires afin de caractériser le motif répétitif complexe de ce polymère. Des oligosaccharides puis des fractions de faibles masses molaires ont été préparés et étudiés par différentes techniques d'analyses chimiques combinées à la spectroscopie de masse et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).

Puis, trois EPS de structures connues (le HE800 et le HYD721) ou déterminée au cours de cette étude (le GY785), ont été modifiés par voie chimique dans le but de leur conférer une (ou des) activité(s) biologique(s), du type de celles des glycosaminoglycanes de faible masse molaire. Les propriétés physico-chimiques des différents dérivés de faibles masses molaires, sulfatés et/ou phosphatés sont présentées et analysées. Des études préliminaires sur leurs activités anticoagulantes ont été réalisées afin d'aborder les relations structure-fonction de ces nouvelles molécules bioactives d'intérêt thérapeutique.

1. Etude bibliographique

1.1. Les Polysaccharides bactériens

Les bactéries synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés en trois grands groupes selon leur localisation dans la cellule: (i) Le premier groupe rassemble les polysaccharides du cytosol, ils servent de source de carbone et d'énergie à la cellule et ils n'entrent pas dans le cadre de cette étude; (ii) le second groupe concerne les constituants de la paroi tels que les acides téichoïques et les peptidoglycanes; (iii) le troisième groupe qui fera l'objet d'une étude plus détaillée, réunit les polysaccharides élaborés par la cellule et secrétés dans le milieu.

1.1.1. Les polysaccharides de la paroi

La surface des cellules bactériennes est une structure complexe, très riche en molécules contenant des composants glucidiques. Ces éléments structuraux de la paroi microbienne peuvent se diviser en plusieurs classes suivant leur nature.

Les peptidoglycanes sont des macromolécules constituées d'un squelette polysaccharidique linéaire d'acides *N*-acétylmuramiques et de *N*-acétylglucosamines. Ces résidus sont liés entre eux par des liaisons β -1,4. Les groupements carboxyles de l'acide *N*-acétylmuramique sont les points d'ancrage des chaînes latérales peptidiques. Ces chaînes latérales sont constituées d'acides aminés L et D : la L-lysine, l'acide D-glutamique et parfois d'acide *m*-diaminopimélique.

Les acides téichoïques sont des polymères constitués d'unités glycéro-phosphate liées en 1,3 ou 1,2 ou d'unités ribitol-phosphate liées en 1,5 ou encore d'unités plus complexes dans lesquelles le glycérol ou le ribitol est associé à des sucres comme le glucose, le galactose ou la *N*-acétylglucosamine. Les acides téichoïques sont étroitement associés au réseau de peptidoglycanes et pour certains d'entre eux (acides lipotéichoïques) à la membrane cytoplasmique. Ils traversent les diverses couches de peptidoglycanes de part en part pour émerger à la surface externe et en assurent la cohésion (Figure 1).

Les bactéries à Gram négatif possèdent des lipopolysaccharides (LPS) dont la partie lipidique est enchâssée dans la membrane externe (Figure 2).

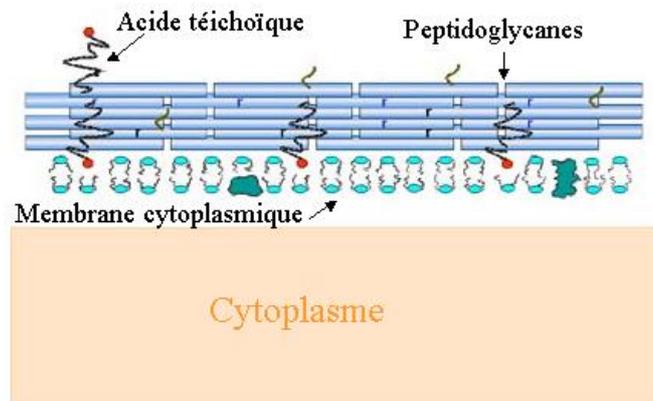


Figure 1 : Schéma de la paroi des bactéries Gram positif d'après (Leclerc *et al.*, 1995)

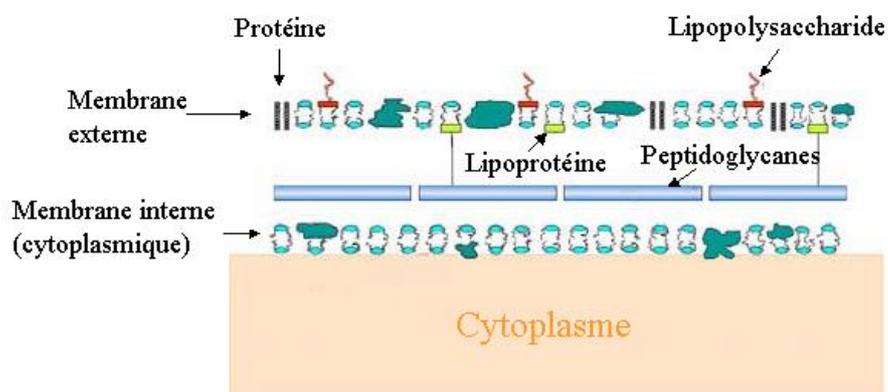


Figure 2 : Schéma de la paroi des bactéries Gram négatif d'après (Leclerc *et al.*, 1995)

Les LPS sont des constituants uniques et caractéristiques de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ils sont composés de deux parties osidiques, la chaîne O-spécifique et le « core » (Figure 3). La chaîne O-spécifique est très variable et responsable du pouvoir pathogène de certaines bactéries comme *Vibrio cholerae*. Elle porte les déterminants antigéniques responsables de la spécificité de type. Le « core » est également une partie glycanique mais sa composition est beaucoup moins variable. Le troisième constituant des LPS est le lipide A formé d'une ossature de glucosamine portant des chaînes aliphatiques : il est responsable de la toxicité de la molécule. Les activités biologiques des LPS (ou endotoxines) sont très diversifiées. Une partie seulement de celles-ci peut être mise en relation avec les symptômes cliniques associés aux infections invasives à Gram négatif et aux chocs septiques. Parmi les différents effets des endotoxines, on peut mentionner l'effet pyrétogène, l'activation du système du complément, des macrophages et la stimulation des lymphocytes B.

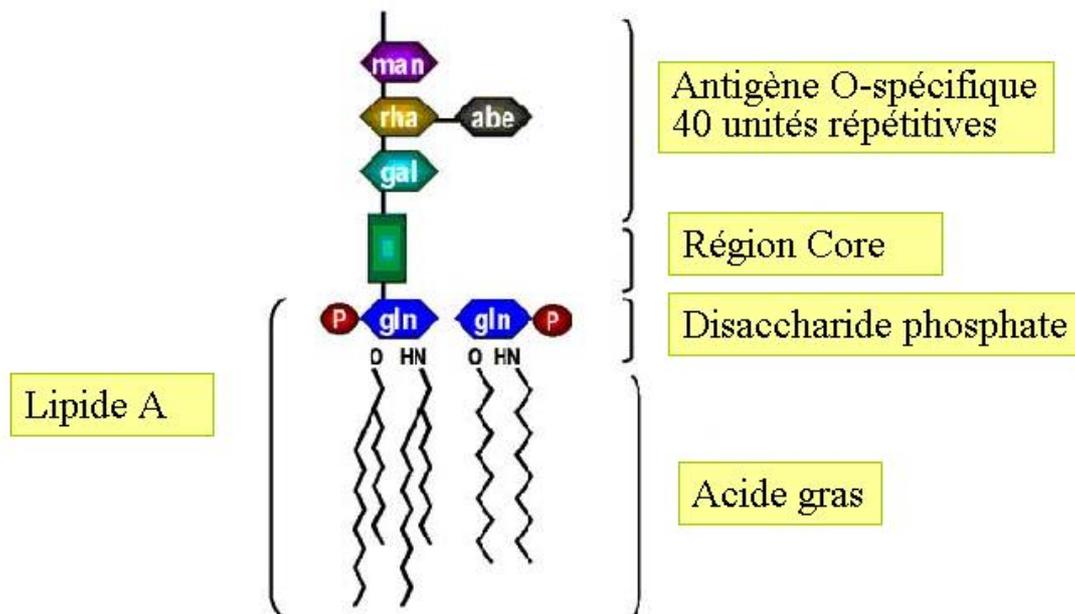


Figure 3 : Structure des Lipopolysaccharides d'après (Whitfield *et al.*, 1993)

1.1.2. Polysaccharides exocellulaires

Les polysaccharides exocellulaires sont synthétisés à la fois par des bactéries à Gram positif, négatif et des cyanobactéries. Ils se présentent soit sous forme d'une capsule enrobant la cellule soit secrétés dans le milieu environnant. Dans certains cas, les deux formes sont produites par le micro-organisme mais dans la pratique, la distinction entre les deux est floue. Ces polymères ont été nommés polysaccharides capsulaires ("capsular polysaccharides" : CPS), microcapsulaires, ou encore "slime" dans la littérature anglo-saxonne. Le terme général de polysaccharide exocellulaire ou exopolysaccharide (EPS) semble le plus approprié pour désigner ces différentes formes de polysaccharides.

Ces polymères sont majoritairement composés d'oses. Toutes leurs voies de synthèses ne sont pas encore connues car elles sont différentes et particulières à chaque bactérie. La biosynthèse de quelques EPS a toutefois été particulièrement étudiée : Les dextranes sont exclusivement composés de glucose. Ils sont synthétisés par des bactéries (*Streptococcus* et *Leuconostoc*), qui n'utilisent qu'un substrat spécifique, le sucrose. En l'absence de ce substrat, la bactérie se développe mais elle est incapable de synthétiser le polymère. La synthèse de ce polysaccharide est très particulière comme celle du mutane et du levane, puisqu'elle a lieu dans la paroi cellulaire ou à l'extérieur de la cellule.

La biosynthèse des polysaccharides de surface à partir de précurseurs cytoplasmiques est plus commune et relativement bien connue pour les espèces les plus courantes de bactéries à Gram négatif (Sutherland *et al.*, 1994). De tels micro-organismes produisent des EPS à partir de diverses sources de carbone, la synthèse intracellulaire du polymère est suivie d'une excrétion dans le milieu extracellulaire. La batterie enzymatique propre à chaque bactérie permet de produire des polysaccharides possédant une unité répétitive régulière ou non. Ils peuvent être ramifiés ou linéaires. La cellulose bactérienne ou les pullulanes sont produits suivant ce schéma de synthèse.

Une interrogation récurrente sur la biosynthèse des EPS concerne la participation d'accepteurs. Lors de la formation des lipopolysaccharides, l'accepteur est la région "Core" sur laquelle l'antigène O-spécifique est transféré par des enzymes appropriées. En ce qui concerne les peptidoglycanes et les acides téichoïques le même mécanisme a été décrit (Sutherland, 1982). Dans les trois exemples précédents, l'absence de cet accepteur (ou amorce) bloque l'élongation

de la partie osidique. D'après les études récentes (De Vuyst *et al.*, 2001), il semble que la majorité des EPS soit synthétisée par des mécanismes intracellulaires de cette nature, qui nécessitent la présence du substrat dans la cellule. Ce substrat est alors phosphorylé puis éventuellement modifié suivant les besoins des processus anaboliques de formation du polymère. Puis, ces résidus sont transformés en "nucléotides sucres" (uridine-5'-diphosphoglucose ou UDP-glucose par exemple) qui sont les précurseurs activés du polymère. Le premier monosaccharide peut être lié à un transporteur lipidique (undecaprenyl phosphate ou isoprénoïde pyrophosphate). La polymérisation des monosaccharides activés est réalisée sur la face interne de la membrane cytoplasmique ou bien l'unité répétitive est transportée à travers la membrane avant la polymérisation.

Après la sécrétion, le polymère est libéré dans le milieu de culture ou reste attaché à la membrane en formant une capsule autour de la cellule.

La biosynthèse du squelette glycosidique vient d'être brièvement exposée, cependant les EPS ne sont pas exclusivement constitués d'un enchaînement de monosaccharides. Les oses peuvent, être substitués par des groupements fonctionnels. Ces modifications ont lieu sur les monosaccharides avant la construction de l'unité répétitive ou après la polymérisation. Ces substituants confèrent une grande partie de leurs propriétés physiques aux EPS.

1.2. Composition et classification des exopolysaccharides

1.2.1. Composition osidique

Les EPS sont composés de résidus glycosidiques, qui peuvent être liés de façon covalente à des substituants organiques ou inorganiques. Les sucres que l'on peut trouver dans les EPS sont extrêmement divers. La plupart de ces résidus sont également présents chez les animaux et les végétaux. Le D-glucose, le D-galactose et le D-mannose sous forme pyranose, sont présents dans de nombreux EPS. Parmi les 6-déoxy-hexoses, le L-fucose et le L-rhamnose sont les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés. Les EPS de cellules eucaryotes se distinguent par la production, dans certains cas, de pentoses comme le D-ribose ou le D-xylose, qui sont beaucoup moins fréquents dans les polysaccharides dérivés des procaryotes (Sutherland, 1990).

Les cyanobactéries produisent également des EPS, plus de 70 souches ont été répertoriées, mais seulement 10 monosaccharides différents ont été rencontrés :

- Des hexoses : glucose (présent dans 90 % des polymères), galactose et mannose
- Des pentoses : ribose, xylose et arabinose
- Des déoxy-hexoses : fucose et rhamnose
- Des hexoses acides : acide glucuronique et acide galacturonique (De Philippis *et al.*, 1998).

En plus des monosaccharides les plus communs cités ci-dessus, les EPS peuvent contenir un ou plusieurs sucres rares, comme les hexoses de configuration absolue L, les hexosamines *N*-acétylées telles que la *N*-acétylglucosamine, la *N*-acétylgalactosamine, la *N*-acétylmannosamine ou des amino-sucres comme la fucosamine ou la talosamine.

1.2.2. Classification

Devant la grande diversité de compositions et de structures des EPS, il est difficile d'en établir une classification. La nature de leurs composants a cependant permis de les diviser en deux classes : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Cette nomenclature proposée par Sutherland dès 1972, a été adoptée et reprise par de nombreux auteurs:

– Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides ne sont composés que de monosaccharides identiques. Ils comprennent des glucanes, uniquement constitué de D-glucose mais qui peuvent posséder des propriétés physiques très différentes. En effet, l'enchaînement de leurs résidus et la présence de ramifications modifient leurs comportements en solution. Le scléroglycane est très visqueux alors que le curdlane forme un gel en solution et la cellulose bactérienne est insoluble. Pourtant, tous les trois sont exclusivement composés de glucose. Leurs utilisations se réduisent actuellement, à quelques exceptions près, à l'exploitation de leurs propriétés rhéologiques. Les homopolysaccharides bactériens les plus utilisés sont le dextrane, le curdlane et le scléroglycane (aussi appelé pullulane). Leurs structures, leurs propriétés physico-chimiques et leurs utilisations industrielles sont décrites dans de nombreux ouvrages (Whistler *et al.*, 1993).

– Hétéropolysaccharides

La majorité des polysaccharides bactériens est probablement constituée d'hétéropolysaccharides. Ils comprennent les polymères dont l'unité répétitive est constituée d'au moins deux résidus différents. Mais la souche *Pseudoalteromonas* HYD 721 (Rougeaux *et al.*, 1999a) produit un exopolysaccharide dont l'unité répétitive contient huit résidus différents et deux ramifications. Les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés sont le glucose, le galactose et le rhamnose pour les oses neutres, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique, pour les oses acides. Les analyses structurales des EPS de nouvelles souches permettent la mise en évidence de sucres rares comme les acides uroniques-*N*-acétylés ou inconnus jusqu'alors (Dubreucq *et al.*, 1996).

Les hétéropolysaccharides comme les homopolysaccharides peuvent être ramifiés ou linéaires. Il existe donc une très grande variété de structures possibles. Cette classe de polymères représente une source de molécules dont les propriétés physico-chimiques sont très diverses.

1.2.3. Les substituants

– Substituants organiques

Les EPS microbiens peuvent contenir divers substituants liés par des liaisons éther, esters, amide ou acétalique (Tableau 1) au squelette glycosidique. Ces substituants sont très fréquemment rencontrés dans les unités répétitives des EPS bactériens alors qu'ils sont beaucoup plus rares dans les polysaccharides d'eucaryotes. Ces groupements sont en grande partie responsables des propriétés physico-chimiques des polymères qui les portent.

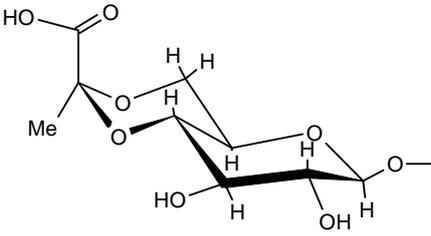
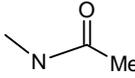
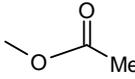
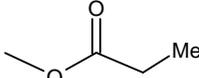
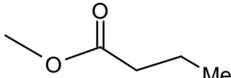
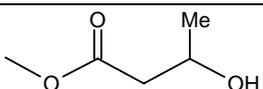
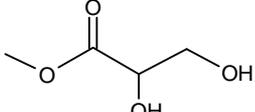
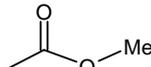
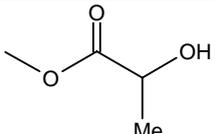
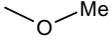
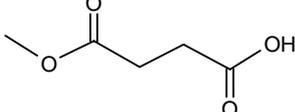
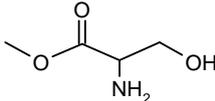
	Substituant	structure	liaison	Bactérie productrice
Acides organiques	Pyruvyl		acétal	Très commun
	N-Acétyl		amide	<i>Vibrio diabolicus</i>
	O-Acétyl		ester	Très commun
	Succinyl		ester	<i>Rhizobium spp.</i>
	Propionyl		ester	<i>Escherichia coli</i>
	Hydroxybutanoyl		ester	<i>Rhizobium trifolii</i>
	Glycéryl		ester	<i>Pseudomonas elodea</i>
	Métylester		ester	
	O-Lactyl		ester	
	O-Métyl		éther	
Acides aminés	Acide Glutamique		ester	<i>Klebsiella aerogenes K82</i>
	Sérine		ester	<i>Escherichia coli</i>

Tableau 1 : Principaux substituants organiques des EPS bactériens

Les substituants, tels que le groupement pyruvyl ou les *O*-acétyl, présents dans le xanthane, contribuent aux propriétés texturantes de ce polysaccharide. En effet, sa désacétylation provoque une diminution de 30% de sa viscosité. Un groupement pyruvate implique généralement deux hydroxyles en position 4 et 6 d'un même résidu pour former un cycle à 6 atomes (Rougeaux *et al.*, 1998). Il confère un caractère anionique au polymère.

Certains substituants peuvent accroître le caractère lipophile des polysaccharides auxquels ils sont associés ; c'est le cas des groupements alcanoyles (ou acyles) : Les acétates, succinates et propionates forment des esters grâce à leurs liaisons avec les groupements hydroxyles. Les acétates peuvent également s'associer aux fonctions amines pour former une liaison amide. La présence de quelques acides aminés a également été décrite, comme la sérine sur un exopolysaccharide sécrété par *Escherichia coli* K40, l'acide glutamique et la taurine décrits sur d'autres EPS (Sutherland, 1982).

– Les substituants inorganiques

Les groupements sulfates ont longtemps été limités aux polysaccharides eucaryotes et aux protéoglycanes mais il s'avère que les polysaccharides sulfatés sont également présents chez les procaryotes. La majorité des EPS sulfatés décrits sont produits par des cyanobactéries (De Philippis *et al.*, 1998). D'autres bactéries sont capables de produire des EPS possédant un groupement sulfate dans l'unité répétitive (Parolis *et al.*, 1996a; Ragueneas *et al.*, 1997). Les taux de sulfates de ces EPS sont bas (< 10 % du poids de la molécule) contrairement aux polysaccharides d'algues comme les fucoïdanes (Percival *et al.*, 1967; Chevolut *et al.*, 2001) ou certains glycosaminoglycanes (GAG) comme l'héparine qui peuvent contenir jusqu'à 40 % de sulfates.

Les phosphates sont beaucoup plus répandus et représentent un constituant fréquemment rencontré dans les EPS bactériens. Beaucoup des EPS phosphorylés ressemblent à l'acide téichoïque présent dans la paroi des bactéries à Gram positif. En réalité, beaucoup de souches produisent à la fois des polymères phosphorylés constitutifs des membranes et des EPS phosphorylés. Les groupements phosphates peuvent se présenter sous deux formes : (i) sous forme de mono-esters, ils contribuent alors à accentuer le caractère anionique des polysaccharides qui les portent. C'est le cas des phosphomananes (Parolis *et al.*, 1996a). (ii) sous

forme de phosphodiesters. L'atome de phosphore est alors engagé dans deux liaisons avec les hydroxyles de deux résidus différents (van Casteren *et al.*, 1998) (Tableau 2).

Acides inorganiques	Phosphates		ester	<i>commun</i>
	Phosphates		diester	<i>Lactococcus lactis</i>
	Sulfates		ester	<i>Cyanobactéries, Alteromonas infernus</i>

Tableau 2 : Substituants inorganiques des EPS bactériens

1.3. Rôle et utilisation des exopolysaccharides

1.3.1. Rôle physiologique

Les EPS sont présents dans de nombreuses espèces de bactéries provenant de diverses niches écologiques. Les propriétés de cette couche hydrophile secrétée autour des bactéries semblent importantes pour leur survie en milieu naturel. Les EPS influencent la manière dont les bactéries interagissent avec le milieu extérieur, qu'il soit liquide ou solide. En milieu naturel, la majeure partie des bactéries s'adsorbe, sélectivement ou non, à des surfaces inertes ou des organismes vivants. La colonisation bactérienne nécessite la production de molécules regroupées sous le nom de glycocalyx (terme équivalent à EPS). Ces molécules sont majoritairement constituées de polysaccharides acides, extracellulaires mais comprenant également d'autres macromolécules comme des glycoprotéines et des glycolipides. Les surfaces recouvertes d'un film organique sont colonisées par des bactéries qui trouvent ainsi un substrat auquel elles peuvent adhérer même si les forces électrostatiques de la surface à coloniser tendent à repousser la paroi bactérienne (Corpe, 1970). Lorsque cette surface appartient à un organisme vivant, il a

été montré que les EPS jouent un rôle de protection contre les surfactants, les anticorps et les macrophages (Schwarzmann *et al.*, 1971).

En dehors de son intervention dans l'adhésion, le glycocalyx occupe une place importante dans l'adaptation de la bactérie aux conditions physico-chimiques d'un environnement. Les EPS permettent aux bactéries d'agréger des particules en suspension en utilisant leur caractère anionique et leur capacité à chélater les métaux et les ions. Ces propriétés les font ressembler à une résine échangeuse d'ions et favorisent l'apport en nutriments nécessaires à la croissance bactérienne (Costerton *et al.*, 1981). Les EPS constituent une zone d'adhésion et d'échange, ils ont un rôle de tampon et de protection. Les bactéries secrètent les EPS notamment en cas de stress.

1.3.2. Les applications médicales des exopolysaccharides

L'utilisation des EPS dans plusieurs secteurs industriels représente une part importante du marché des polymères hydrosolubles. Une large majorité de ces applications découle directement des propriétés physiques en solution de ces polymères. En effet, comme pour le dextrane qui fut découvert le premier, beaucoup d'applications des EPS exploitent les propriétés rhéologiques (épaississantes, gélifiantes, émulsifiantes...). Ce marché, précédemment monopolisé par les polysaccharides d'origine végétale (pectine, alginates...), a évolué depuis les années 70, avec le développement du xanthane, vers l'utilisation de polysaccharides bactériens. Ce type de propriétés largement employé, a fait l'objet de nombreux travaux (rhéologie, chélation) et ne sera pas développé dans ce mémoire.

En revanche, l'extraordinaire diversité de structures des EPS en fait une classe de molécules dont les applications directes ou indirectes dans le domaine médical sont en plein essor. On distingue deux types d'utilisation, la première est l'exploitation des propriétés fonctionnelles des polysaccharides, comme leur rhéologie ou leur pouvoir gélifiant (applications indirectes). Le dextrane et ses dérivés sont utilisés en laboratoire pour la purification de composés d'intérêts médicaux comme certaines enzymes, mais aussi comme outil thérapeutique en tant que "plasma artificiel". Ces polysaccharides peuvent servir pour l'encapsulation de médicaments dans le but d'un relargage contrôlé. La deuxième utilisation consiste à exploiter les propriétés biologiques de

ces polymères. Il existe principalement, deux types d'applications médicales directes des polysaccharides :

- La préparation de vaccins à partir d'EPS évite l'utilisation d'extraits cellulaires et donc les effets secondaires provoqués par les métabolites tels que les lipopolysaccharides et les protéines.

- Plus récemment, il a été montré qu'un certain nombre d'exopolysaccharides possédait des activités biologiques innovantes comparables à celles des héparinomimétiques, propriétés antitumorales ou antivirales par exemple (Sutherland, 1998 ; Crescenzi, 1995).

De plus, l'extrême diversité des EPS a rendu possible l'identification d'homologies de structures avec des polysaccharides provenant de cellules eucaryotes. Ces analogues structuraux pourront être utilisés en substitut ou en complément des produits naturels.

1.3.2.1 Applications médicales liées aux propriétés physiques

L'utilisation des EPS dans le domaine médical peut être liée aux propriétés physico-chimiques des exopolysaccharides, en particulier leurs propriétés rhéologiques et la capacité de certains exopolymères à retenir l'eau. Ces caractéristiques, qui en font d'excellents agents texturants pour l'industrie agroalimentaire, ont également conduit à leur utilisation en médecine en tant que substituts de plasma, de peau ou pour le transport de principes actifs. Ce sont pour la plupart des polysaccharides de haut poids moléculaire.

– **Substituts de plasma**

Les dextrans sont employés comme substituts de plasma sanguin. La majeure partie des dextrans destinés à l'utilisation clinique proviennent de la souche *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) ou B-512. Les fractions utilisées ont une masse molaire de $75\,000 \pm 25\,000$ g/mol. Ces dérivés sont obtenus par hydrolyse acide ménagée à partir des dextrans natifs. Les produits de plus faible masse molaire sont éliminés trop rapidement pour être efficaces, et les fractions de plus haute masse molaire perturbent la cascade de la coagulation sanguine en provoquant une accélération de la polymérisation de la fibrine (Carlin *et al.*, 1976). L'utilisation de concentrations en dextrans d'environ 6% conduit à des propriétés rhéologiques et osmotiques proches de celles du plasma sanguin.

– Peau artificielle

Des dérivés de dextrans sont également employés pour le traitement de lésions de la peau. Ces dextrans sont préparés en utilisant un agent de polymérisation (épichlorohydrine) qui crée des liaisons inter-chaînes de façon à obtenir un composé de haute masse molaire insoluble dans l'eau. Ce produit réduit le dessèchement des plaies et favorise la cicatrisation (Lloyd *et al.*, 1998). Il a été prouvé que d'autres polysaccharides, comme le (1→3)-β-D-glucane (Leibovich *et al.*, 1980) et des (1→3)-β-D-Mannanes (De Baets *et al.*, 2001) peuvent également induire une cicatrisation accélérée sur des plaies. Les données expérimentales montrent que la régénération des tissus est plus rapide lors de l'utilisation de tels glucanes que lors de l'utilisation de carraghénane, de levane, d'inuline, de dextrane ou d'amidon. Le mécanisme proposé implique principalement les cellules endothéliales et les macrophages, mais reste méconnu. La cellulose bactérienne produite, entre autre, par *Acetobacter xylinum* est en tous points comparable à la cellulose des parois végétales. Lorsqu'elle est extraite du milieu de culture, elle forme rapidement des agrégats microfibrillaires. La très grande pureté de ce polymère dépourvu de contamination en lignine ou en autres composés non cellulosiques a permis son utilisation médicale. Le produit 'BioFill' est utilisé comme pansement pour les brûlures, les ulcères chroniques de la peau ou pour compenser les pertes tissulaires. La cellulose agit comme un substitut temporaire de peau avec une forte résistance mécanique lorsqu'elle est humide (Sutherland, 1998). De plus, la haute capacité de rétention d'eau (approximativement 150 g.g⁻¹) de ce film perméable à l'oxygène semble stimuler la cicatrisation tout en limitant les infections (Vandamme, 1994).

– Transport de principes actifs

Les exopolysaccharides de la famille des gellanes ont la propriété de former des gels en solutions aqueuses, ces polymères sont utilisés pour le transport de principes actifs dans la région oculaire (Meseguer *et al.*, 1996; Carlfors *et al.*, 1998). Les gellanes servent également à la libération progressive de médicaments. Ce phénomène dépend des propriétés ioniques du polymère et du pH du milieu de libération (Banik *et al.*, 2000). D'autres applications concernent leur utilisation comme agent gélifiant pour des produits d'hygiène corporelle (cosmétiques, dentifrices...).

1.3.2.2 Vaccins polysaccharidiques

Quelques bactéries pathogènes présentent des polysaccharides à leur surface qui sont les principaux responsables de la réponse immunitaire lors d'une infection. L'analyse structurale de ces polysaccharides a montré que leur nombre était réduit. Il est possible d'évaluer ces polymères pour montrer qu'ils sont des vaccins potentiels (Sutherland, 1990). L'antigénicité de ces polysaccharides dépend de leurs compositions osidiques, de leurs masses molaires et de leurs conformations en solution. La réponse des anticorps est donc spécifique d'une structure osidique donnée pour une espèce bactérienne précise.

La préparation de vaccins à partir d'exopolysaccharides pose quelques difficultés. En effet, les bactéries à Gram négatif présentent des lipopolysaccharides sur leurs parois externes. Leur présence, même en faible quantité, dans des solutions destinées à la vaccination peut provoquer des effets indésirables (pyrétoène). Par ailleurs les polysaccharides sont généralement peu immunogènes chez l'homme, probablement à cause d'homologies de structure avec les polysaccharides du soi. Des motifs riches en acide sialique sont à la fois présents dans les polysaccharides bactériens et dans certains glycolipides des animaux supérieurs. Les solutions envisagées constituent à modifier les polysaccharides bactériens en les couplant à des protéines de transport ou des toxines ou à réduire leur masse moléculaire. Les vaccins actuellement sur le marché concernent par exemple les sérogroupes A, C et Y de méningocoques ou les vaccins multivalents pour *Streptococcus pneumoniae*.

1.3.2.3 Héparinomimétiques et analogues de glycosaminoglycanes

L'utilisation des EPS comme principes actifs concerne principalement les polymères de faibles masses molaires qui possèdent des activités dans le domaine cardiovasculaire ou de la cancérologie par exemple. Des dizaines de nouvelles structures d'EPS sont découvertes et décrites chaque année, ce qui représente un potentiel croissant de molécules innovantes. Mais les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés chez les EPS sont les mêmes que ceux des polysaccharides de cellules eucaryotes. La probabilité d'identifier des homologues structuraux est faible mais quelques exemples montrent qu'en combinant la chimie ou l'enzymologie avec la

sélection de souches appropriées, il est possible de préparer des molécules semblables à l'héparine.

La bactérie *Streptococcus zooepidemicus* produit un polymère d'acide hyaluronique dont l'unité répétitive est identique à celle de l'acide hyaluronique produite par les mammifères. L'unité répétitive de ce polysaccharide est constituée du disaccharide $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow). Des mutants ne possédant pas de hyaluronidase ont été développés afin d'obtenir des chaînes de haut poids moléculaire. Cet acide hyaluronique bactérien est actuellement utilisé en remplacement du produit naturel en chirurgie ophtalmique (Vandamme, 1994) et en cosmétique. Sa compatibilité avec le système immunitaire humain prouve la similitude entre le produit bactérien et celui issu des cellules eucaryotes (Sutherland, 1998). L'acide hyaluronique est également employé pour améliorer la biocompatibilité des prothèses. Les chaînes utilisées sont généralement de haute masse molaire pour ne pas être dégradées trop rapidement. D'autres applications potentielles concernant l'emploi d'acide hyaluronique bactérien sur des implants chirurgicaux pour éviter les phénomènes d'adhésions post-opératoires, sont envisagées.

Les polysaccharides capsulaires d'*Escherichia coli* sont généralement antigéniques et fréquemment associés aux infections urinaires. Mais l'EPS de la souche K5 d'*E. coli* possède une unité répétitive composée d'acide β -D-Glucuronique lié en 1 \rightarrow 4 à de l' α -N-acétylglucosamine très peu immunogène chez l'homme. Ce polymère acide a la même structure qu'un précurseur de l'héparine, le N-acétylhéparosane et peut donc servir de substrat pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'héparine. Lors d'une approche combinant la chimie et l'enzymologie, des produits présentant une structure et des propriétés biologiques se situant entre l'héparane sulfate et l'héparine ont pu être synthétisés (Casu *et al.*, 1994).

La souche *E. coli* K4 produit un polymère possédant un squelette chondroïtine auquel des résidus β -D-fructofuranosyl sont liés au C₃ de l'acide glucuronique. Cette ramification peut être enlevée par hydrolyse acide ménagée pour donner un composé reconnu par la hyaluronidase et la chondroïtinase.

1.3.2.4 Autres applications médicales

La majorité des structures rencontrées dans les EPS bactériens est originale. Leurs propriétés physico-chimiques peuvent induire de nouvelles applications thérapeutiques. Une approche de l'utilisation médicale des EPS consiste à la conception de principes actifs pour des applications innovantes. Différentes études ont été menées sur l'activité antitumorale des exopolysaccharides. L'action du levane, produit par la souche *Zymomonas mobilis* a notamment été étudiée sur le sarcome 180 (Calazans *et al.*, 2000). Les (1→3)-β-D-Glucanes, provenant de telles bactéries (ou de champignons), ont également été décrits par plusieurs auteurs comme agents antitumoraux. Le mécanisme d'inhibition du développement tumoral n'a pas été entièrement élucidé à ce jour, mais les propriétés les plus importantes de cette activité semblent être liées à la conformation en triple hélice adoptée par ces glucanes, leur masse moléculaire, le nombre et la position des chaînes latérales (Misaki *et al.*, 1993).

L'EPS produit par la bactérie *Ganoderma lucidum* possède également une activité contre la tumeur du sarcome 180 chez la souris à 10 mg.Kg⁻¹. Ce polysaccharide modifié par oxydation périodique suivie d'une réduction au borohydrure, conduit à des glucane-polyols dont l'activité antitumorale est accrue. Une sonication prolongée de ce dérivé conduisant à une masse molaire relative de 4.7×10^5 g.mol⁻¹ augmente encore son activité. Ces dérivés sont actifs, aussi bien contre les tumeurs allogéniques que syngéniques, à des doses de 1 à 5 mg.Kg⁻¹ par injection intrapéritonéale. Le curdlane (Calazans *et al.*, 2000) montre également une activité antitumorale *in vivo* à des doses similaires à celles des β-Glucanes. Ils ont également la propriété de former une structure en triple hélice.

L'EPS sécrété par *Bacillus polymyxa* réduit le taux de cholestérol chez les animaux hypercholestérolémiques de laboratoire. Le polymère responsable de cette activité contient des sucres neutres (D-glucose, D-galactose et D-mannose) et des oses acides (acide D-glucuronique et D-mannuronique). Les mêmes propriétés ont été décrites sur les polysaccharides d'origine végétale comme la pectine et les gommes à base de guar et des exopolysaccharides de champignons (Cheung, 1996; Kim *et al.*, 2001). Le mécanisme proposé est basé sur la propriété de ces polymères à faire diminuer l'assimilation des sels biliaires (Sutherland *et al.*, 1990).

1.3.2.5 Perspectives

De nouvelles structures d'EPS bactériens sont très fréquemment décrites. Mais on ne se contente plus d'utiliser ces macromolécules pour leurs seules propriétés rhéologiques même si quelques exemples montrent qu'elles peuvent être exploitées pour de telles applications médicales. La très grande diversité structurale offerte par les hétéroglucosaminoglycans pousse les recherches vers la découverte de nouveaux principes actifs. Les quelques exemples précédents montrent qu'il existe des similitudes structurales fortes entre les EPS et les polysaccharides présents dans le règne animal ou végétal. Les fonctions respectives de ces composés sont apparemment très différentes, mais ces analogies structurales témoignent d'une certaine unicité des voies de biosynthèse de ces polymères. En effet, le nombre de monosaccharides est limité, la biosynthèse des polysaccharides implique donc l'utilisation d'enzymes communes aux bactéries et aux cellules des animaux supérieurs. De tels polysaccharides pourraient servir de molécules de substitution dans un futur très proche.

La découverte de nouvelles sources de bactéries productrices de polymères conduit, en règle générale à l'identification de molécules innovantes, par leurs structures et leurs propriétés. La modification structurale de ces EPS bactériens, peut donc assurer la production de polysaccharides possédant des propriétés voisines de celles des glycosaminoglycans.

1.4. Les micro-organismes marins

1.4.1. Biodiversité

Excepté en surface, dans les zones tempérées ou tropicales, la majorité des environnements marins (90%) est caractérisée par une température inférieure à 5°C (psychrosphère). Dans les grands fonds, la pression hydrostatique est considérable, la température est comprise entre 2 et 5°C et l'obscurité est totale. Les océans renferment également des zones où l'activité volcanique génère des caractéristiques physico-chimiques très particulières. Les gradients de température sont très importants, l'eau de mer présente localement des gaz dissous (H_2S , CO, CO_2 , H_2), des métaux en forte concentration et des valeurs de pH très faibles.

L'extrême variété des milieux marins a conditionné les organismes qui y vivent. Ainsi, cette biocénose s'est adaptée à toutes ces conditions en développant des stratégies répondant aux particularités physico-chimiques du milieu naturel. Il en résulte une biodiversité des micro-organismes marins qui s'avère être une source immense de molécules aux propriétés nouvelles. Parmi les organismes unicellulaires (micro-algues, cyanobactéries...), les bactéries font l'objet de nombreuses études à cause, bien sûr, de la diversité de ce règne dans le milieu marin, mais également parce que leur culture en laboratoire et à l'échelle industrielle est possible, bien connue et présente, dans la plupart des cas, de bons rendements.

Les bactéries sont omniprésentes dans le milieu marin. Elles sont parmi les premiers organismes à coloniser toute surface immergée dans l'eau de mer, y compris les animaux et les végétaux. La formation de ces biofilms a été démontrée sur des surfaces artificielles, mais également sur des poissons (Weiner, 1997). Cette symbiose permet aux bactéries de se développer dans un environnement constamment renouvelé en nutriments et aux poissons d'être enduits d'un mucus (composé d'exopolymères) qui leur confère une meilleure pénétration dans l'eau.

Des bactéries ont été découvertes et collectées à des températures extrêmes proches de 0°C dans l'antarctique par exemple (Maruyama *et al.*, 1997). Ces bactéries appelées psychrophiles, sont particulièrement étudiées pour leurs enzymes qui peuvent réaliser une catalyse efficace entre 0 et 20°C. Certaines espèces ont été identifiées comme productrices d'EPS (Feller *et al.*, 1994).

Le fond des océans, longtemps considéré comme hostile à toute forme de vie, abrite également des bactéries psychrophiles. Leur capacité à se développer à de grandes profondeurs les expose à des pressions hydrostatiques considérables (200 atmosphères à 2000 mètres de profondeur) induisant la synthèse de métabolites inhabituels. Ces bactéries sont appelées piezophiles ou barophiles (Kato *et al.*, 2001).

Les sources hydrothermales marines abritent également des écosystèmes favorables au développement de micro-organismes. L'abondance et la biodiversité des bactéries rencontrées sur les sites hydrothermaux constituent la majorité des découvertes en biologie marine ces 20 dernières années (Prieur, 1997). De nombreuses espèces nouvelles de bactéries et d'Archaea

thermophiles dont la température optimale de croissance est supérieure à 60°C, hyperthermophiles, supérieure à 80°C et mésophiles, comprise entre 20 et 60°C, ont été identifiées. L'intérêt biotechnologique de ces bactéries réside, principalement dans l'identification et l'isolement d'enzymes thermostables. L'identification de protéases thermostables représente un intérêt dans la synthèse organique à haute pression (Deming, 1998) et plusieurs ADN polymérase pourraient être utilisées pour diminuer les temps de réaction de polymérisation en chaîne ("PCR").

1.4.2. Les micro-organismes hydrothermaux d'origine marine produisant des EPS

La découverte des communautés animales et microbiennes associées aux sources hydrothermales sous-marines des grands fonds, en 1977, constitue l'une des découvertes majeures de l'océanographie moderne. Le milieu marin profond s'avère un site d'exploration extraordinaire où la biodiversité et la capacité des organismes qui s'y développent, à utiliser une autre source d'énergie que de la lumière, fascinent la communauté scientifique.

1.4.2.1 Présentation des sources hydrothermales

Sur la terre ferme, la présence de sources hydrothermales est liée à l'activité volcanique. Il en est de même au fond des océans, à l'endroit où les plaques qui constituent la croûte terrestre s'écartent de quelques centimètres par an. Dans ces régions, la lave en fusion monte, puis s'étale et se solidifie. Ainsi se forment peu à peu les dorsales. Le phénomène n'est jamais explosif car la pression de l'eau ne permet pas la formation de vapeur, quelle que soit la température atteinte par le magma. En se solidifiant, la lave refroidie se disloque et se craquelle. L'eau de mer envahit alors ce réseau de fissures profondes de plusieurs centaines de mètres. Elle s'y réchauffe (vers 350°C), réagit avec la lave pour former un fluide hydrothermal acide, riche en métaux lourds et en sulfures (H₂S). C'est ce fluide qui ressort en certains endroits de la dorsale sous forme d'une source hydrothermale. La manifestation la plus spectaculaire de ces sources hydrothermales est le fumeur noir (Figure 4).

Des cheminées s'élèvent, dans l'axe de la dorsale, à une dizaine de mètres de hauteur. Ces cheminées sont formées par l'accumulation de dépôts de sulfures métalliques. Elles grandissent rapidement, de plusieurs mètres par an. Près de leur sommet, s'installent ces "boules blanches" que forment les tubes agglomérés des vers de Pompéi (*Alvinella*). Ce sont des animaux qui vivent à des températures de l'ordre de 40°C. La base des cheminées, si la température du fluide dilué ne dépasse pas 20°C, est recouverte de touffes de *Riftia*. Ce sont de grands vers vestimentifères à panache rouge qui vivent dans des tubes blanc nacré, parfois longs de 1,5 m. Des moules géantes, mesurant jusqu'à 25 cm, *Calyptogena* et *Bathymodiolus*, comblent toutes les dépressions de la lave. Ces quatre espèces vivent directement du fluide hydrothermal.



Figure 4 : Quelques exemples de fumeurs noirs

1.4.2.2 Les bactéries hydrothermales productrices d'exopolysaccharides

Les sources hydrothermales sont majoritairement localisées au niveau des endroits tectoniquement actifs du fond de l'Atlantique et du Pacifique, mais des zones volcaniques actives existent aussi près des côtes. Une souche bactérienne halophile, thermotolérante (*Bacillus*

licheniformis) a été isolée sur les côtes des îles Eoliennes (Italie) (Maugeri *et al.*, 2002). Cette souche est particulièrement étudiée pour l'EPS qu'elle produit. La présence d'autres bactéries thermo-tolérantes productrices d'EPS a également été décrite sur ce site (Nicolaus *et al.*, 2000). Ces polysaccharides sont étudiés pour leurs propriétés rhéologiques et leur capacité à chélater certains métaux lourds. La résistance de ces bactéries aux métaux tels que le Cd^{2+} , le Zn^{2+} ou le Hg^{2+} en fait de bons candidats pour des applications environnementales, comme la récupération de métaux.

Le fluide hydrothermal des sources hydrothermales des grands fonds, mais aussi la faune et la flore associées à ces écosystèmes particuliers, contiennent de nombreuses bactéries (Prieur, 1997). Ces bactéries piezophiles ou piezo-tolérantes ne sont pas toutes symbiotiques et peuvent être mésophiles, thermophiles ou hyperthermophiles. Aux vues des conditions extrêmes dans lesquelles elles se sont développées : hautes pressions, gradients de températures et concentrations élevées d'éléments toxiques, de nombreux programmes de recherche ont vu le jour afin d'identifier et de caractériser les espèces endémiques. La nature de cet environnement et la présence de microorganismes inhabituels ont conduit les recherches vers la caractérisation d'enzymes thermostables, de métabolites possédant une activité biologique et d'exopolysaccharides. Différentes équipes ont pu cultiver des souches bactériennes en laboratoire, qui vivent habituellement dans ou autour des fumeurs noirs.

Ainsi l'IFREMER, qui a également exploré des sites hydrothermaux, a pu constituer une souchothèque. Elle a été réalisée à partir de prélèvements effectués sur des substrats naturels comme les sédiments, les roches, des fragments de cheminées, les fluides eux-mêmes, des tissus d'invertébrés ou à partir de surfaces artificielles immergées. Parmi plus de 1100 isolats, un premier criblage a permis d'identifier les souches productrices d'exopolysaccharides à pression atmosphérique et température ambiante (Talmont *et al.*, 1991; Lijour Y *et al.*, 1994; Vincent *et al.*, 1994; Raguénès *et al.*, 1996). Ces souches ont été sélectionnées sur la base de quatre tests de criblages différents : expression d'un phénotype mucoïde (Figure 5), mesures de viscosité lors de cultures en milieux liquides, fixation et coloration spécifique des exopolysaccharides, coloration négative à l'encre de chine. Les résultats ont montré 70 souches hétérotrophes, à Gram négatif capables de produire des exopolysaccharides dans ces conditions de culture.



Figure 5 : Culture en boîte de Pétri de souches mucoïdes.

A ce jour, près de 20 polymères présentant des caractéristiques physico-chimiques et/ou rhéologiques innovantes ont été décrits. Ces polysaccharides se caractérisent notamment par la présence de forte teneur en acides uroniques et de très hautes masses molaires ($>10^6$ g/mol). Une large majorité d'entre eux appartient au genre *Alteromonas* ou *Pseudoalteromonas*. Les études menées sur certains d'entre eux montrent l'extrême diversité structurale des EPS produits par ces bactéries.

Trois polymères issus de souches *Alteromonas* ont particulièrement été étudiés, ils ont été collectés pendant la campagne Hydronaut (HYD) en 1987 par le Nautille, à 13°N sur la dorsale Est Pacifique, à 2600 m de profondeur. Ils ont été prélevés sur un annélide polychète.

L'EPS produit par la souche HYD1545 fut le premier à être étudié. Il présente des caractéristiques rhéologiques intéressantes (Talmont *et al.*, 1991). Son unité répétitive semble constituée d'un trisaccharide d'acides uroniques mais sa structure n'a pas été entièrement élucidée (Vincent *et al.*, 1994).

Le second est produit par une souche *Alteromonas sp.* 1644. Sa structure partiellement déterminée (Dubreucq *et al.*, 1996) est présentée dans le Tableau 3. Son unité répétitive est un octasaccharide qui contient, un enchaînement de trois acides uroniques. Cette structure originale comprend également un nouveau résidu d'acide uronique : l'acide 3-O-[(R)-1-carboxyethyl]-D-

glucuronique. La souche 1644 produit un second polysaccharide lié à la paroi bactérienne 1644B (Samain *et al.*, 1997). Les propriétés rhéologiques en solution de l'EPS 1644, en présence de sels monovalents et de cations divalents tels que le calcium, ont été étudiées par Bozzi *et al.* (1996). Ce polymère possède un mécanisme et des propriétés rhéologiques originales, différentes de celles d'autres polysaccharides comme les pectines ou les carraghénanes.

L'EPS HYD721 produit par une bactérie *Pseudoalteromonas*, possède des propriétés viscosantes stables vis à vis du pH et de la force ionique (Rougeaux *et al.*, 1999a). Son unité répétitive est un octasaccharide possédant deux ramifications, l'une d'elles se termine par un mannose portant un groupement sulfate en position 3 (Tableau 3).

Lors de la campagne suivante Starmer (ST) en 1989, d'autres bactéries du genre *Alteromonas* ont été isolées toujours en vue de découvrir de nouvelles propriétés rhéologiques. L'EPS ST 716 est produit par une souche décrite comme une nouvelle sous-espèce de *Alteromonas macleodii* (*Alteromonas macleodii* subsp. *Fijiensis*) par Raguénès *et al.* (1996). Mais, en plus des propriétés texturantes, il s'avère beaucoup plus intéressant pour la chélation de métaux comme le plomb, le cadmium, ou le zinc (Loaec *et al.*, 1998). Sa structure, dont l'unité répétitive est un hexasaccharide (voir Tableau 3), possède, comme les EPS HYD1545 et HYD1644, un enchaînement de 3 acides uroniques (Rougeaux *et al.*, 1998). Il présente une ramification dont l'extrémité est un mannose, dont les positions 4 et 6 sont engagées dans une liaison de type acétalique avec un groupement pyruvate. Par ailleurs une étude a montré que ce polymère favorise l'adhésion cellulaire des ostéoblastes sur le verre. Des films constitués de cet EPS pourraient stimuler la recatrisation osseuse (Zanchetta *et al.*, 2001).

EPS	Souches	Structures	Références
1644	<i>Alteromonas</i>	$\rightarrow 4)-\alpha-D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)-\beta-D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-Galp-(1 \rightarrow ?)-3-O-[(S)-2-(1-Hydroxy)propyl]-D-Glcp-(1 \rightarrow$ $4 \uparrow$ $1 \uparrow$ $\beta-D-Glcp$ $4 \uparrow$ $1 \uparrow$ $\alpha\beta^2-D-Galp$ $3 \uparrow$ $3-O-Lac-\beta-D-GlcpA$	Dubreucq (1996)
HYD 721	<i>Pseudo- alteromonas</i>	$\rightarrow 4)-\beta-D-Mamp-(1 \rightarrow 4)-\beta-D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-Galp-(1 \rightarrow 4)-\beta-D-Glcp-(1 \rightarrow$ $2 \uparrow$ $1 \uparrow$ $\alpha-L-Rham$ $\beta-D-Galp$ $3 \uparrow$ $1 \uparrow$ $\beta-D-GlcpA$ $4 \uparrow$ $1 \uparrow$ $[SO_3H] \rightarrow 3-\beta-D-Mamp$	Guezennec (1994) Rougeaux (1999a)
HE 800	<i>Vibrio diabolicus</i>	$\rightarrow 3)-\beta-D-GcpNAc-(1 \rightarrow 4)-\beta-D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)-\beta-D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-GalpNAc-(1 \rightarrow$	Rougeaux (1996) Rougeux (1999b)
ST 716	<i>Alteromonas macleodii</i>	$\rightarrow 4)-\beta-D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-\alpha-D-Galp-(1 \rightarrow$ $3 \uparrow$ $1 \uparrow$ $\alpha-D-GlcpA$ $3 \uparrow$ $1 \uparrow$ $\beta-D-GlcpA$ $4 \uparrow$ $1 \uparrow$ $4,6-Pyr-\beta-D-Mamp$	Raguénès (1996) Rougeaux (1998)

Tableau 3 : Différents EPS issus du milieu hydrothermal profond ont fait l'objet d'études physico-chimiques et structurales

1.4.3. Les biopolymères issus de la modification des exopolysaccharides marins

La modification des EPS comme celle des polysaccharides est en général indispensable à la caractérisation structurale de tels polymères. La dépolymérisation par voie acide est largement utilisée pour diminuer leur viscosité et pour l'analyse de leur structure. Mais, sur la base de la connaissance essentielle de l'unité répétitive, des études ont été envisagées en vue de conférer des activités biologiques aux EPS par modifications chimiques. Cette approche a largement été utilisée sur des homopolymères neutres comme les dextrans ou les pullulanes pour obtenir des dérivés d'intérêt biologique. Très peu d'études ont été réalisées sur des EPS possédant une structure originale:

Le GY785 est produit par la souche *Alteromonas infernus* isolée lors de la campagne Guaynaut en 1991 (Raguénès *et al.*, 1997b). Il est composé de 50% d'acides uroniques et 50% d'oses neutres et sa masse molaire est de 10^6 g.mol⁻¹. La structure de ce polymère apparaît très complexe au regard des études préliminaires (Guezennec *et al.*, 1998). Après sulfatation et dépolymérisation, ce polymère possède une activité anticoagulante inférieure à celle de l'héparine (Collic Jouault *et al.*, 2001). Cette nouvelle utilisation des EPS conduit naturellement à la recherche de structures originales qui pourraient convenir avec ou sans modifications à une utilisation thérapeutique.

Le HE 800 est un EPS exceptionnel à plusieurs titres: tout d'abord, il est produit par une souche du genre *Vibrio* : *Vibrio diabolicus* (Raguénès *et al.*, 1997a) contrairement aux EPS précédemment cités qui sont produits par des *Alteromonas* et des *Pseudomonas*. Il n'a que très peu de pouvoir viscosant probablement à cause de sa taille relativement réduite (800 000 g.mol⁻¹ contre 5.10^6 g.mol⁻¹ pour le 1644 par exemple). Mais, son unité tétrasaccharidique est connue et représentée dans le Tableau 3. Sa structure est linéaire, constituée de 50 % d'acides uroniques et de 50% d'hexosamines (Rougeaux *et al* 1999b). Le HE800 est un EPS qui possède naturellement une structure comparable aux glycosaminoglycans produits par les eucaryotes.

Des dérivés biologiquement actifs peuvent être obtenus à partir des EPS modifiés. La diversité et l'originalité des caractéristiques structurales de ces polysaccharides combinées aux modifications chimiques, représentent un extraordinaire potentiel de molécules bioactives. L'expérience de la production du xanthane ou des dextrans montre qu'il est possible d'obtenir

des EPS de façon constante, contrôlée et que la commercialisation de tels procédés est réalisable. Les EPS peuvent donc être considérés comme une nouvelle source de biopolymères d'intérêt thérapeutique et présentant peu de risques au regard de leurs origines.

2. Etude structurale de l'EPS GY785 produit par la bactérie *Alteromonas infernus*

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Obtention et purification de l'EPS GY785 natif

La souche bactérienne utilisée pour cette étude a été isolée pendant la campagne Guaynaut (1991) sur le bassin de Guaymas dans le golf de Californie (27°01'N, 111°24'W). C'est lors de cette expédition que des échantillons d'eau de mer prélevés près des sources hydrothermales, ont permis d'isoler la souche GY 785 appartenant à une nouvelle espèce du genre *Alteromonas* (*Alteromonas infernus*), (Raguénès *et al.*, 1997b). Après la caractérisation de la souche, différents micro-tubes ont été réalisés et conservés à – 80°C de façon à constituer une banque primaire. Cette souche a été classée comme non pathogène par l'Institut Pasteur.

2.1.1.1 Production et isolement de l'EPS GY 785 natif

La pré-culture de la souche est effectuée à partir des micro-tubes de la banque sur un milieu marin synthétique 2216 E contenant 4 g.l⁻¹ de tryptones (Biokar), 1 g.l⁻¹ d'extrait de levure et 30 g.l⁻¹ de sel d'aquarium (Instant océan), supplémenté de 30 g.l⁻¹ de glucose pendant 48h.

La production de l'EPS est réalisée dans un fermenteur de 2 litres (Discovery NBS), contenant du milieu précédant selon la procédure de Vincent *et al.* (1994). Le fermenteur est inoculé par 100 ml d'une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance. Le pH est ajusté et régulé à 7.2 par addition de soude ou d'acide chlorhydrique 1 N au moyen de pompes péristaltiques. Le milieu est aéré à 50 l.h⁻¹ d'air sous agitation (350 à 450 r/min) pendant toute la durée de la culture. Des prélèvements sont effectués au cours de la fermentation. La croissance bactérienne est suivie en mesurant à 520 nm la densité optique du milieu de culture prélevé. La viscosité est également contrôlée tout au long de la culture par un viscosimètre (Brookfield). La fermentation est arrêtée après deux à trois jours lorsque la viscosité du milieu a atteint environ 50 cps et reste stable.

2.1.1.2 Purification de l'EPS GY 785 natif

Le moût de culture est dilué avec de l'eau milli-Q afin de diminuer la viscosité. Les bactéries sont éliminées par centrifugation à 20 000 g pendant deux heures à 4°C. Le surnageant de culture est filtré sur des membranes de cellulose de porosité décroissante (de 2.6 µm à 0.45 µm). Les polysaccharides contenus dans le surnageant sont ensuite précipités par ajout de NaCl (20 g.l⁻¹) et addition de 40 ml d'éthanol absolu à 4°C pour 40 ml de culture. Le précipité est ensuite lavé sur filtre fritté, avec des mélanges successifs eau/éthanol (v/v) à 70, 80, 90, et 100 % en éthanol. Le polysaccharide ainsi obtenu (dénommé par la suite EPS GY785 natif) est remis en solution dans de l'eau milli-Q et ultra-filtré sur un système Minisette (Filtron) équipé d'une membrane de 100 KDa jusqu'à ce que la conductivité du perméat soit stable. Le rétentat est ensuite congelé à -20°C et lyophilisé.

2.1.2. Dosage et identification des résidus glycosidiques

2.1.2.1 Composition globale

Les teneurs en oses totaux, en oses acides et en protéines ont été déterminées par des méthodes colorimétriques. Le taux de sulfate a été déduit du pourcentage de soufre déterminé par analyse élémentaire au service de microanalyse du CNRS de Gif/Yvette.

– Détermination de la teneur en oses totaux

Principe

Cette méthode mise au point par Tilmans *et al.* (1929) et modifiée par Rimington, (1931) emploie l'orcinol sulfurique comme réactif. L'acide sulfurique concentré provoque l'hydrolyse de toutes les liaisons osidiques et une déshydratation des monosaccharides libérés pour donner des dérivés de furfural. Les acides uroniques sont également détectés avec ce dosage,

l'introduction d'un terme de correction issu du dosage des acides uroniques s'avère nécessaire pour estimer la quantité d'oses neutres présents.

Réactifs

- Solution d'orcinol sulfurique à 2 g.l⁻¹ dans H₂SO₄ concentré (conservé à 2°C).

Dosage

Dans des tubes en verre brûlés sont introduits 200 µl de la solution à doser renfermant au maximum 50 µg d'oses totaux, et 1 ml de la solution d'orcinol. Les tubes sont agités au vortex puis maintenus 15 min dans un bain-marie à 80°C. Ils sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 45 min. L'absorbance de chaque solution est mesurée à 420 nm. Le dosage est réalisé par rapport à des solutions étalons allant de 0 à 50 µg de glucose.

- **Dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz *et al.* (1973) modifiée par Filisetti-Cozzi *et al.* (1991)**

Principe

Les acides uroniques réagissent avec le *méta*-hydroxydiphenyl, le produit développe une coloration rose lue à 525 nm. La coloration est améliorée en présence de borate, mais la réaction colorimétrique est sensible aux interférences dues aux sucres neutres qui brunissent en présence d'acide sulfurique. Cette interférence est minimisée par traitement de l'échantillon avec du sulfamate avant l'hydrolyse acide.

Réactifs

- Solution de sulfamate de potassium 4 M à pH 1.6, réalisée en dissolvant 7.76 g d'acide sulfamique dans 10 ml d'eau distillée, le pH est ensuite ajusté à l'aide de KOH 1 M avant de compléter la solution à 20 ml
- Solution de tétraborate de sodium 75 mM dans l'acide sulfurique concentré

➤ Solution de *mé*ta-hydroxydiphényl (MHDP) à 0.15 % dans NaOH 0.5 % (conservé à 4°C)

Dosage

Dans des tubes en verre brûlés, à 400 µl de solution à doser contenant 50 à 100 µg d'acides uroniques sont ajoutés 40 µl de la solution de sulfamate de potassium, puis 2.4 ml de solution sulfurique de tétraborate de sodium. Les tubes sont agités au vortex puis maintenus 20 min dans un bain-marie à 80°C. Après refroidissement dans un bain de glace, suivi de l'addition de 80 µl de solution de MHDP, les tubes sont agités puis laissés au repos 10 min. L'absorbance de chacune des solutions est mesurée à 525 nm. Le dosage est également réalisé sur 400 µl de solutions témoins contenant de 0 à 50 µg d'acide glucuronique.

– Dosage des protéines selon la méthode du BCA d'après Lowry *et al.* (1951)

Principe

En milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivriques Cu^{++} en ions cuivreux Cu^{+} qui forment un complexe avec l'acide bicinchoninique (BCA) coloré en pourpre.

Réactifs

- Solution d'acide bicinchoninique (BCA)
- Solution 4% (w/v) de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Solution standard de protéine 1mg/ml

Dosage

Le réactif est préparé de façon extemporanée en ajoutant 50 ml de réactif BCA et 1ml de solution de CuSO_4 . A 100 µl de l'échantillon à doser sont ajoutés 2 ml de réactif dans un tube en verre brûlé. Le mélange est agité au vortex et placé 30 minutes dans un bain-marie à 37 °C. Il est ensuite refroidi sous l'eau courante. L'absorbance de chacune des solutions est mesurée à

562 nm. L'étalonnage est réalisé en faisant une gamme de 0 à 0.5 mg.ml⁻¹ de la solution standard de protéines.

– Identification et dosage des acides gras

Principe

Une méthylation des acides gras éventuellement présents dans les fractions polysaccharidiques est réalisée par estérification en présence de méthanol et d'acide sulfurique (Christie, 1989). Les acides gras méthylés sont ensuite identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse (GC/MS) et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID).

Matériel

- Méthanol sulfurique (MeOH/H₂SO₄ 2% v/v)
- Pentane (Carlo Erba)
- Bain à sec à 50°C

Protocole

10 mg (ou 20 mg si le pourcentage de lipide est faible) du polysaccharide brut après lyophilisation sont dissous dans 5 ml de MeOH/H₂SO₄ dans un tube en verre brûlé. Le mélange est agité au vortex (la dissolution peut ne pas être complète) et chauffé 16h à 50°C dans un bain à sec. Le tube doit être fréquemment agité.

La solution est ensuite refroidie (la fraction polysaccharide reste insoluble). 1 ml d'eau milli-Q et 2 ml de pentane sont ajoutés successivement. La phase organique (supérieure) est prélevée et directement injectée :

- Soit en chromatographie en phase gazeuse (Agilent 6890 Series) couplée à un spectromètre de masse (Agilent 5973 Masse selective detector). L'analyse des acides gras méthylés est effectuée sur une colonne de type CP SIL 5 CB MS, la programmation en

température est la suivante : température initiale de 80°C, puis 30°C/min jusqu'à 170°C et 3°C/min jusqu'à 295°C.

- Soit en chromatographie en phase gazeuse (Perkin Elmer) pour la quantification. L'analyse est réalisée sur une colonne apolaire (BPX 70, SGE), la programmation en température est la suivante : 2 min à 50°C, 20°C/min jusqu'à 150°C, puis 1.5°C/min jusqu'à 230°C.

Détermination de la teneur en groupement sulfates.

La teneur en soufre a été mesurée par microanalyse élémentaire au Service de microanalyse Centre National de la Recherche Scientifique à GIF SUR YVETTE.

– Dosage à l'Azure A

Principe

L'azure A est un colorant qui se lie avec les polysaccharides sulfatés tels que l'héparine, les chondroïtines sulfates et les fucanes. La coloration violette est semi-quantitative, donnant un ordre de grandeur (micro grammes) de la concentration d'un échantillon (Jaques *et al.*, 1968).

Matériel

- Dextrane sulfate 5000 - Sigma D6001 ou Dextrane sulfate 500 000 (Sigma)
- Azure A (C.I. 52005) – (Sigma)

Protocole

Une solution d'azure A à 10 µg/ml est préparée en dissolvant 100 mg d'azure A dans 100 ml d'eau milli-Q. Cette solution est diluée au centième pour obtenir la concentration finale de 10 µg/ml qui peut être stockée 2 mois à 4°C. Une solution mère de l'échantillon à 10 mg/ml

est réalisée et diluée pour obtenir une concentration finale en polysaccharide sulfaté de 0 à 50 µg/ml. Le dosage est réalisé de la façon suivante :

50 µl de l'échantillon à doser sont déposés dans des cuves plastiques d'1 ml, 1 ml d'azure A à 10 µg/ml est ajouté, puis la DO est lue à 535 nm. L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une série de dilutions de la solution de Dextrane sulfate entre 0 et 50 µg/ml. Les étalons sont traités comme les échantillons.

2.1.2.2 Caractérisation des résidus glycosidiques

– Analyse des résidus glycosidiques sous forme de dérivés triméthylsilylés

Principe

Après leur libération lors de la méthanolyse du polysaccharide, les résidus glycosidiques sont transformés en méthylglycosides *O*-triméthylsilylés (éventuellement *N*-acétylés) selon la méthode de Kamerling *et al.* (1975) modifiée par Montreuil *et al.* (1986). Leur analyse en chromatographie en phase gazeuse (GC) permet de déterminer la composition en monosaccharides du polymère. L'identification des oses neutres et des acides uroniques est réalisée lors de la même injection par comparaison des temps de rétentions relatifs à l'étalon interne. Un coefficient de réponse propre à chaque résidu est également appliqué pour quantifier chaque monosaccharide

Matériel

- Standards monosaccharides : Glucose, galactose, rhamnose, acide glucuronique, acide galacturonique (Sigma)
- H₂O milli-Q
- Kit méthanol chlorhydrique 0.5 N et 3N (Supelco)
- *Myo*-inositol (= mesoinositol) (Sigma)
- Anhydride acétique (MERCK)
- Carbonate d'argent (Aldrich)

- Pyridine anhydre (Sigma)
- Bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide : triméthylchlorosilane (BSTFA : TMCS) 99 : 1 (Sylon BFT, Supelco)
- Dichlorométhane 99.9 % (Aldrich)

Mode opératoire

A 200 µg de polysaccharide lyophilisé en présence de 20 µg de *myo*-inositol utilisé comme étalon interne, sont ajoutés 500 µl de MeOH/HCl 1.8 N (préparés en mélangeant 5 ml de méthanol chlorhydrique 0.5 N et 6 ml de méthanol chlorhydrique 3 N). Les tubes en verre, préalablement brûlés sont hermétiquement fermés puis, placés dans un bain à sec réglé à 100°C pendant 4 heures. Après refroidissement du méthanolysat, le pH est ajusté à 6-7 à l'aide de carbonate d'argent. Les osamines éventuellement présentes sont *N*-acétylées par addition de 50 µl d'anhydride acétique. Après une nuit à l'obscurité à température ambiante, le chlorure d'argent formé est éliminé par centrifugation (3000 rpm, 10 mn) puis le surnageant est évaporé à sec sous jet d'azote.

Les méthylglycosides sont triméthylsilylés (méthylglycosides-TMS) dans 50 µl de pyridine auxquels sont ajoutés 50 µl de Sylon, à température ambiante pendant 2 heures. Après évaporation sous jet d'azote des réactifs en excès, les méthylglycosides-TMS sont repris dans 500 µl de dichlorométhane. L'injection de 1 µl de cette solution est réalisée en "on column" sur un chromatographe 5890 serie II (Hewlett Packard) avec passeur automatique, équipé d'un détecteur FID, d'une colonne capillaire apolaire en silice fondue CP-Sil5CB (Chrompack) et relié à un intégrateur informatique HP 3365 (Hewlett Packard). La pression du gaz vecteur (hélium) est de 100 KPa et la température du détecteur est de 300°C.

Les méthylglycosides-TMS sont ensuite identifiés par chromatographie en phase gazeuse avec le programme de montée en température du four suivant : 50°C maintenus pendant 1 minute, puis un gradient de 20°C/min jusqu'à 120°C ,suivi d'un gradient de 2°C/min jusqu'à 240°C, puis 10°C/min jusqu'à 280°C, cette température est maintenue pendant 10 min.

- **Dosage quantitatif des monosaccharides par chromatographie d'échange d'ions.**

Principe

La séparation et l'identification des oses neutres par chromatographie d'échange d'ions analytique à été réalisée d'après la méthode décrite par Mopper *et al.*, (1992). Cette technique permet de doser les monosaccharides en solution. En ce qui concerne les oses neutres d'un polysaccharide, une hydrolyse acide permet leur libération. Les sucres sont séparés en milieu alcalin sur résine échangeuse d'anions et détectés en ampérométrie pulsée. Les sucres en milieu basique sont ionisés et fortement réducteurs, ils peuvent être ainsi séparés et quantifiés avec une bonne résolution.

La méthode et le principe sont détaillés par Mopper, seul le mode opératoire est rappelé ici. Il convient de souligner que les échantillons doivent être dessalés pour éviter une désactivation rapide de la colonne. La méthode est très sensible mais la réponse n'est pas complètement linéaire sur ce matériel, La linéarité et la reproductibilité sont bonnes pour des concentrations comprises entre 1 et 10 μM .

Matériel

- Acide sulfurique 96%
- 2-deoxygalactose (Sigma)
- Résine échangeuse de cations Dowex HCR-S (Sigma)
- NaOH 40%

Mode opératoire

Hydrolyse

L'hydrolyse se fait à chaud en présence d'un acide fort. 4.5 ml de l'échantillon sont placés dans un tube en verre brûlé, ensuite, 250 μl d'acide sulfurique sont ajoutés. Le tube est fermé bien hermétiquement et le mélange est chauffé 3h30 à 100°C dans un bain à sec. Après refroidissement, 5.15 ml d'eau milli-Q sont ajoutés avec 100 μl d'une solution de 2-

déoxygalactose qui sert d'étalon interne et dont la concentration doit être choisie pour être dans la gamme après dilution.

Neutralisation des échantillons

Après refroidissement de la solution, celle-ci est diluée 100 à 1000 fois selon les échantillons et la neutralisation est réalisée en ajoutant une pointe de spatule de résine HCR-S sous forme HCO_3^- . Les tubes sont agités 1h à température jusqu'à l'obtention de la neutralité du pH. Pour les échantillons plus dilués, la neutralisation est effectuée avec du CaCO_3 sans dilution.

Préparation de l'éluant

Une solution aqueuse de soude (17.5 mM) est préparée dans un ballon de 2 litres, rincé plusieurs fois à l'eau Milli-Q. L'oxygène et le gaz carbonique de l'eau éventuellement dissous dans l'eau sont éliminés par bullage d'hélium avant l'addition de la soude et durant toute la durée des séparations.

Dosage

80 μl de l'échantillon sont injectés sur une colonne Carbopak PA1 (Dionex). L'élution à la solution de soude est réalisée à l'aide d'une pompe Merck à 1 ml/min. Le détecteur (ampérométrie pulsée) en sortie de colonne est un Albedo 100 relié à un intégrateur informatique équipé du logiciel Kontron 2000. Le potentiel E1 est choisi de façon à générer une réponse maximale et peut légèrement varier suivant l'état de l'électrode.

Les potentiels de détection typiquement utilisés sont les suivants :

$$E1 = 0.4 \text{ V}$$

$$T1 = 100 \text{ cycles (soit 2s)}$$

$$E2 = 0.6 \text{ V}$$

$$T2 = 30 \text{ cycles}$$

$$E3 = -0.20\text{V}$$

$$T3 = 27 \text{ cycles}$$

La sensibilité du détecteur est fixée sur $1\mu\text{A}$. Il est préférable de diluer les échantillons trop concentrés au lieu de diminuer la sensibilité du détecteur.

2.1.3. Détermination de la nature des liaisons osidiques

2.1.3.1 Technique de méthylation des oses neutres.

Principe de la méthylation

La position des liaisons glycosidiques est déterminée par analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse (GC/MS) des acétates d'alditols partiellement méthylés (PMAA). Le principe de cette technique consiste à méthyler les fonctions hydroxyles libres en milieu basique par l'iodure de méthyle, puis à hydrolyser le polysaccharide méthylé afin de libérer les fonctions hydroxyles engagées dans des liaisons glycosidiques (Figure 7). L'analyse des oses partiellement méthylés formés permet de déterminer les sites de liaison. Ceci est fait par GC/MS après réduction (transformation en alditol) et acétylation. Lorsque des acides uroniques sont présents, leurs fonctions carboxyles sont réduites après l'étape de méthylation.

La technique de méthylation utilisée est une modification de la méthode d'Hakomori, (1964). Elle emploie comme base le carbanion du méthylsulfinyl de lithium (Blakeney *et al.* 1983), issu de l'action du butyllithium (BuLi) sur le diméthylsulfoxyde (DMSO) :



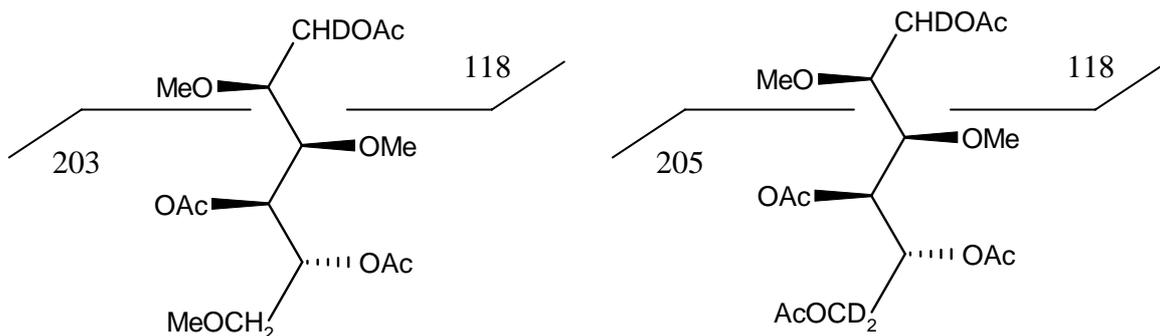
La mise sous forme acide du polysaccharide grâce à l'utilisation d'une résine échangeuse de cations vise à faciliter sa solubilisation dans le diméthylsulfoxyde.

Le carbanion est formé *in situ* grâce à l'addition directe du BuLi sur le polysaccharide dissous dans le DMSO (Kvernheim, 1987). Les composés méthylés sont isolés et purifiés de tout composé polaire grâce à une extraction en phase solide par chromatographie en phase inverse (Waeghe *et al.*, 1983).

La fragmentation des PMAA en spectrométrie de masse est insensible aux différences stéréochimiques. La chromatographie en phase gazeuse permet de distinguer les dérivés des résidus de même nature (hexoses, pentoses, déoxyhexoses...) qui ne possèdent pas les mêmes

temps de rétention relatifs. En revanche la fragmentation de chaque type de PMAA est caractéristique de la position des groupements méthyle et acétyle.

Le spectre de masse issu de la fragmentation de chaque PMAA permet de localiser les groupements méthyles et acétyles et d'en déduire pour le résidu correspondant la position des carbones engagés dans les liaisons glycosidiques (Figure 6). Dans le cas particulier d'un résidu d'hexose lié en position 6 ou d'un résidu de pentose lié en position 5, la réduction deutérée des résidus glycosidiques en acétates d'alditols élimine toute symétrie structurale en différenciant le carbone anomérique de celui du groupement hydroxyle primaire non méthylé. Les liaisons dues à d'éventuelles substitutions par différents groupements peuvent également être mises en évidence lorsque ces derniers résistent à la procédure de méthylation.



1,4,5-Tri-O-acétyl-1-deuterio
-2,3,6-tri-O-méthyl-D-glucitol
dérivé d'un →4)-Glc_p

1,4,5-Tri-O-acétyl-1-deuterio-6-
dideuterio-2,3,6-tri-O-méthyl-D-glucitol
dérivé d'un →4)-Glc_pA

Figure 6 : Schémas de fragmentation d'acétates d'alditols partiellement méthylés.

Les liaisons engageant des acides uroniques sont identifiées par cette méthode lorsque leurs groupements carboxyliques sont réduits. Cette réduction intervient entre les étapes de

méthylation et d'hydrolyse, l'utilisation d'un agent deutéré permet alors de différencier les acides uroniques des oses neutres correspondants.

Réactifs

- Résine échangeuse de cations Dowex 50W x 8, forme hydrogène (Biorad)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) anhydre.
- BuLi 2,5 M dans l'hexane (Aldrich) .
- Iodométhane (MeI) (Merck)
- Résine de phase inverse : Cartouches Sep Pak LC₁₈ (Supelco)
- Acétonitrile (Carlo Erba)
- Acide trifluoroacétique (TFA) 2 N
- Hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) (Sigma)
- Borodeutérure de sodium (NaBD₄) (Sigma)
- Acide acétique glacial
- Solution de méthanol : acide acétique 9 : 1 (v/v)
- Méthanol (Carlo Erba)
- Pyridine (Sigma)
- Anhydride acétique (Ac₂O) (Sigma)
- Dichlorométhane 99.9 % (Aldrich)

Mode opératoire

Le schéma de la réaction est présenté sur la Figure 7.

Préparation du polysaccharide

Une solution aqueuse contenant environ 2 mg de polysaccharide est déposée sur une colonne de 2 ml (pipette Pasteur) chargée en résine Dowex dans l'eau. L'échantillon est élué avec de l'eau puis lyophilisé, le polysaccharide est ainsi mis sous forme acide.

Méthylation

Les 2 mg de polysaccharide sous forme acide sont dissous dans 500 µl de DMSO anhydre, sous agitation magnétique dans un tube en verre brûlé hermétique. Lorsque la

dissolution est complète, le tube est refroidi dans un bain de glace, puis 500 µl de BuLi sont ajoutés doucement. L'agitation est poursuivie 3 heures à température ambiante (T.A.).

Le tube est une nouvelle fois refroidi dans un bain de glace, puis 500 µl d'iodométhane sont lentement ajoutés. L'agitation est maintenue une nuit à température ambiante.

La méthylation est arrêtée avec l'addition de 1 ml d'eau. L'échantillon est alors placé sous jet d'azote afin d'éliminer l'agent méthylant en excès, c'est à dire jusqu'à l'obtention d'une phase inférieure limpide.

Extraction et lavage du polysaccharide méthylé.

Une cartouche Sep Pak LC₁₈ est préparée par l'élution de 8 ml d'acétonitrile puis de 8 ml d'eau. L'échantillon est déposé sur la colonne ainsi conditionnée, et lavé avec 8 ml d'eau. Il est ensuite élué avec 2 à 3 ml d'acétonitrile, qui sont évaporés sous jet d'azote.

La réduction des acides uroniques peut être réalisée à cette étape.

Hydrolyse

500 µl de TFA 2 N sont ajoutés à l'échantillon ainsi que 20 µl d'une solution de *myo*-inositol (1 mg/ml) utilisée comme référence interne. Puis le tube est fermé et placé dans un bain à sec porté à 120°C pendant 2 heures. L'acide est ensuite évaporé sous azote.

Réduction

L'échantillon est dissout dans 1 ml d'eau puis 2 gouttes de NH₄OH sont ajoutées ainsi qu'une pointe de spatule de NaBD₄. La solution est agitée au vortex puis portée à 80°C pendant 30 minutes. Après refroidissement du tube, de l'acide acétique glacial est additionné goutte à goutte jusqu'à l'arrêt de l'effervescence.

Les agents réducteurs sont alors éliminés par 3 co-distillations avec le mélange méthanol:acide acétique suivies de 3 co-distillations avec du méthanol.

O-acétylation

100 μ l de pyridine et 100 μ l d'anhydride acétique sont ajoutés à l'échantillon. Le tube est hermétiquement fermé puis porté à 120°C pendant 30 min. Après refroidissement et évaporation des réactifs en excès sous jet d'azote, les acétates d'alditol partiellement méthylés sont repris dans 1 ml de dichlorométhane. Si la solution est trouble ou possède un dépôt, il est possible de procéder à 3 rinçages à l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau.

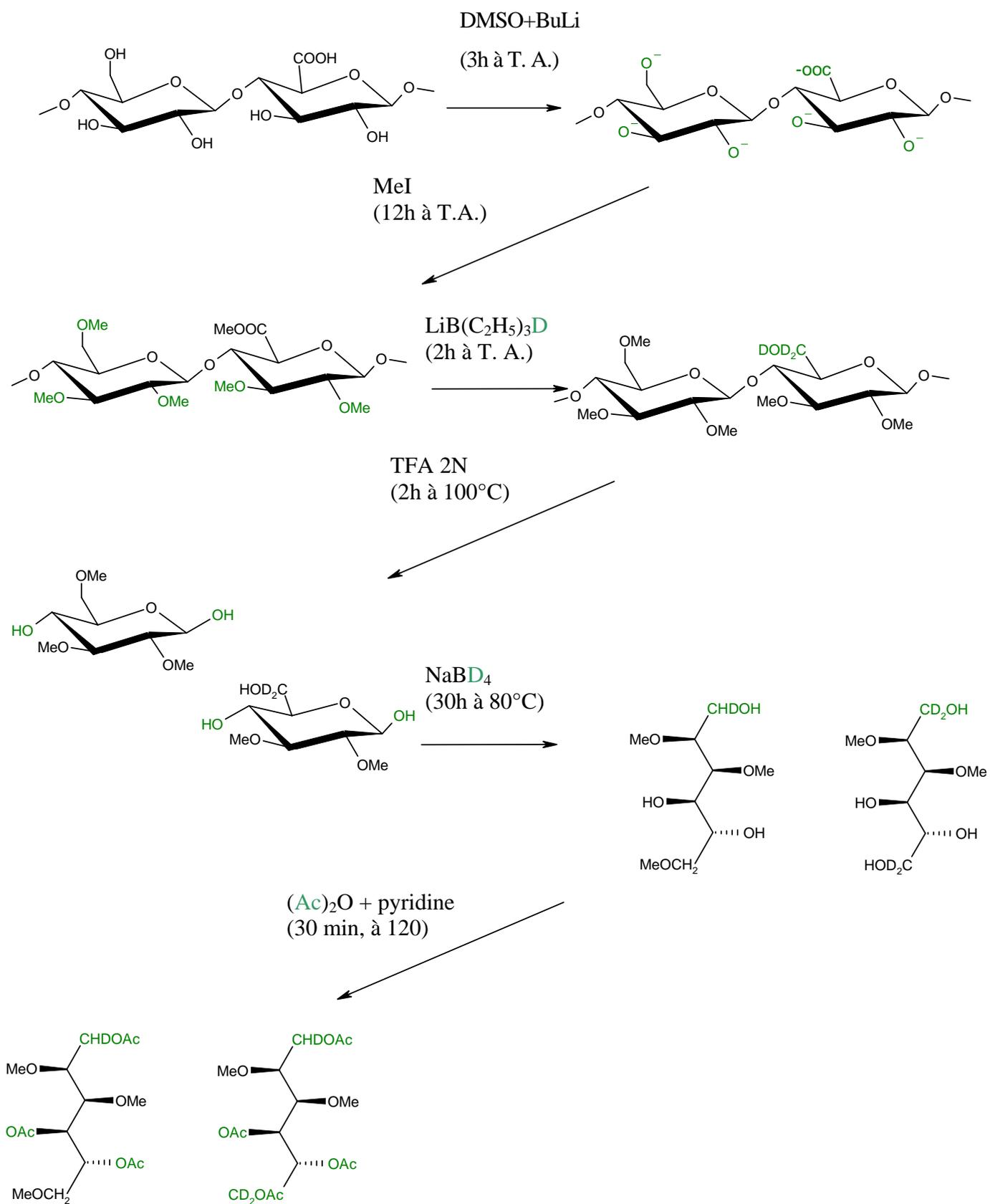


Figure 7 : Préparation des acétates d'alditols partiellement méthylés

2.1.3.2 Technique de méthylation avec réduction des acides uroniques

Principe

Les groupements carboxyliques des acides uroniques estérifiés lors de la méthylation sont réduits par le triéthylborodeutéride de lithium ("Superdeuteride") qui permet l'introduction de deux atomes de deutérium (York *et al.*, 1985).

Réactifs

- Solution de triéthylborodeutéride de lithium dans le tétrahydrofurane (THF) "Superdeuteride" ($\text{LiB}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$), (Aldrich)
- Acide acétique glacial
- Solution d'éthanol : eau 1 : 1 (v/v)
- Résine échangeuse de cations Dowex 50W x 8, forme hydrogène (Biorad)
- Tous les réactifs utilisés pour la procédure de méthylation

Mode opératoire

Le polysaccharide est méthylé, il est ensuite extrait et lavé selon la procédure précédemment décrite. Après évaporation de l'acétonitrile, l'échantillon est repris dans 250 μl de "Superdeuteride", agité, puis laissé à température ambiante pendant 2 heures.

La réduction est arrêtée par l'addition d'acide acétique glacial goutte à goutte répétée jusqu'à ce que l'effervescence cesse. Les réactifs sont alors évaporés sous jet d'azote.

L'échantillon est repris dans 1 ml de solution éthanol:eau, puis déposé sur une colonne de 2 ml contenant la résine Dowex préalablement lavée avec le même mélange. Il est élué avec 2 ml de la solution éthanol : eau. Les solvants sont ensuite évaporés sous jet d'azote.

La procédure de méthylation est alors poursuivie avec les étapes d'hydrolyse, de réduction et d'acétylation.

2.1.4. Détermination de la séquence glycosidique.

2.1.4.1 Dégradation des acides uroniques par le lithium dans l'éthylène diamine

Principe

Le traitement des polysaccharides acides par le lithium dans l'éthylène diamine provoque la destruction des résidus d'acides uroniques laissant intactes les liaisons entre les oses neutres. Cette réaction est basée sur le pouvoir réducteur du métal en solution dans une alkylamine vis à vis des fonctions carboxyliques (Smith *et al.*, 1967). Ce traitement conduit à la libération de monosaccharides ou d'oligosaccharides sous forme réduite ou non réduite. Une réduction au borohydrure de sodium permet de rendre le produit formé homogène et stable. Cette réaction est adaptée des conditions de Fransen *et al.*, (2000).

Réactifs

- Résine échangeuse de cations Dowex 50W x 8, forme hydrogène (Biorad)
- Résine Dowex HCR-S, forme H⁺ ou Na⁺ (Sigma)
- Ethylène diamine (1,2-diaminoéthane) (Sigma)
- Lithium dans l'hexane (Acros)
- Toluène (Carlo Erba)
- Acide acétique glacial (Carlo Erba)
- Borohydrure de sodium (NaBH₄) (Sigma)

Mode opératoire

Une solution aqueuse contenant 20 mg de polysaccharide est déposée sur une colonne de 10 ml chargée en résine Dowex 50W dans l'eau. L'élution est réalisée avec de l'eau, et le pH de la solution est aussitôt ajusté à 6.5 avec de l'éthylène diamine. Puis la solution obtenue est lyophilisée.

4 ml d'éthylène diamine sont introduits avec précaution dans un tube en pyrex de 20 ml contenant le polysaccharide obtenu ainsi qu'un barreau aimanté. La solution est agitée jusqu'à complète dissolution.

De toutes petites particules de lithium sont préparées et déposées dans un Becher contenant de l'hexane. Elles sont ajoutées doucement une à une dans la solution de polysaccharide dans l'éthylène diamine jusqu'à l'obtention d'une couleur bleu intense persistant sous agitation. La couleur est maintenue durant 30 min avec l'addition de lithium.

La solution est ensuite refroidie dans un bain de glace, puis 5 ml d'eau sont ajoutés. Le tube est agité doucement jusqu'à complète dissolution. La solution claire est transférée dans un ballon de 100 ml et additionnée de 25 ml de toluène. L'eau et l'éthylène diamine sont évaporés par entraînement avec le toluène à l'évaporateur rotatif, jusqu'à l'obtention d'une poudre blanche. Le ballon est refroidi dans un bain de glace, puis 7 ml d'eau sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 4-4,5 avec de l'acide acétique glacial, puis la solution est déposée sur une colonne de résine HCR-S / forme H⁺. L'élution est réalisée avec de l'eau. La solution est ensuite récupérée et les produits sont réduits avec 20 mg de NaBH₄ 2h30 à température ambiante. Le NaBH₄ en excès est détruit par addition de résine HCR-S /forme H⁺ jusqu'à la fin de l'effervescence, le pH doit rester neutre. Les produits réduits sont ensuite convertis sous forme de sel de sodium par passage sur une colonne chargée en résine HCR-S / forme Na⁺, congelé à - 20°C puis lyophilisé.

2.1.4.2 Cinétique d'hydrolyse

Principe

L'hydrolyse acide permet, par la rupture des liaisons osidiques la libération des monosaccharides présents dans un polysaccharide. La quantification des monosaccharides libérés a été réalisée par chromatographie d'échange d'ions analytique décrite dans le paragraphe 2.1.2.2. pour différents temps d'hydrolyse.

Réactifs

- Acide sulfurique (H₂SO₄) 18 N
- Carbonate de calcium (CaCO₃) (Prolabo)
- Bain d'huile

Mode opératoire

100 mg de l'EPS GY785 natif sont dissous dans 20 ml d'eau milli-Q à 90°C, puis 1 ml d' H_2SO_4 concentré est ajouté de façon à ajuster la solution à 2 N H_2SO_4 . Des prélèvements de 50 μl sont effectués toutes les 15 min pendant 5 h. Chaque prélèvement est dilué avec 950 μl d'eau milli-Q puis le pH est ajusté à 7 avec une pointe de spatule de CaCO_3 . La solution est ensuite centrifugée 10 min à 3000 rpm, le surnageant est récupéré pour la quantification des monosaccharides libérés par chromatographie d'échange d'ions analytique.

2.1.4.3 Préparation d'oligosaccharides réduits et non réduits à partir de l'EPS natif

Principe

Toutes les liaisons glycosidiques ne sont pas également sensibles à l'hydrolyse acide. En particulier celles liant un acide uronique à un autre ose, sont difficiles à hydrolyser. Une hydrolyse acide, réalisée dans des conditions moins sévères que celles utilisées pour une hydrolyse totale, permet de préparer des oligosaccharides enrichis en acides uroniques. Les fragments de séquences ainsi générés sont de structures plus simples que celle du polysaccharide natif. A priori, il est difficile de connaître les conditions appropriées, aussi deux expériences différentes ont-elles été réalisées avec des températures différentes et des temps d'hydrolyses différents.

Réactifs

- Acide sulfurique (H_2SO_4) 2 N
- Carbonate de calcium (CaCO_3) (Prolabo)
- Borohydrure de sodium (NaBH_4) (Sigma)
- Acide acétique glacial
- Résine échangeuse de cations Dowex HCR-S / forme H^+ et Na^+ (Sigma)

Mode opératoire

Préparation de l'oligosaccharide H-GY785red

500 mg de l'EPS GY785 sont dissous et hydrolysés dans 250 ml d'acide sulfurique 2 N à 85°C pendant 3h30 dans un bain d'huile sous agitation magnétique. Après refroidissement, l'acide est neutralisé par précipitation des ions sulfates par du carbonate de calcium. 25,8 g de CaCO₃ sont ajoutés à l'hydrolysate afin d'obtenir un pH de 7. La solution est ensuite filtrée sur Buchner (filtre GF/D).

Le filtrat (limpide) est alors réduit avec 500 mg de NaBH₄ (2h30 à température ambiante). Le NaBH₄ en excès est détruit par addition de résine HCR-S /forme H⁺ jusqu'à la fin de l'effervescence, le pH doit rester neutre. Le mélange est de nouveau filtré sur Buchner pour éliminer les billes de résine et d'éventuels précipités. Puis il est ensuite ultra-filtré sur un système Minisette (Filtron) équipé d'une membrane de 1 KDa jusqu'à ce que la conductivité du perméat soit stable. Les oligosaccharides sont ensuite convertis sous forme de sel de sodium par passage sur une colonne chargée en résine HCR-S / forme Na⁺. Le rétentat sous forme sodique est congelé à - 20°C puis lyophilisé. Il est nommé H-GY785red.

Préparation de l'oligosaccharide H-GY785

300 mg de l'EPS GY785 sont dissous et hydrolysés dans 150 ml d'acide sulfurique 2 N à 85° C pendant 1h30 dans un bain d'huile sous agitation magnétique. Après refroidissement, l'acide est neutralisé par précipitation des ions sulfates au CaCO₃. 15.7 g de CaCO₃ sont ajoutés à l'hydrolysate afin d'obtenir un pH de 7. La solution est ensuite filtrée sur Buchner (filtre GF/D).

Les étapes d'ultra-filtration et la transformation du produit sous forme sodique sont identiques à celles effectuées lors de la préparation de l'hydrolysate réduit. Ce produit est nommé H-GY785.

2.1.4.4 Préparation et isolement de fractions de faibles masses molaires

– Hydrolyse partielle de l'EPS natif

Principe

Des conditions d'hydrolyse douce permettent la dépolymérisation des polysaccharides de haute masse molaire, sans modification trop importante de la structure initiale. En diminuant la masse molaire et la viscosité, cette étape rend possible les études par RMN et la purification par chromatographie préparative impossible sur les polysaccharides natifs.

Réactifs

- Acide sulfurique (H₂SO₄) 2 N
- Carbonate de sodium (CaCO₃) (Prolabo)
- Borohydrure de sodium NaBH₄ (Sigma)
- Acide acétique glacial
- Résine échangeuse de cations Dowex HCR-S (Sigma)
- Filtres GF/D
- "Dextrane bleu" (2 × 10⁶ g/mol) (Sigma)

Mode opératoire

2 g de l'EPS GY785 sont dissous et hydrolysés dans 400 ml d'H₂SO₄ 2 N à 60°C pendant 1h30, dans un bain d'huile, sous agitation magnétique. Après refroidissement, la solution est neutralisée à l'aide de soude (30 % p/v) dans la glace. Après filtration sur Buchner (filtre GF/D) l'hydrolysate est ultra filtré sur un système Minisette (Filtron) équipé d'une membrane de 1 KDa jusqu'à ce que la conductivité du perméat soit stable (environ 10 µS). Les polysaccharides sont ensuite convertis sous forme de sel de sodium par élution sur une colonne chargée de HCR-S / forme Na⁺. Le rétentat, sous forme sodique, est congelé à – 20°C puis lyophilisé. Ce produit est nommé LMW-GY785.

– **Fractionnement du produit dépolymérisé (LMW-GY785)**

Chromatographie préparative d'échange d'ions

Le polysaccharide LMW-GY785 obtenu précédemment par hydrolyse à été fractionné sur une colonne échangeuse d'ions, DEAE Sepharose FF (hauteur 32 cm, diamètre 3.5 cm) en utilisant un gradient d'acétate d'ammonium (de 0.1 M à 2 M) linéaire dès l'injection. La détermination de la teneur en oses neutres et en acides uroniques de chaque fraction de 20 ml a permis de regrouper les tubes riches en oses en 7 fractions. Elles sont numérotées de 1 à 7. La masse molaire de chaque fraction a été déterminée par HPSEC. La fraction 3 particulièrement étudiée a été nommée EI-GY785. Les spectres RMN ¹H 1D de chaque fraction ont également été enregistrés.

Chromatographie préparative d'exclusion stérique

Le fractionnement de LMW-GY785 a également été réalisé par perméation de gel sur colonne Sephacryl S-300 HR (Pharmacia). Cette colonne de 800 ml (hauteur 40 cm, diamètre 4.8 cm) possède un domaine de fractionnement de 2×10^3 g.mol⁻¹ à 4×10^5 g.mol⁻¹. La détection a été réalisée par un réfractomètre (Gilson) équipé d'une cellule préparative. La phase mobile était composée d'une solution de bicarbonate d'ammonium 0.1 M et le débit linéaire était fixé à 5 ml.min⁻¹. Cinq ml d'une solution de LMW-GY785 dans l'éluant (8 mg.ml⁻¹) ont été injectés. Le volume d'exclusion (340 ml) et le volume total (800 ml) ont été déterminés par injection de 5 ml d'une solution aqueuse de "Dextrane bleu" 2 % et 5 ml d'une solution d'acétone 2 %.

Dix-neuf fractions de 50 ml ont été collectées et lyophilisées, de façon à éliminer le bicarbonate d'ammonium présent dans la phase mobile. La masse molaire de chaque fraction a été déterminée par HPSEC. Leurs compositions glycosidiques ont été déterminées par l'analyse des méthylglycosides-TMS en chromatographie en phase gazeuse. Les fractions 10, 11 et 12 ont été nommées SE-GY785 après avoir été rassemblées.

2.1.4.5 Caractérisation des oligosaccharides par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC)

– Chromatographie d'exclusion stérique haute performance

La masse molaire des EPS est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC). Les échantillons (2 mg.ml^{-1}) sont analysés avec un débit de 0.5 ml/mn d'un tampon acétate d'ammonium 0.1 M dans un système HPLC KONTRON en utilisant une colonne Lichrosphère 300 Å Diol 7 UM ($25 \times 0.4 \text{ cm}$)(MERCK) et une colonne HEMA SEC BIO 40 10U ($25 \times 0.46 \text{ cm}$) (ALLTECH) connectées en série, donnant un domaine de fractionnement total utile, compris entre 5×10^3 et $5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. La détection en sortie de colonne est effectuée par réfractométrie avec un réfractomètre ERC 7512 (ERMA INC). Le signal est traité par un logiciel KONTRON ou ARAMIS (JMBC Développement, Le Fontanil) qui permet de calculer, à partir d'un étalonnage réalisé avec des standards pullulanes (Nardella *et al.*, 1996), les masses molaires en nombre (M_n), en poids (M_w) et au sommet du pic (M_p) et la polydispersité ($I = M_w/M_n$). Les pullulanes sont des glucanes (composés uniquement d'oses neutres) alors que la majorité des polysaccharides de bas poids caractérisés lors de cette étude possède des acides uroniques et des groupements sulfates qui leur confèrent une charge globale négative. En conséquence cet étalonnage ne permet pas de mesures exactes de masses moléculaires mais donne une masse exprimée en équivalent pullulanes. Cette technique n'autorise que des comparaisons relatives des dérivés.

– Fractionnement préparatif d'oligosaccharides neutres obtenus par dégradation des acides uroniques

Matériel

- Biogel P2 (Biorad)
- Tampon de bicarbonate d'ammonium 0.1 M
- "Dextrane bleu" ($2.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$) (Sigma)
- Acétone

- Dextrane (18500 g.mol^{-1}) (sigma)
- Acide chlorhydrique (HCl) 0.1M
- Résine Dowex sous forme HCO_3^- (Sigma)

Protocole

La séparation des oligosaccharides neutres obtenus par dégradation des acides uroniques par le lithium dans l'éthylène diamine, est réalisée sur une colonne de $100 \times 1.6 \text{ cm}$, volume 200 ml, domaine de fractionnement est compris entre 100 et 2 000. Le débit linéaire de 7.2 ml.h^{-1} est imposé par une pompe péristaltique "minipuls 3" (Gilson) placée après la colonne, la détection est réalisée par ampérométrie pulsée dans les conditions du paragraphe 2.1.2.2., le détecteur est placé après la pompe. Le volume total ($V_t = 129 \text{ ml}$) est déterminé avec une solution à 2% d'acétone et le volume d'exclusion ($V_e = 62.4 \text{ ml}$) avec une solution à 2% de dextrane bleu. Les échantillons (1 ml à 10 mg.ml^{-1}) sont préparés dans la phase mobile de bicarbonate d'ammonium 0.1M, des fractions de 5 ml sont collectées. L'étalonnage est réalisé avec un hydrolysat de dextrane:

1 g de dextrane est dissous dans 10 ml d'HCl et chauffé 4 h à 100°C . Après refroidissement, la solution est neutralisée avec quelques spatules de résine sous forme HCO_3^- avec 15 min d'agitation entre chaque ajout. Après filtration, 1 ml de cette solution diluée à 10 mg/ml avec la phase mobile sont injectés. La colonne donne une résolution acceptable de $dp = 1$ à $dp = 7$.

2.1.4.6 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

– Préparation des échantillons

10 à 40 mg de polysaccharide récemment lyophilisés sont dissous dans de l'oxyde de deutérium à 99.90% (Euroiso-top). Puis deux échanges sont réalisés par lyophilisation à l'évaporateur rotatif. L'échantillon est finalement dissout dans $750\mu\text{l}$ de D_2O .

– **Appareillage et séquences**

Les spectres ont été enregistrés au laboratoire de Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire de l'Université de Bretagne Occidentale (Dr. Pichon) sur un spectromètre BRUCKER DRX 500. Les enregistrements ont été réalisés à 298 ou 353 K. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm relativement au 2,2,3,3-tétradeutéro-3-(triméthylsilyl)-propionate de sodium. Le traitement du signal est effectué avec le logiciel WIN-NMR. Les séquences impulsionnelles ont été réalisées conformément aux programmes standards fournis par Bruker. Les analyses à haut champ en mode homonucléaire TOCSY (Total Observed Correlation Spectroscopy) et COSY (Correlation Observed Spectroscopy) permettent d'attribuer les déplacements chimiques des protons de chaque résidu. Le temps de mélange optimum permettant d'obtenir la meilleure résolution pour les spectres TOCSY est de 100 ms. L'attribution des déplacements chimiques des carbones est réalisée grâce aux spectres obtenus à haut champ en mode hétéronucléaire HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) ou HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence). La configuration des liaisons glycosidiques est définie par la valeur des déplacements chimiques des carbones et des protons anomériques. L'analyse en mode homonucléaire ROESY (Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy) ou en mode hétéronucléaire HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permettent de déterminer l'enchaînement des résidus de l'unité répétitive.

2.1.4.7 Spectrométrie de masse

Principe

L'analyse en mode électrospray consiste à appliquer une différence de potentiel entre l'extrémité d'un capillaire traversé par l'échantillon 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 la diminution du volume des gouttelettes jusqu'au moment où les forces répulsives excèdent les forces de cohésion du liquide et provoque l'explosion en micro-gouttelettes. La désorption des ions intervient lorsque le champ

électrique est suffisant à la surface des micro-gouttelettes. Les ions peuvent porter plusieurs charges s'il existe différents sites d'ionisation sur la molécule.

Appareillage

Les spectres de masse dans le cas des oligosaccharides ont été réalisés en mode négatif. A chaque oligosaccharide, mono ou multi-chargé ayant perdu un ou plusieurs protons et ayant formé ou non un adduct avec Na^+ , correspond un ensemble de pics.

L'analyse en mode électrospray de l'oligosaccharide H-GY785red a été réalisée sur les appareils du CRMPO de Rennes.

2.2. Résultats de l'étude structurale de l'EPS GY785

2.2.1. Caractérisation de l'EPS GY 785 natif

2.2.1.1 Composition globale

La composition globale de l'EPS GY 785 natif a été déterminée grâce aux méthodes de dosage colorimétrique. Cette première approche a permis de montrer que cet EPS était composé de 50 % d'oses neutres, 30 % d'acides uroniques et de 13 % de protéines suivant les lots et la technique de purification utilisée (voir Tableau 4). Il s'avère que l'étape d'ultrafiltration permet d'éliminer une grande partie des protéines co-précipitées avec le polymère.

EPS GY785	% massiques			
	Oses neutres	Acides uroniques	Sulfates (SO ₃ Na)	protéines
GY785 natif	50	23	9.6	13

Tableau 4 : Composition globale de l'EPS GY 785 natif

La présence de soufre a été révélée par microanalyse élémentaire. Le taux de sulfate est déduit de ce pourcentage en le multipliant par 3.2. La coloration violine apparue lors du dosage à l'Azure A indique que ces groupements sulfates sont liés de façon covalente à la chaîne polysaccharidique.

2.2.1.2 Composition osidique

Les méthylglycosides triméthylsilylés (méthylglycosides-TMS) sont obtenus après méthanolyse et silylation du polymère natif, puis analysés en chromatographie phase gazeuse. Les résultats sont représentés dans le Tableau 5.

EPS GY785 natif

	Rham ^a	Gal ^a	Glc ^a	GlcA ^a	GalA ^a	Total
%	1.5	8	13	7.5	7.5	37.5
Rapport molaire	0.2	1	2	1	1	

^a Déterminé par analyse en GC en utilisant des dérivés triméthylsilylés (méthylglycosides-TMS) après méthanolyse.

Tableau 5 : Composition glycosidique de l'EPS GY785 natif.

Les conditions d'hydrolyse utilisées lors de cette analyse ne permettent de libérer que 30 à 60 % des résidus initialement présents. Ces faibles rendements de libération sont dus à la présence de nombreux résidus d'acides uroniques. En effet, il est connu que la liaison aldobionique est difficile à rompre par hydrolyse ou méthanolyse. Tous les monosaccharides engagés dans ces liaisons ne sont donc pas complètement libérés et restent sous forme d'oligosaccharides non identifiés par cette technique. Les résultats obtenus sont inférieurs à ceux des tests colorimétriques où l'acide concentré utilisé permet une libération plus complète des résidus. Dans le cas présent, seuls 22.5 % d'oses neutres sont identifiés et 15 % d'acides uroniques.

Toutefois, la composition osidique de l'EPS GY785 natif révèle que ce dernier est constitué principalement de glucose, de galactose, d'acide glucuronique et d'acide galacturonique.

2.2.1.3 Analyse des acétates d'alditol partiellement méthylés par GC/MS

L'analyse par GC/MS des acétates d'alditol partiellement méthylés (PMAA) de l'EPS GY785 natif, révèle la présence de 1,5-di-*O*-acétyl-2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-glucitol et de 1,5-di-*O*-acétyl-2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-galactitol qui correspondent respectivement au glucose et au galactose en position terminale (Tableau 6). La présence d'acide glucuronique et

galacturonique di-substitués et les quantités importantes d'oses terminaux (plus de 40 % des résidus) prouvent l'existence de ramifications au sein de l'EPS GY785.

Mais, dans cette analyse, comme lors de l'identification des méthylglycosides triméthylsilylés obtenus après méthanolyse, les conditions d'hydrolyse ne permettent pas la libération de tous les résidus. Le taux d'acides uroniques est inférieur à la valeur obtenue par dosage colorimétrique. La réponse du détecteur ne représente donc pas le pourcentage réel du résidu dans l'unité répétitive du polymère. Toutefois ces valeurs sont reproductibles et permettent d'évaluer de façon qualitative la composition osidique et les positions des liaisons inter-résidus.

Acétates d'alditol partiellement méthylés (PMAA)	Tr*	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)
1,3,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -méthyl-rhamnitol	0.69	118, 131, 234	→3)-Rham-(1→	8.1
1,5-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-glucitol	0.71	118, 161,162, 205	Glc p -(1→	19.3
1,5-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.73	118, 161,162, 205	Gal p -(1→	8.0
1,4,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.79	118, 162, 233	→4)-Gal p -(1→	14.3
1,4,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-glucitol	0.80	118, 162, 233	→4)-Glc p -(1→	10.3
1,5,6-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -méthyl-6- d_2 -glucitol	0.82	118, 162, 191, 235	Glc p A-(1→	4.0
1,5,6-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.85	118, 162, 189, 233	→6)-Gal p -(1→	6.7
1,4,5,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-2,3-di- <i>O</i> -méthyl-6- d_2 -glucitol	0.90	118, 162, 263, 307	→4)-Glc p A-(1→	10.3
1,3,4,5,6-penta- <i>O</i> -acétyl-2- <i>O</i> -méthyl-6- d_2 -glucitol	0.96	118, 335	→3,4)-Glc p A-(1→	5.3
1,3,4,5,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-2- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.96	118, 333	→3,4,6)-Gal p -(1→	4
1,3,4,5,6,penta- <i>O</i> -acétyl-2- <i>O</i> -méthyl-6- d_2 -galactitol	0.96	118, 335	→3,4)-Gal p A-(1→	4.0
1,2,4,5,6-penta- <i>O</i> -acétyl-3- <i>O</i> -méthyl-6- d_2 -glucitol	0.97	190, 263	→2,4)-Glc p A-(1→	4.1

*Tr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol partiellement méthylé relatif à l'hexaacétate de myo-inositol (Tr = 1.00)

Tableau 6 : Identification en GC/MS des composés issus de l'hydrolyse de l'EPS GY785 après les procédures de méthylation et de réduction des acides uroniques

2.2.1.4 Identification des séquences composées d'oses neutres

A l'issue de la dégradation des acides uroniques du polymère natif par le lithium dans l'éthylène diamine, une analyse en GC/MS des PMAA avec réduction des acides uroniques a été réalisée. Le Tableau 7 indique les résultats et ne montre aucun pic correspondant à un acide uronique. Tous les acides uroniques ont donc été détruits par cette réaction.

La destruction des acides uroniques provoque la libération de deux résidus identifiés comme du 1-*O*-acétyl-2,3,4,5,6-penta-*O*-méthyl-alditol, ils correspondent à un monosaccharide libre réduit. Ces deux résidus sont du glucose et du galactose, mais l'absence de standards réduits n'a pas permis l'attribution de ces hexoses à l'un ou à l'autre de ces pics. Cette analyse indique également la présence, en quantité importante, de deux produits réduits identifiés comme le 1,4,-di-*O*-acétyl-2,3,6-tri-*O*-méthyl-alditol ou le 1,3,-di-*O*-acétyl-2,4,6-tri-*O*-méthyl-alditol. Cette molécule étant symétrique, l'analyse en spectrométrie de masse permet seulement de définir que ces résidus sont substitués en position 3 ou 4 par un autre ose neutre. Il s'agit d'après la fragmentation, de résidus différents du rhamnose. Or, au regard de l'analyse du polymère natif précédemment effectuée, les oses neutres mono-substitués sont du 4→)-Galp et du 4→)-Glc. Le 1,5-di-*O*-acétyl-2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-galactitol et le 1,5-di-*O*-acétyl-2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-glucitol, dérivés du glucose et au galactose en position terminale non réductrice, sont également présents.

La chromatographie d'exclusion du produit issu de la dégradation des acides uroniques a été réalisée sur gel P2 (Biorad), dont le domaine de fractionnement permet de séparer les oligosaccharides neutres issus de la dégradation du dextrane de dp = 1 à dp = 7. Le chromatogramme indique la présence de deux pics, l'un correspond aux monosaccharides, l'autre aux disaccharides. Aucun autre type de chaîne de plus haute masse n'a été détecté.

Acétates d'alditol partiellement méthylés (PMAA)	Tr*	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)
1- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,5,6-penta- <i>O</i> -méthyl-alditol	0.47	89, 101, 133, 145, 177	Hexose réduit	4
1- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,5,6-penta- <i>O</i> -méthyl-alditol	0.54	89, 101, 133, 145, 177	Hexose réduit non substitué	16
1,4,-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-alditol ou 1,3,-di- <i>O</i> -acétyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -méthyl-alditol	0.62	89, 101, 133, 205, 249	→3) ou →4)-hexose réduit	31
1,4,-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-alditol ou 1,3,-di- <i>O</i> -acétyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -méthyl-alditol	0.63	89, 101, 133, 205, 249	→3) ou →4)-hexose réduit	8
1,3,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -méthyl-rhamnitol	0.69	118, 131, 234	→3)-Rham-(1→	2
1,5-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.73	118, 161,162, 205	Galp-(1→	15
1,5-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-glucitol	0.71	118, 161,162, 205	GlcP-(1→	14
1,4,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.79	118, 162, 233	→4)-Galp-(1→	1
1,4,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-glucitol	0.80	118, 162, 233	→4)-GlcP-(1→	2
1,3,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.81	118, 161, 227, 234	→3)-Galp-(1→	5

*Tr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol partiellement méthylé relatif à l'hexaacétate de myo-inositol (Tr = 1.00)

Tableau 7 : Identification en GC/MS des PMAA dérivés de l'EPS GY785 après la dégradation des acides uroniques par le lithium dans l'éthylène diamine (la procédure de réduction des acides uroniques à été suivie).

Ces résultats montrent que la dégradation des acides uroniques libère majoritairement des monosaccharides et des disaccharides dont, le résidu en position terminale non réductrice est le glucose ou le galactose. Le résidu en position réductrice est, pour un des disaccharides le 4→)-Galp et pour l'autre, le 4→)-GlcP. La conclusion de cette étude est qu'il n'existe pas de longue chaîne de sucres neutres, en plus des unités disaccharidiques.

2.2.1.5 Cinétique d'hydrolyse et démarche de la caractérisation structurale adoptée

La quantification des monosaccharides neutres libérés lors de l'hydrolyse du GY785 dans acide sulfurique (2 N) a été réalisée par chromatographie d'échange d'ion suivant la méthode de Mopper *et al.* (1992). La Figure 8 montre que les monosaccharides neutres libérés sont du glucose et du galactose. Pendant toute la durée de l'hydrolyse, la quantité de glucose est plus élevée que celle du galactose. Au delà de 200 minutes d'hydrolyse, les quantités libérées de monosaccharides sont de moins en moins importantes et le rapport glucose/galactose se stabilise à 2 (Figure 9).

Si l'on considère que l'EPS GY785 natif contient 50 % d'oses neutres, comme l'indiquent les tests colorimétriques, l'hydrolyse totale de 100 mg de polysaccharide devrait conduire à la libération de 50 mg de monosaccharides neutres. Or les résultats de cette cinétique indiquent qu'au bout de 300 min d'hydrolyse, seulement 18 mg d'un mélange de glucose et de galactose sont libérés. Cette expérience confirme que certaines séquences de ce polysaccharide sont très résistantes à l'hydrolyse acide. En fin d'hydrolyse, il doit donc se former des oligosaccharides qui n'évoluent que très lentement.

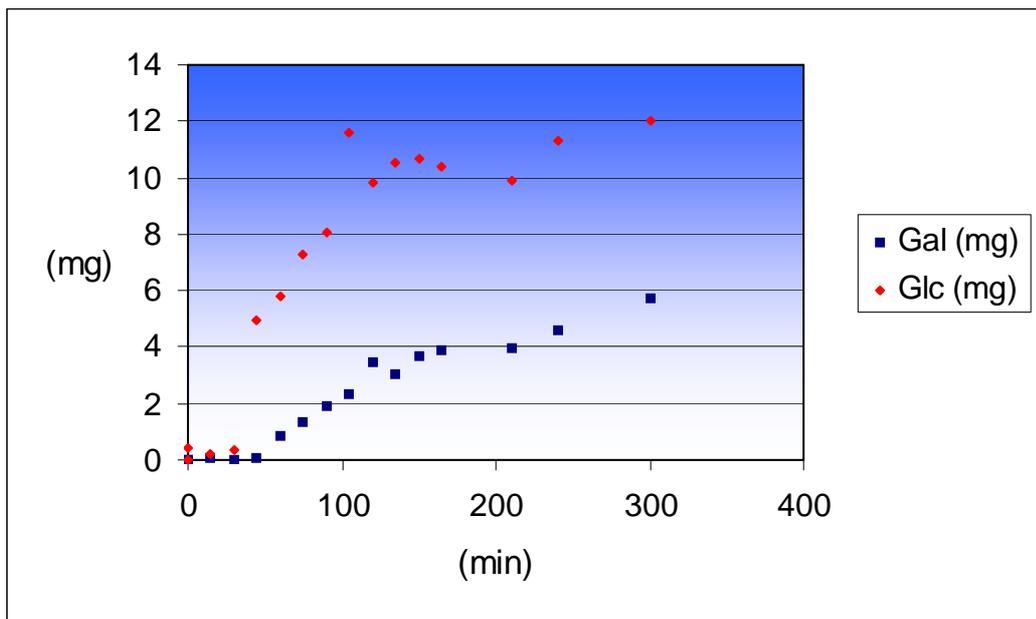


Figure 8 : Quantification des monosaccharides neutres libérés lors de l'hydrolyse acide de 100 mg de l'EPS GY785 natif

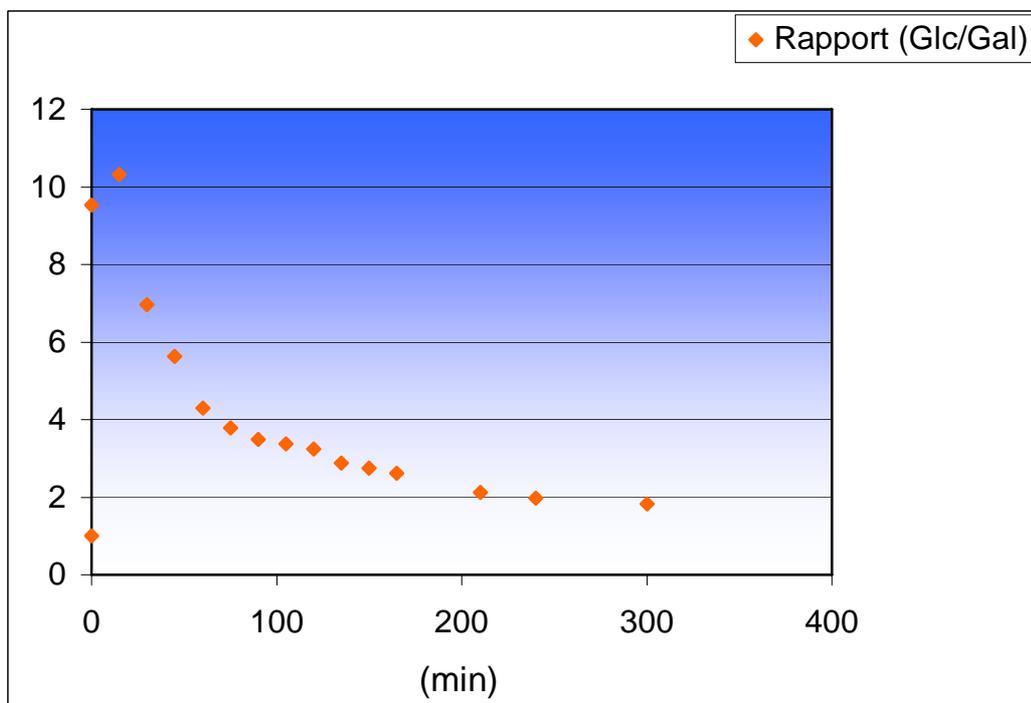


Figure 9 : Rapport Glucose/Galactose au cours de l'hydrolyse de l'EPS GY785

La stratégie choisie a donc été de préparer des oligosaccharides, de déterminer leurs structures et à partir de ces données, de remonter à la structure initiale du polymère.

2.2.2. Préparation et étude structurale des oligosaccharides de l'hydrolysate réduit, H-GY785red

2.2.2.1 Obtention des oligosaccharides

Les données obtenues par la cinétique d'hydrolyse ont montré qu'après 3h30 (210 min) d'hydrolyse par l'acide sulfurique 2 N, tous les monosaccharides n'étaient pas hydrolysés, mais que la quantité d'oses libérés n'évoluait que très lentement ensuite. Par conséquent, à ce stade, le mélange d'oligosaccharides formé doit être assez homogène. La réduction au borohydrure de sodium a pour but de stabiliser et de réduire le nombre d'entités chimiques formées en transformant l'extrémité terminale réductrice présente sous les deux formes α et β , en un alditol unique. L'élimination des réactifs et des monosaccharides libérés a été réalisée par ultrafiltration sur une membrane de 1 KDa. Après lyophilisation, le rendement massique de la réaction est de 22.6 % et le produit est nommé H-GY785red.

2.2.2.2 Estimation de la masse molaire par HPSEC du H-GY785red

La chromatographie de filtration sur gel permet d'estimer la masse molaire des composés obtenus. L'étalonnage de la colonne est réalisé en utilisant une gamme de standards pullulanes. Ces polysaccharides sont neutres alors que le GY785 est un EPS contenant environ 30 % d'acides uroniques et 9 % de groupements sulfates, ce qui lui confère une charge globale négative. Les masses molaires représentées dans le Tableau 8 sont donc des masses en "équivalent pullulanes" qui ne représentent pas la masse réelle de l'hydrolysate, mais qui permettent de comparer des fractions de même nature entre elles.

	Mp (g.mol ⁻¹)	Mw (g.mol ⁻¹)	Mn (g.mol ⁻¹)	I
H-GY785red	2000	1900	1800	1.4

Mp (Masse molaire au pic) ; Mw (Masse molaire moyenne en poids) ; Mn (Masse molaire moyenne en nombre) ; I (polydispersité)

Tableau 8 : Masses molaires obtenues par HPSEC de l'hydrolysate réduit

La masse molaire au pic de H-GY785red, dans ce système, est de 2000 g.mol⁻¹ ce qui correspond à la limite inférieure de caractérisation pour cette colonne. Or le chromatogramme ne présente aucun autre pic de plus haute masse molaire, ce qui signifie que le produit obtenu, dans ces conditions d'hydrolyse, correspond à des fragments de chaînes peu polydispersés et de très faibles masses molaires.

2.2.2.3 Détermination de la composition glycosidique du H-GY785red

L'analyse par GC, des méthylglycosides-TMS préparés à partir du H-GY785red, indique que le H-GY785 est majoritairement composé de glucose, d'acide glucuronique et d'acide galacturonique (Tableau 9). De très faibles quantités de galactose (autour de 0.3%) sont présentes. Or, ce produit a subi une réduction par le borohydrure de sodium, le résidu réduit possède donc 2 fonctions alcools de plus que s'il n'était pas réduit. Après silylation, il possède une structure différente de celle d'un ose non réduit. Il ne sera donc pas identifié lors de l'analyse des méthylglycosides-TMS par GC. Le galactose, s'il est en position terminale réductrice, peut être présent, mais non détecté.

H-GY785red						
	Rham	Gal	Glc	GlcA	GalA	Total
%	0	0.3	9.3	14.0	6.3	29.9
Rapport molaire	0	0.03	1	2	1	

Tableau 9 : Composition du H-GY785red obtenue par méthanolyse après triméthylsilylation.

Les proportions d'oses neutres et d'acides uroniques sont différentes de celles du polymère natif indiquées dans le Tableau 5. Les acides uroniques représentent ici 20.3 % contre 15 % avant hydrolyse. Les oses neutres ne représentent plus que 10 % contre plus de 22 % avant hydrolyse.

Les rendements de libération des monosaccharides sont extrêmement faibles (30 %). Ce qui n'est pas surprenant compte tenu des résultats précédemment décrits. L'hydrolyse totale étant quasiment impossible à atteindre, la composition exacte est difficile à déterminer. Le rhamnose, déjà en très faible quantité dans le polymère natif, est totalement absent dans cet hydrolysate.

2.2.2.4 Nature des liaisons glycosidiques du H-GY785red

La présence de résidus d'acides uroniques en proportion importante, révélée par l'analyse des méthylglycosides-TMS dans l'hydrolysate réduit, montre qu'il est indispensable d'accompagner la méthylation d'une réduction deutérée des groupements carboxyles. L'analyse par GC/MS des acétates d'alditol partiellement méthylés du H-GY785red, révèle la présence de 1,5-di-*O*-acétyl-2,3,4,6-tétra-*O*-méthyl-glucitol qui correspond à un glucose en position terminale (Tableau 10).

Les autres résidus présents en quantités importantes sont des dérivés des acides uroniques : trois acides glucuroniques, un en position terminale et deux mono-substitués en

position 3 ou 4 et deux acides galacturoniques, l'un mono-substitué en position 3, l'autre di-substitué en position 3 et 4.

L'analyse révèle également la présence d'un résidu possédant un temps de rétention de 0.62 dont les fragments primaires observés en spectrométrie de masse, correspondent à un hexose réduit (glucitol ou galactitol) substitué en position 3 ou 4.

Acétates d'alditol partiellement méthylés (PMAA)	Tr*	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)
1,4,-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-alditol ou 1,3,-di- <i>O</i> -acétyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -méthyl-alditol	0.62	89, 101, 133, 205, 249	→3 ou 4)- ?-réduit	2
1,5-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-glucitol	0.71	118, 161,162, 205	Glc _p -(1→	22
1,4,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.79	118, 162, 233	→4)-Gal _p -(1→	2
1,5,6-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -glucitol	0.82	118, 162, 191, 235	Glc _p A-(1→	39
1,4,5,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-2,3-di- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -glucitol	0.90	118, 162, 263, 307	→4)-Glc _p A-(1→	22
1,3,5,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-2,4-di- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -glucitol	0.91	118, 191, 234, 307	→3)-Glc _p A-(1→	7
1,3,5,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-2,4-di- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -galactitol	0.93	118, 191, 234, 307	→3)-Gal _p A-(1→	4
1,3,4,5,6,penta- <i>O</i> -acétyl-2- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -galactitol	0.96	118, 235	→3,4)-Gal _p A-(1→	2

*Tr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol partiellement méthylé relatif à l'hexaacétate de myo-inositol (Tr = 1.00)

Tableau 10 : Identification en GC/MS des PMAA dérivés de H-GY785red (après la procédure réduction des acides uroniques)

2.2.2.5 Spectrométrie de masse

L'analyse du H-GY785red, en spectrométrie de masse de type électrospray en mode négatif (Figure 10), montre la présence de nombreux pics correspondant à des ions mono- ou multi-chargés. L'interprétation du spectre est donnée dans le Tableau 11 :

L'ion m/z 951 correspond à une molécule de masse $M = 952$ g/mol, déprotonée mono-chargée $[M - H]^-$. Cette masse molaire concorde avec un pentasaccharide sulfaté, réduit composé de deux oses neutres et de trois acides uroniques. Cet ion peut également être détecté sous formes sodiques, notées $[M - 2H + Na]^-$ à m/z 973 lorsque l'ion possède un seul atome sodium, ou $[M - 3H + 2 Na]^-$ à m/z 995 lorsqu'il possède deux atomes de sodium. Il peut également avoir deux charges négatives s'il a perdu deux protons, il est alors noté $[M - 2H]^{2-}/2$ à m/z 475.

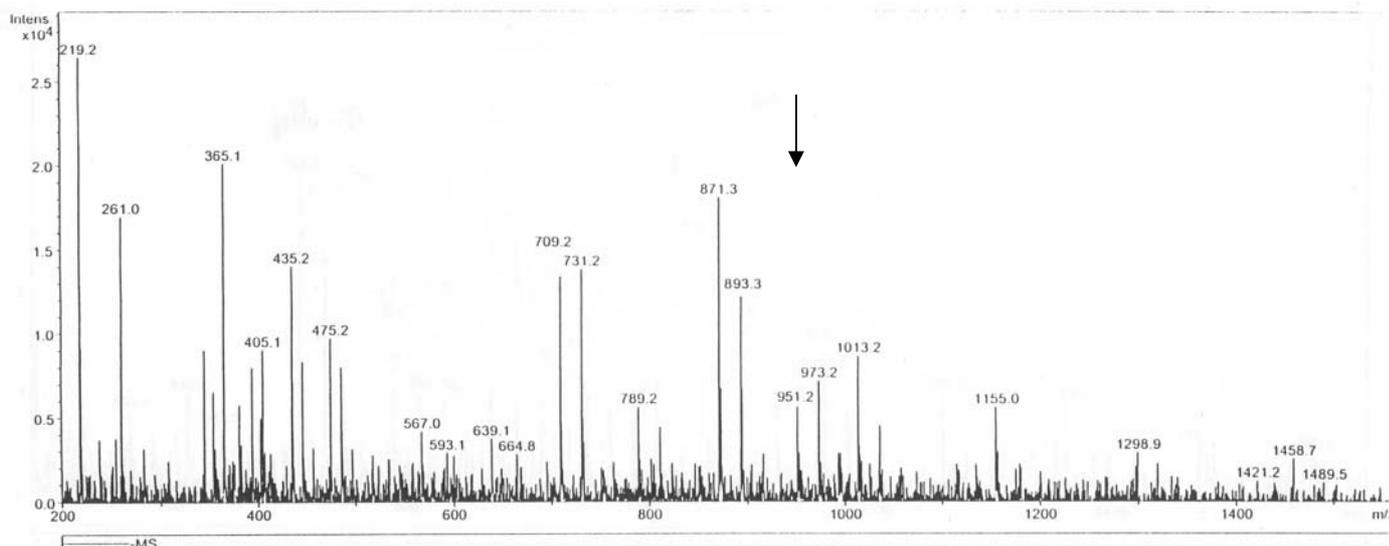


Figure 10 Spectre de masse de l'hydrolysate issu de l'EPS GY785red

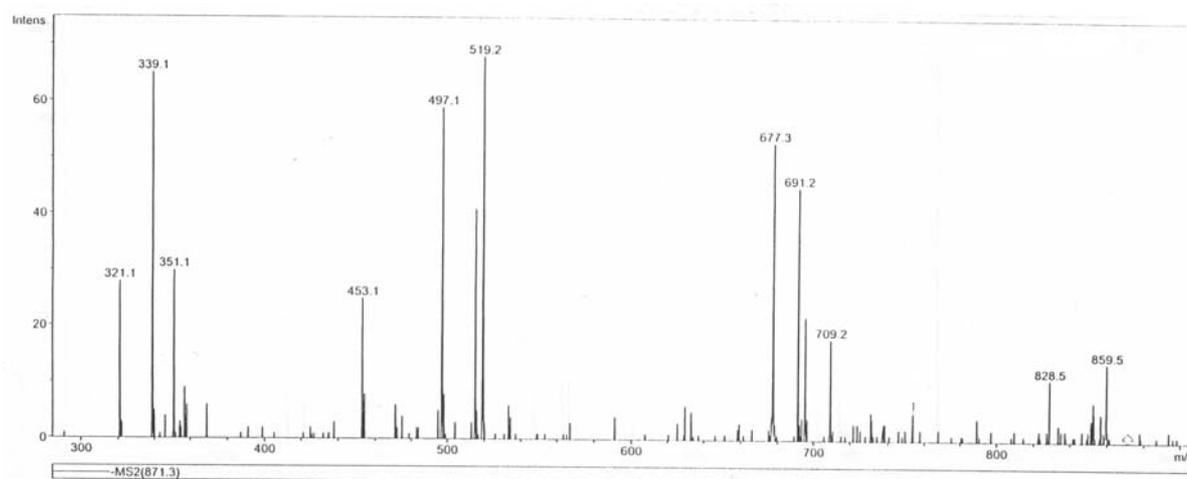


Figure 11 : Spectre de masse issu de la fragmentation de l'ion m/z 871.

	$[M - H]^-$	$[M - 2H + Na]^-$	$[M - 3H + 2Na]^-$	$[M - 2H]^-/2$	$[M - 3H + Na]^{2-}/2$
Pentasaccharide (SO₃)	951	973	995	475	
Pentasaccharide	871	893	915	435	
Tétrasaccharide (SO₃)	789	-	-	-	
Tétrasaccharide	709	731	-	-	365

M = Masse molaire (en g/mol)

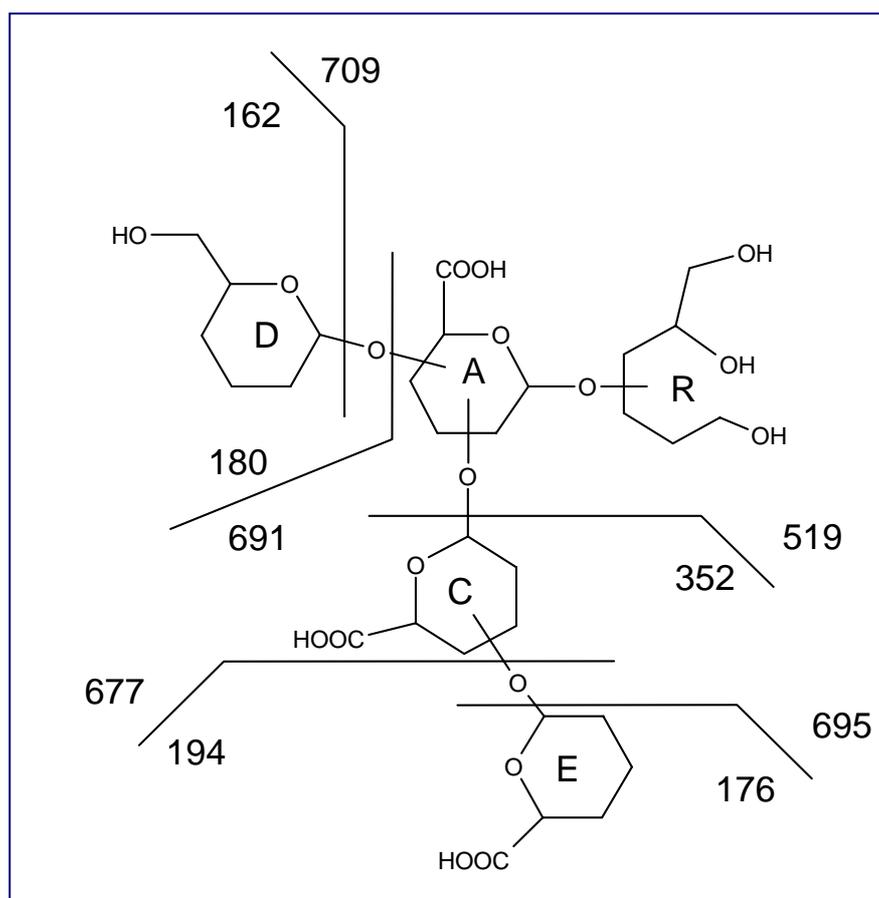
Tableau 11 : Caractéristiques obtenues par spectrométrie de masse (electrospray) des ions négatifs présents dans l'hydrolysate.

La différence de 80 unités de masse observable entre l'ion précédent m/z 951 et l'ion m/z 871 équivaut à la perte d'un groupement sulfate (SO₃). Ce pentasaccharide est donc également composé de deux oses neutres et de trois acides uroniques. La réduction du carbone anomérique introduit deux protons supplémentaires par rapport à un pentasaccharide non réduit.

La différence d'unité de masse entre le pentasaccharide sulfaté et l'ion m/z 789 est de 162, elle représente un hexose neutre, tel que le glucose ou le galactose en position terminale non réductrice. Cet oligosaccharide coïncide avec la masse d'un tétrasaccharide sulfaté réduit, constitué de trois acides uroniques et d'un hexose neutre. L'ion m/z 709 quant à lui, représente ce tétrasaccharide ne possédant pas de groupement sulfate. L'ion $[M-3H+Na]^{2-/2}$ à m/z 365 est également dû à cet oligosaccharide

– **Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)**

La fragmentation de l'ion $[M-H]^-$ à m/z 871, issu du pentasaccharide non sulfaté, a été effectuée par MS/MS. Le spectre est représenté sur la Figure 11 et le schéma de fragmentation sur la Figure 12. La fragmentation se fait de part et d'autre de l'oxygène de la



Tous les hydroxyles secondaires non engagés dans une liaison ne sont pas représentés

Figure 12 : Schéma de la fragmentation de l'ion m/z 871 en MS/MS.

liaison osidique avec transfert d'hydrogène : Les ions $[M-162]^-$ à m/z 709 et $[M-180]^-$ à m/z 691 résultent également de ce type de fragmentation.

De même, les fragments $[M-176]^-$ à m/z 677 et $[M-194]^-$ à m/z 695 représentent la perte d'un acide uronique en position terminale, selon le même mode de fragmentation.

Le fragment m/z 519, coïncide avec la perte d'un disaccharide composé de deux acides uroniques, l'un en position terminale, l'autre engagé dans deux liaisons osidiques $[M-176-176]^-$.

En conclusion, cette expérience montre que l'EPS GY785 présente, au sein de son unité répétitive, un pentasaccharide sulfaté et ramifié. Il comporte un hexose et un acide uronique (lui-même lié à un acide uronique) comme extrémités terminales non réductrices.

2.2.2.6 Caractérisation du H-GY785red par spectroscopie de RMN

– Détermination de la configuration anomérique des liaisons glycosidiques de H-GY785red

Le spectre 1D du proton du H-GY785red peut être découpé en trois parties :

- La zone, en jaune sur la Figure 13, située entre 4.9 ppm et 5.5 ppm, correspond aux signaux des protons anomériques de configuration α . Le spectre de H-GY785red montre deux signaux à 5.15 ppm et 5.16 ppm. D'autres signaux, très faibles, sont observables, à 5.22 ppm par exemple, mais représentent des résidus très minoritaires. Le spectre en mode hétéronucléaire HSQC permet de corréler le proton au carbone qui le porte. Les carbones anomériques portent deux oxygènes, ils ont donc des déplacements chimiques à champs faibles (95-110 ppm) caractéristiques. Ainsi sur le spectre, deux taches de corrélations apparaissent à deux résidus d'anomérie α (δ 101.53/5.16 ; δ 103.05/5.15).

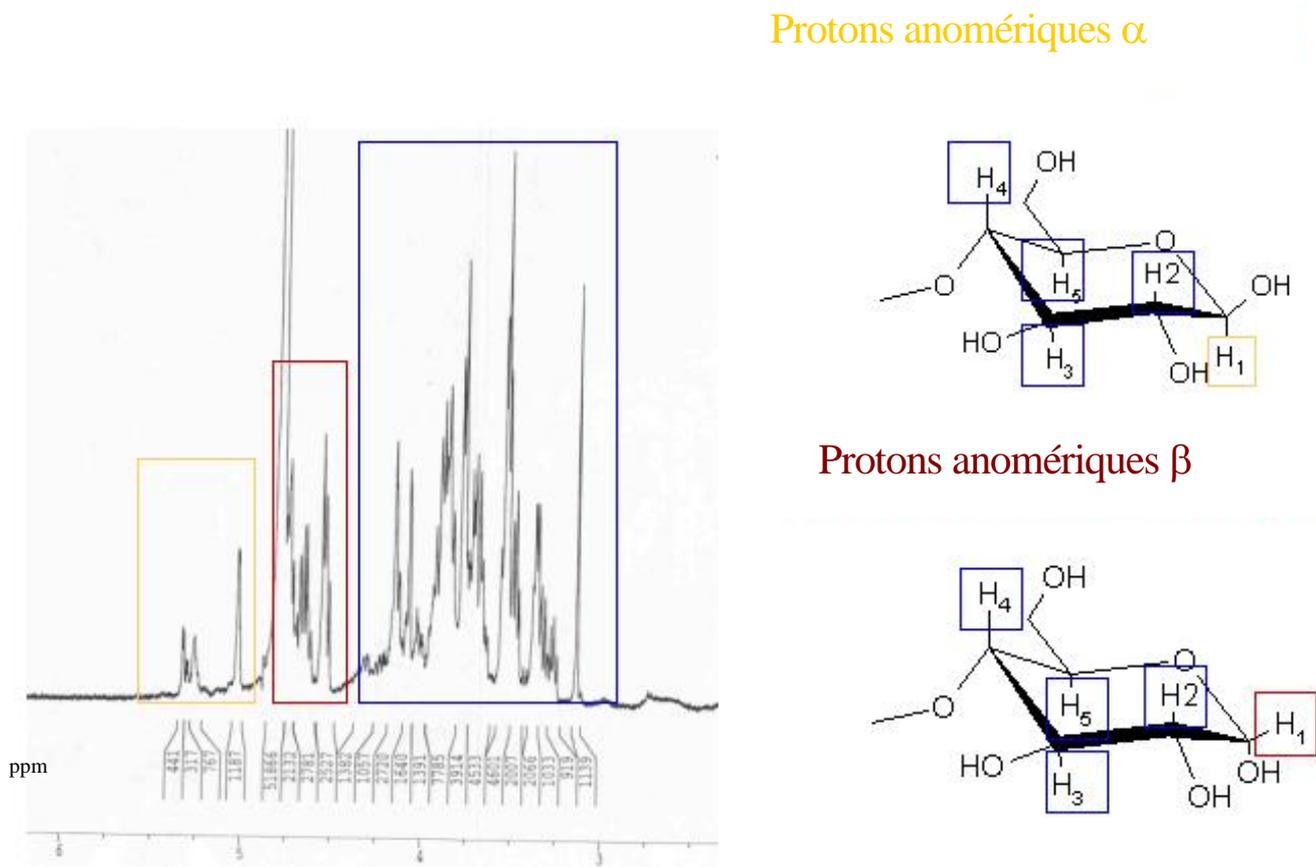


Figure 13 : Spectre RMN 1D ^1H de H-GY785red

- Les protons anomériques de configuration β sont caractérisés par les signaux situés entre 4.4 ppm et 4.9 ppm, encadrés en rouge sur la Figure 13. L'intégration des signaux de cette région indique la présence de 5 protons. Le spectre HSQC ne montre que de 3 taches de corrélation C-1/H-1 (δ 4.77/106.31 ; δ 4.74/105.44 ; δ 4.54/105.02) correspondant à des positions anomériques ($95 < \delta < 110$ ppm). Il existe donc deux autres protons très déblindés (mais non anomériques) résonnant dans cette zone de fréquences.

- Entre 4.3 ppm et 2.9 ppm, les signaux sont dus aux protons portés par les carbones C-2, C-3, C-4, C-5 et C-6.

Les résidus ont été nommés de A à E dans l'ordre décroissant des déplacements chimiques de leurs protons anomériques.

– Attribution des signaux et identification des différents résidus glycosidiques

L'attribution des signaux aux protons et aux carbones de chaque résidu correspondant a été réalisée par une interprétation simultanée des spectres en mode homonucléaire TOCSY, COSY et ROESY pour les protons, HSQC et HMBC pour les carbones.

Résidu	¹ H/ ¹³ C					
	1	2	3	4	5	6
A →3,4)-α-GalpA-(1→	5.16 101.53	4.15 70.54	4.21 82.84	4.70 81.64	4.39 74.6	177.6
B →3)-α-GalpA-(1→	5.15 103.05	4.02 70.32	4.14 82.54	4.57 73.27	4.40 74.6	178.0
C →4)-β-GlcpA-(1→	4.77 106.31	3.49 75.87	3.70 76.96	3.92 83.93	3.93 70-75	176.0
D β-Glcp-(1→	4.74 105.44	3.28 76.52	3.55 74.69	3.33 72.84	3.39 78.60	3.67 et 3.86 64.14
E β-GlcpA-(1→	4.54 105.02	3.37 75.89	3.55 78.27	3.78 75.67	3.78 78.70	178.6

Tableau 12 : Déplacements chimiques (en ppm) des protons et des carbones des résidus osidiques constitutifs des oligosaccharides H-GY785red

Résidus A et B

Une configuration *α-galacto* a été attribuée à ces deux résidus sur la base de la résonance à champ faible des protons H-1 et H-2. D'après la valeur des déplacements chimiques des protons H-4 et la forme des taches de corrélations H-3/H-4 en COSY, il s'agit d'acides galacturoniques. Les signaux des carbones en C-3 des deux résidus sont respectivement (δ

82.84), et (δ 82.54) ; ce sont donc des positions substituées, engagées dans une liaison glycosidique. Le signal correspondant au C-4, de déplacement chimique (δ 81.64) du résidu A, indique également une substitution en position 4. En revanche, le signal du carbone C-4 du résidu B (δ 73.27), indique que ce résidu n'est pas substitué sur cette position. A, correspond donc au résidu $\rightarrow 3,4$ - α -GalpA-(1 \rightarrow) identifié par GC/MS et B au même résidu ayant perdu sa ramification en position 4 c'est à dire au $\rightarrow 4$ - α -GalpA-(1 \rightarrow).

Le déplacement chimique des H-2 de ces deux résidus à (δ 4.15) pour A et (δ 4.02) pour B ainsi que les déplacements chimiques des signaux des carbones C-2 (δ 70.54) pour A et (δ 70.32) pour B, n'indiquent pas la présence du groupement sulfate pourtant observé en spectrométrie de masse sur cette position. En fait, deux résidus sulfatés A' et B' sont également présents, mais en très faibles quantités dans cet hydrolysate. Ils seront discutés dans le paragraphe 2.2.3.3.

Résidu C

Une configuration β -gluco a été attribuée à ce résidu sur la base des déplacements des protons H-1 et H-2. Le déplacement chimique du C-4 à (δ 83.93) indique que ce résidu est engagé dans une liaison osidique par cette position. Une corrélation intra-résidu observée sur le spectre HMBC entre le proton H-5 et/ou H-4 (δ 3.92-3.93) et un carbone exhibant un signal à (δ 176) permet d'affirmer que ce résidu est un acide glucuronique. Il correspond au résidu $\rightarrow 4$ - β -GlcA-(1 \rightarrow) identifié en GC/MS.

Résidu D

Tous les signaux correspondant aux protons et aux carbones de ce résidu d'anométrie β ont pu être attribués à l'aide des spectres TOCSY et HMQC. Les déplacements chimiques des protons et des carbones des positions 2 (δ 3.28/76.52), 3 (δ 3.55/74.59) et 4 (δ 3.33/72.84) indiquent qu'aucune position n'est substituée. Par conséquent, D est un résidu terminal d'une des deux ramifications portées par le résidu A. Les déplacements chimiques attribués à ce résidu sont très proches de ceux rapportés pour un β -GlcA lié en 4 d'un α -GalpA (Rougeaux *et al.*, 1998).

Résidu E

Les déplacements chimiques des protons H-1 (δ 4.54), H-2 (δ 3.37) et H-3 (δ 3.55) indiquent une configuration β -*gluco*. Une corrélation intra-résidu observée sur le spectre HMBC entre le proton H-4 et/ou H-5 (δ 3.78) et un carbone exhibant un signal à (δ 178.6) permet d'affirmer que ce résidu est un acide glucuronique. Les déplacements chimiques des carbones C-2, C-3, et C-4 respectivement à (δ 75.89), (δ 78.27) et (δ 75.67) permettent de conclure que ce résidu n'est pas substitué, il correspond au β -GlcAp-(1 \rightarrow).

2.2.2.7 Conclusion

Les résultats précédents sont en accord et complètent ceux obtenus par GC/MS des PMAA et par spectrométrie de masse. L'hydrolysate H-GY785red est principalement un mélange de 2 composés : un pentasaccharide constitué de \rightarrow 3,4)- α -GalpA-(1 \rightarrow , \rightarrow 4)- β -GlcAp-(1 \rightarrow , β -GlcAp-(1 \rightarrow , β -GlcApA-(1 \rightarrow et un hexose neutre réduit ; et un tétrasaccharide possédant la même structure, mais ayant perdu le β -GlcAp-(1 \rightarrow .

En outre, la spectrométrie de masse met clairement en évidence la présence d'un tétra et d'un pentasaccharide sulfatés peu abondants (dans cet hydrolysate). Ce résultat n'est pas surprenant, car les groupes sulfates sont assez facilement éliminés par hydrolyse. Le résidu terminal réducteur est un ose neutre (glucose ou galactose), mais comme il est difficile de distinguer un galactitol d'un glucitol, il n'a donc pas été possible d'identifier ce résidu. Afin de définir sa nature et sa position, il est nécessaire de réaliser une hydrolyse semblable à la précédente sans effectuer de réduction au borohydrure de sodium (voir ci-après).

2.2.3. Caractérisation des oligosaccharides du H-GY785

2.2.3.1 Caractérisation chimique des oligosaccharides

Afin de déterminer la nature du résidu réducteur, une seconde hydrolyse a été réalisée, mais sans réduction. Des conditions d'hydrolyse plus douces ont été utilisées dans le but d'obtenir des oligosaccharides de masses molaires plus élevées et de conserver une plus grande quantité de groupements sulfates. Cet hydrolysats est nommé H-GY785.

Malgré ces nouvelles conditions d'hydrolyse, le produit obtenu possède une masse molaire semblable au H-GY785red, c'est à dire inférieure à 2 000 g.mol⁻¹.

La composition osidique, déterminée par GC à partir des méthylglycosides-TMS, indique que H-GY785 est composé de glucose, galactose, acide glucuronique et acide galacturonique dans des rapports molaires de 1 :1 :2 :1. Les liaisons glycosidiques déterminées par GC/MS des PMAA apportent des précisions par rapport aux résultats obtenus pour le H-GY785red : Les unités réduites ne sont pas présentes et il apparaît une quantité plus importante de 1,4,5-tri-*O*-acétyl-2,3,6-tri-*O*-méthyl-galactitol correspondant au →4)-Galp (6 % contre 2 % dans le H-GY785red).

2.2.3.2 Attribution des signaux et identification des différents résidus glycosidiques par RMN

Le spectre RMN 1D du proton de H-GY785 indique la présence des résidus C, D et E avec des caractéristiques RMN très proches de celles décrites précédemment pour H-GY785red. Quatre résidus, A et B (similaires à ceux de H-GY785red) et deux supplémentaires nommées A' et B' possèdent des caractéristiques proches et sont des dérivés de l'acide galacturonique (Figure 14):

Les déplacements chimiques des carbones C-3 (δ 82.61) pour A, (δ 82, 39) pour B et (δ 80.0) pour A' et B' indiquent une substitution (Figure 15). Les carbones C-4 de A (δ 81.3) et de A' (δ 81.52) sont également substitués. Les déplacements chimiques des H-2 de B' et

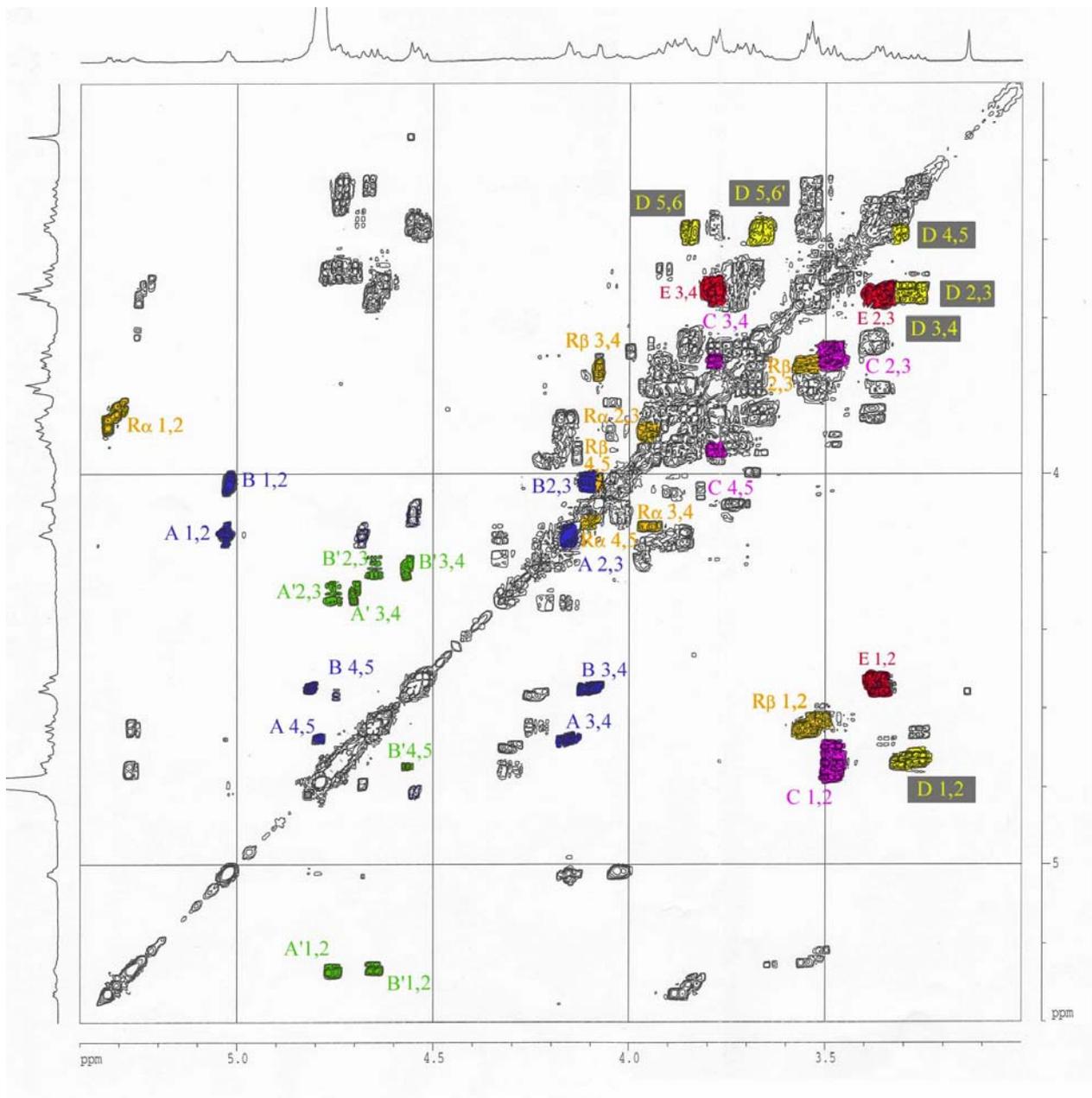


Figure 14 : Spectre RMN COSY du HGY785 (300 K, 500 MHz)

A' respectivement à (δ 4.64) et (δ 4.75) montrent que ces résidus portent un groupement sulfate en position 2.

B' est un $\rightarrow 3$)- α -Glc pA-(2SO₃⁻)-(1 \rightarrow et A' un $\rightarrow 3,4$)- α -Glc pA-(2SO₃⁻)-(1 \rightarrow .

Les déplacements chimiques des résidus B et B' sont très semblables à l'exception des H-2 (δ 4.64) pour B' et (δ 4.19) pour B. La même différence est observable pour A' et A. Les déplacements chimiques des H-2 de A et B à plus hauts champs indiquent qu'ils ne possèdent pas de groupement sulfate en position 2.

A est un $\rightarrow 3,4$)- α -Glc pA (1 \rightarrow et B est un $\rightarrow 3$)- α -Glc pA-(1 \rightarrow

En fait il apparaît que ces quatre acides galacturoniques proviennent d'un même acide galacturonique présent dans le polymère natif, sulfaté en 2 et substitué en 3 et 4. La ramification en 4 et le groupe sulfate peuvent être éliminés au cours de l'hydrolyse.

Deux nouveaux signaux de protons anomériques nommés R _{α} à (δ 5.32) et R _{β} à (δ 4.52) ont été observés, en plus des signaux déjà présents dans les spectres de H-GY785red. Les déplacements chimiques relatifs aux protons et aux carbones de ce résidu, sont résumés dans le Tableau 13 et leur attribution est développée dans le paragraphe 2.2.3.4.

2.2.3.3 Détermination de l'enchaînement des résidus

L'attribution des déplacements chimiques de la majorité des protons et des carbones et l'identification de chaque résidu ayant été effectuée, l'interprétation des spectres de HMBC et de ROESY a permis de déterminer la structure des différents oligosaccharides présents dans cet hydrolysats.

Résidu	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$						
	1	2	3	4	5	6	6'
R _α 4→)-α-Galp-(1→	5.32 95.1	3.87 71.25	3.95 73.76	4.14 79.5	3.93 71.5		
A →3,4)-α-GalpA-(1→	5.03 102.39	4.17 70.65	4.18 82.61	4.68 81.30	4.84 71.95		
A' →3,4)-α-GlcpA-(2SO ₃ ⁻)-(1→	5.26 101.08	4.75 72.57	4.30 80.0	4.69 81.52			
B 3-α-GalpA-(1→	5.03 102.39	4.03 70.65	4.13 82.39	4.52 73.26	4.83 74.7		
B' →3)-α-GlcpA-(2SO ₃ ⁻)-(1→	5.27 101.00	4.64 72.56	4.23 80.0	4.56 73.26	4.75 74.57		
C →4)-β-GlcpA-(1→	4.74 106.27	3.46 76.02	3.66 77.27	3.77 84.04	3.88 78.77	178.10	
D β-Glcp-(1→	4.73 105.26	3.25 76.77	3.52 74.51	3.31 73.01	3.35 78.52	3.82 63.26	3.59
R _β →4)-α-Galp-(1→	4.65 94.3	3.56 74.8	3.73 75.65	4.84 79.2	4.01 -		
E β-GlcpA-(1→	4.52 105.26	3.34 75.89	3.52 78.52	3.50 74.7	3.76 73.4		

Tableau 13 : Déplacements chimiques (en ppm) des protons et des carbones des résidus des oligosaccharides de H-GY785.

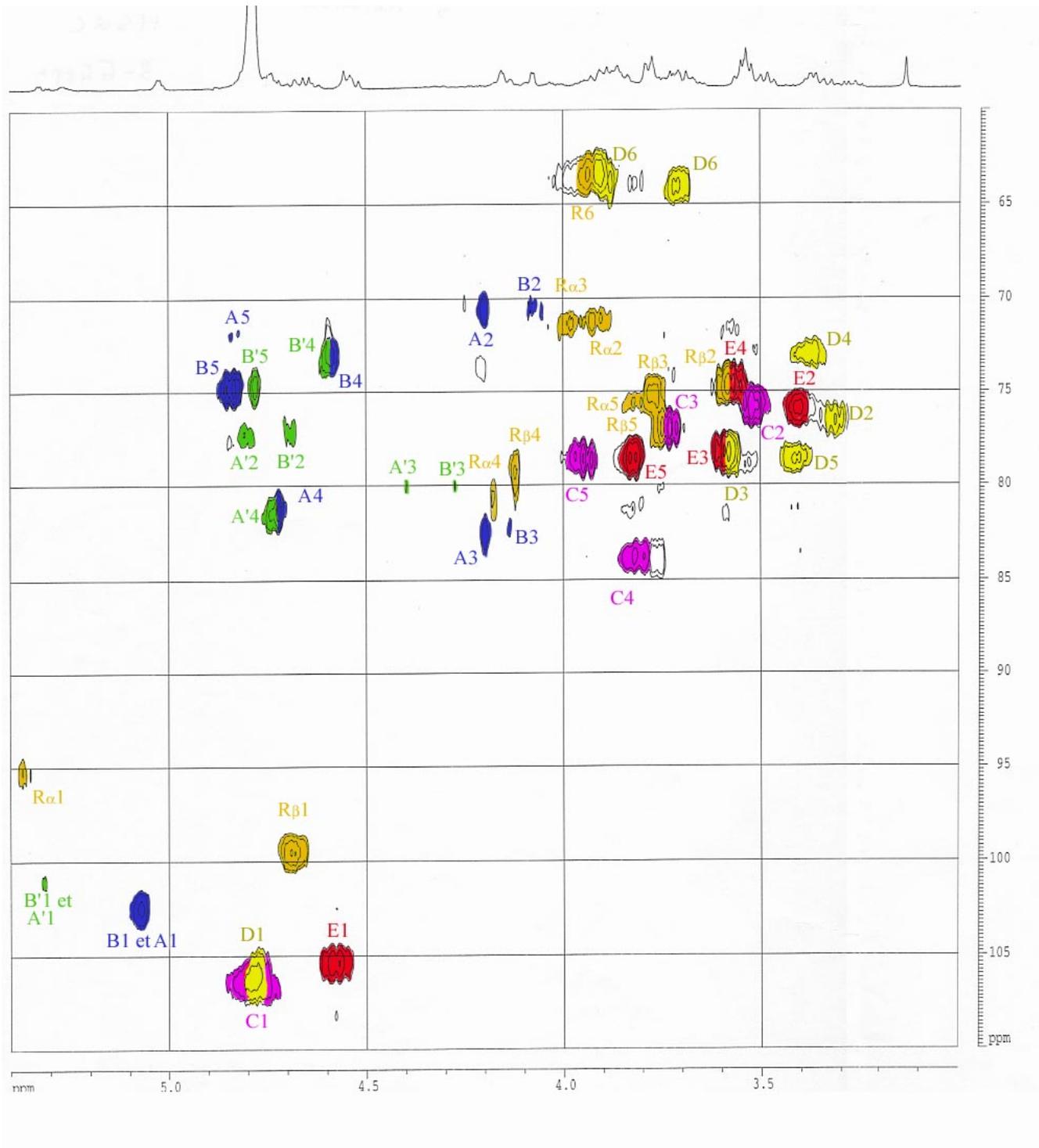
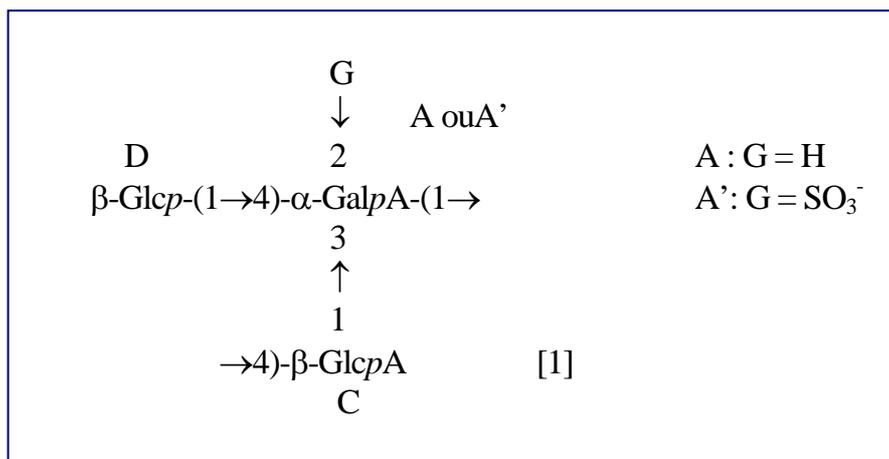
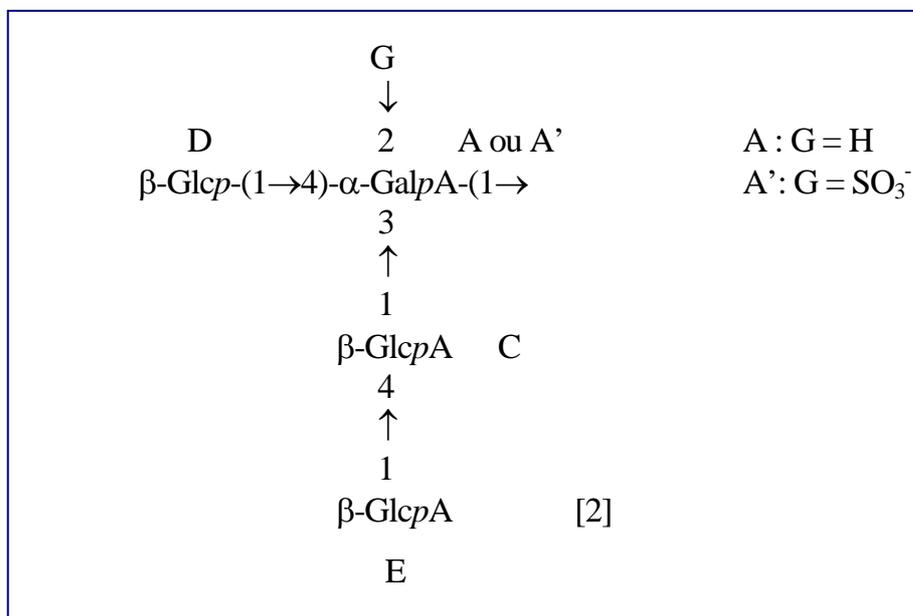


Figure 15 : Spectre HSQC du HGY785 (300 K, 500 MHz).

Dans les spectres de HMBC, une corrélation inter-résidus apparaît entre le proton H-1 du résidu D (δ 4.73) et le C-4 (δ 81.3) du résidu A, indiquant la substitution en 4 de l'acide galacturonique par le glucose terminal. Une corrélation, également observée, entre le proton H-1 du résidu C (δ 4.74) et le carbone C-3 du résidu A' ou B' (δ 80.0), confirme que l'acide galacturonique est substitué sur la position 3 par le résidu C. Ces résultats sont renforcées par des corrélations inter-résidus, sur le spectre de ROESY, entre les deux protons H-3 des résidus A ou B et le proton anomérique du résidu C. Ces corrélations ne sont pas visibles pour le résidu A' présent en quantités trop faibles, mais l'ensemble de ces données permet d'affirmer la présence du trisaccharide [1] dans l'unité répétitive du GY785 :



De plus la corrélation entre le proton anomérique du résidu E (δ 4.52) et le C-4 (δ 84.04) du résidu C (en HMBC) et plusieurs corrélations (en ROESY) entre ce même proton H-1 du résidu E et les protons H-3, H-4 et H-5 du résidu C, indiquent que E est lié à la position 4 de C. Le tétrasaccharide [2] est donc présent dans H-GY785.



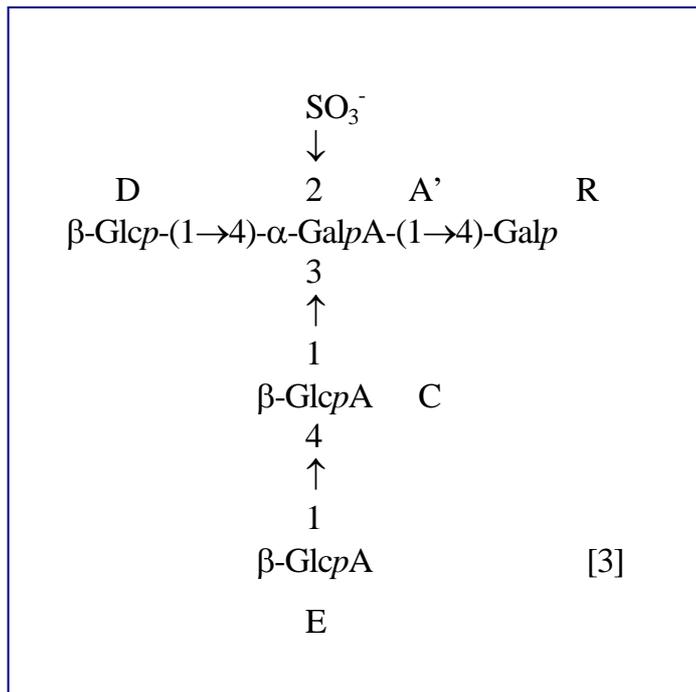
2.2.3.4 Identification du résidu terminal réducteur (R)

Les déplacements chimiques des carbones anomériques de R_α et de R_β indiquent que ces deux résidus sont en position terminale réductrice. Les déplacements chimiques des protons H-2, H-3 et H-4 des deux résidus, permettent de conclure qu'ils appartiennent à la série *galacto*. Il s'agit de l'extrémité terminale réductrice présente sous la forme α et β d'un même résidu. En effet, la mutarotation des oses réducteurs amène à un équilibre entre ces deux formes en solution aqueuse. Les déplacements chimiques correspondant aux carbones C-4 à (δ 79.5) pour R_α et (δ 79.2) pour R_β montrent que cette position est engagée dans une liaison glycosidique. Ce résidu est donc l'ose neutre réducteur identifié en spectrométrie de masse, il s'agit d'un \rightarrow 4)-Galp.

L'étude des spectres en mode hétéronucléaire HMBC indique des corrélations entre le proton H-1 (δ 5.03) de B et trois carbones. Deux corrélations sont intra-résidu avec le C-5 à (δ 74.7) de B et avec le C-3 (δ 82.39) de B. Une corrélation inter-résidu est également observable entre ce même proton H-1 de B et un carbone exhibant un signal à (δ 79.5) et

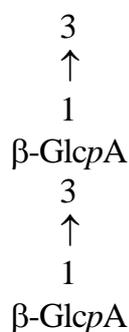
correspondant au C-4 des résidus R_α. Le résidu →4)-Galp en position terminale réductrice est donc lié au résidu B et par conséquent à A →3,4)-α-GalpA-(2SO₃⁻)-(1→.

La structure [3] est donc proposée:

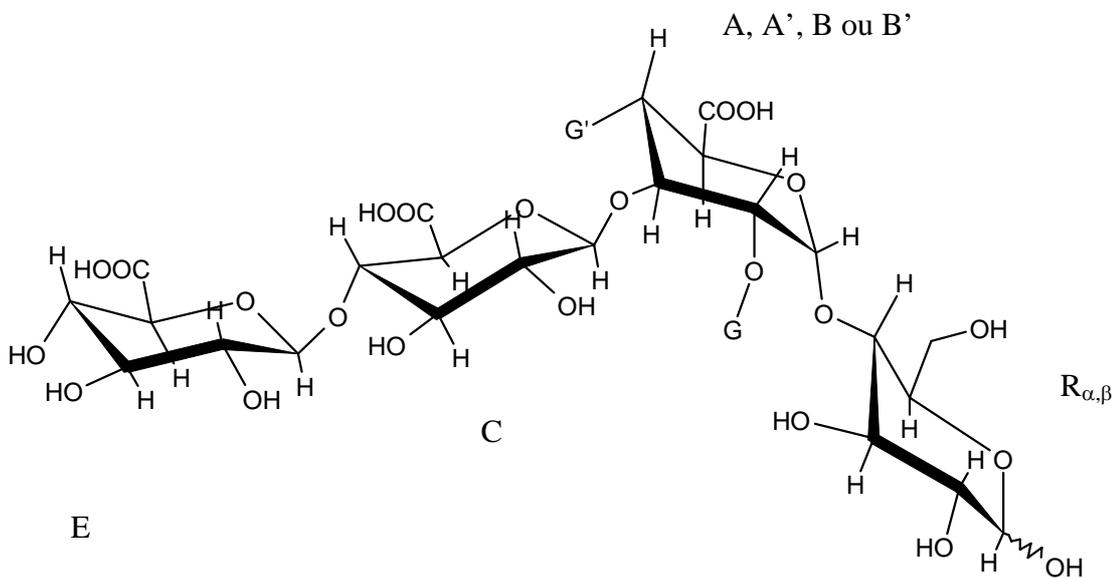


2.2.3.5 Conclusion

Cette étude a permis de définir la structure des oligosaccharides majoritairement libérés lors d'hydrolyses menées de façon sévère sur l'EPS GY 785 natif. Les structures sont présentées sur la Figure 16. Deux conditions d'hydrolyse ont été utilisées, mais les oligosaccharides libérés sont semblables: le motif pentasaccharidique identifié est difficilement hydrolysable, alors que le reste de la structure a totalement disparu après 1h30 d'hydrolyse à 80°C (2 N). Il est à noter qu'un pentasaccharide présentant le motif suivant :



à été obtenu par hydrolyse (dans des conditions voisines) d'un EPS, le ST 716 produit par la bactérie *Alteromonas macleodii* subsp. *Fijiensis*. L'analyse des PMAA par GC/MS de ces oligosaccharides n'a pas mis en évidence d'unité GalpA tri-substituée mais seulement du 3,4-GalpA. Ce résultat également observé pour le polysaccharide natif, est probablement dû à l'élimination rapide du groupement sulfate dans les conditions basiques utilisées lors de la méthylation. Néanmoins, la présence du groupement sulfate en position 2 de l'unité 3,4- α -GalpA ne fait aucun doute au regard des déplacements chimiques des carbones et des protons des unités A' et B'.



	G	G'
A	H	β -Glc p -(1 \rightarrow)
A'	SO ₃ ⁻	β -Glc p -(1 \rightarrow)
B	H	OH
B'	SO ₃ ⁻	OH

Figure 16: Structure des tétrasaccharides et des pentasaccharides libérés lors de l'hydrolyse de l'EPS GY785 natif

2.2.4. Etude des fractions de faible masse molaire (LMW-GY785)

2.2.4.1 Analyse des constituants du polysaccharide de faible masse molaire

L'hydrolyse ménagée du GY 785 natif (90 min à 60°C dans l'acide sulfurique 1M) conduit à un polysaccharide nommé LMW-GY785. Sa masse molaire, déterminée par HPSEC en utilisant les standards pullulanes, est de 11000 g.mol⁻¹. La composition chimique de ce polymère polydisperse est comparable à celle du polymère natif. Cependant, le pourcentage des acides uroniques qui diminue sensiblement (Tableau 14), est manifestement sous-estimé par cette technique pour les raisons évoquées au chapitre 2.2.1.2.

	Rham ^a	Gal ^a	Glc ^a	GlcA ^a	GalA ^a	SO ₃ Na ^b	I ^c	Mw ^c
	%	%	%	%	%	%		(g/mol)
GY785 natif	1.5	8	13	7.5	7.5	9.6	-	10 ⁶
LMW-GY785	1.1	10	14	3	3	8.5	3.5	11000

^aObtenu par GC des dérivés *O*-triméthylsilylés des méthylglycosides ; ^bdéterminé à partir du pourcentage de soufre ; ^cdéterminée par HPSEC

Tableau 14 : Composition chimique et masse molaire du GY 785 natif et du LMW-GY785.

2.2.4.2 Purification du LMW-GY785 (préparation de EI-GY785)

La purification de LMW-GY 785 par chromatographie échangeuse d'ions donne lieu au profil d'élution représenté sur la Figure 17. La détermination de la teneur en oses neutres et en acides uroniques de chaque tube a permis de regrouper les tubes riches en polysaccharide en 7 fractions. La majorité du polymère est éluée pour des concentrations en acétate d'ammonium comprises entre 1 M et 1.5 M.

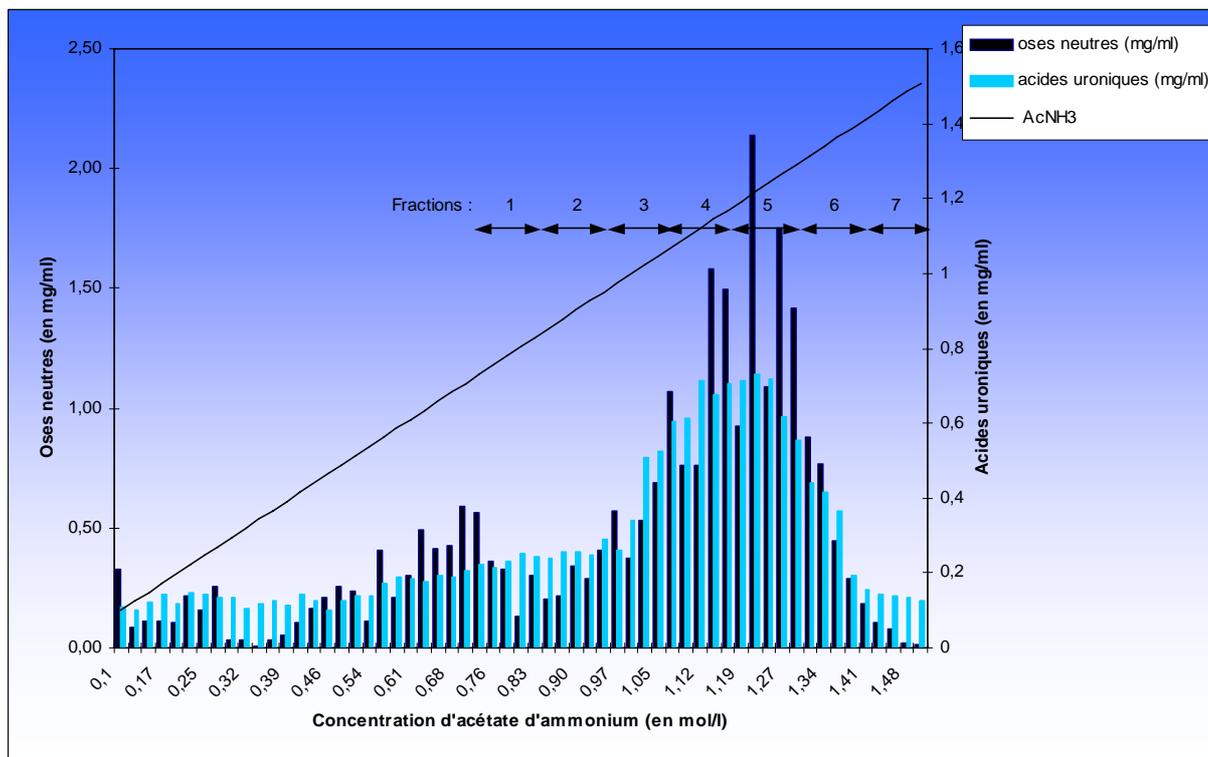


Figure 17 : Dosage des acides uroniques et des oses totaux sur les fractions obtenues par échange d'ions à partir du GY785 hydrolysé (LMW-GY785) .

Les spectres RMN 1D du proton ont été enregistrés pour chacune des 7 fractions afin d'identifier la ou les fractions présentant des spectres de bonne résolution et semblent homogènes (intégration égale pour tous les protons anomériques). La Figure 18 montre les spectres 1D du proton de 3 des 7 fractions obtenues par échange d'ions. Les fractions 1 et 2 exhibent des signaux importants entre 1.1 ppm et 1.6 ppm attribués aux méthyles des résidus de rhamnose. Ces signaux diminuent au cours du fractionnement pour quasiment disparaître au niveau de la fraction 3. Les fractions suivantes sont à nouveau moins homogènes. La fraction 3 (nommée EI-GY785 pour la suite) a donc été sélectionnée pour être étudiée de façon approfondie.

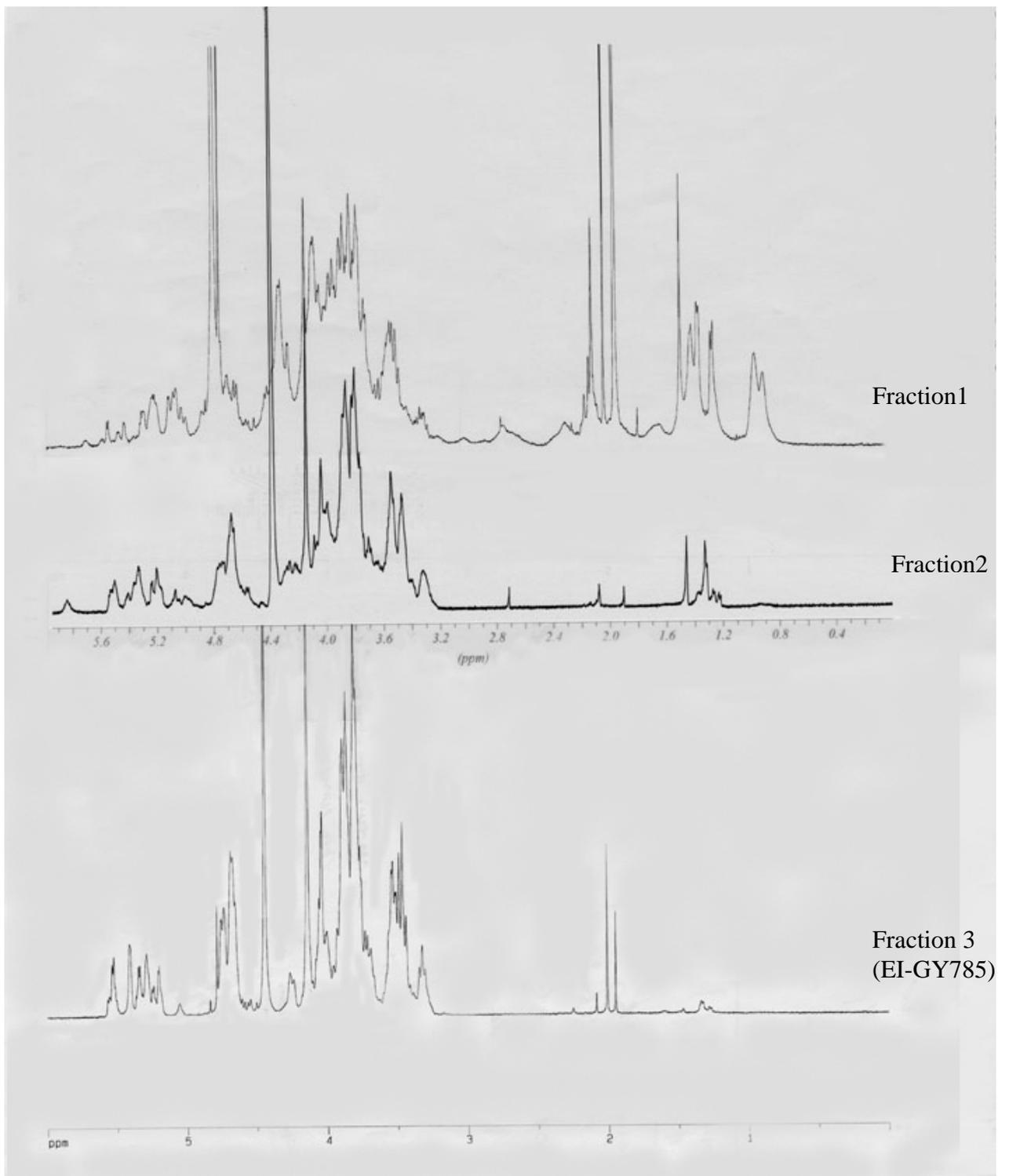


Figure 18 : Spectres RMN 1D 1H de trois fractions obtenues par chromatographie d'échange d'ions à partir de LMW-GY 785.

Caractérisation des différentes fractions par HPSEC

L'analyse en HPSEC sur colonne analytique montre, deux pics pour plusieurs des 7 fractions. L'un est de faible intensité, il correspond à un premier ensemble de chaînes de haute masse molaire (252 000 g.mol⁻¹ au pic). Le deuxième pic est constitué de chaînes d'une masse au pic de 24 000 g.mol⁻¹ (Figure 19). L'intégration des deux pics montre que le polymère de plus faible masse représente plus de 95 % des chaînes, il est donc largement majoritaire dans LMW-GY785. Dans la fraction EI-GY785, Figure 20, les chaînes de hautes masses molaires ont totalement disparu, le chromatogramme ne présente qu'un seul pic correspondant à des chaînes de faibles masses molaires (17 000 g.mol⁻¹ au pic).

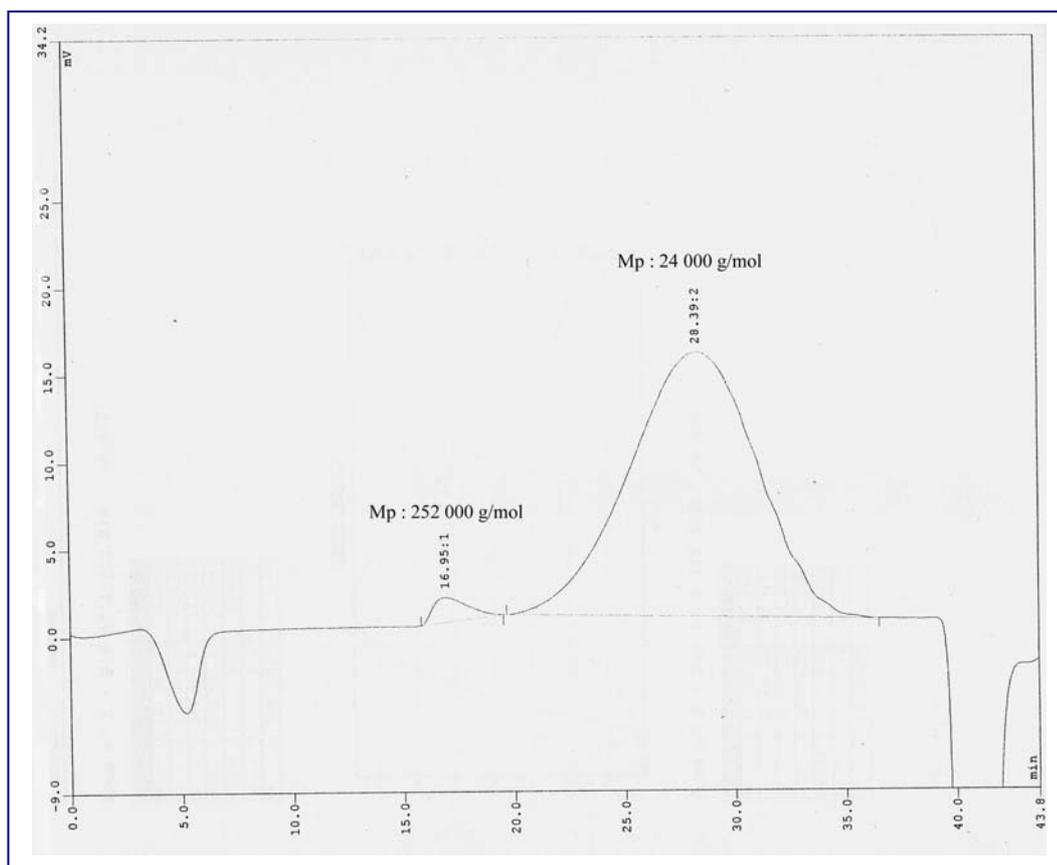


Figure 19 : Profil d'élution en HPSEC des deux types de chaînes présentes dans le LMW-GY785

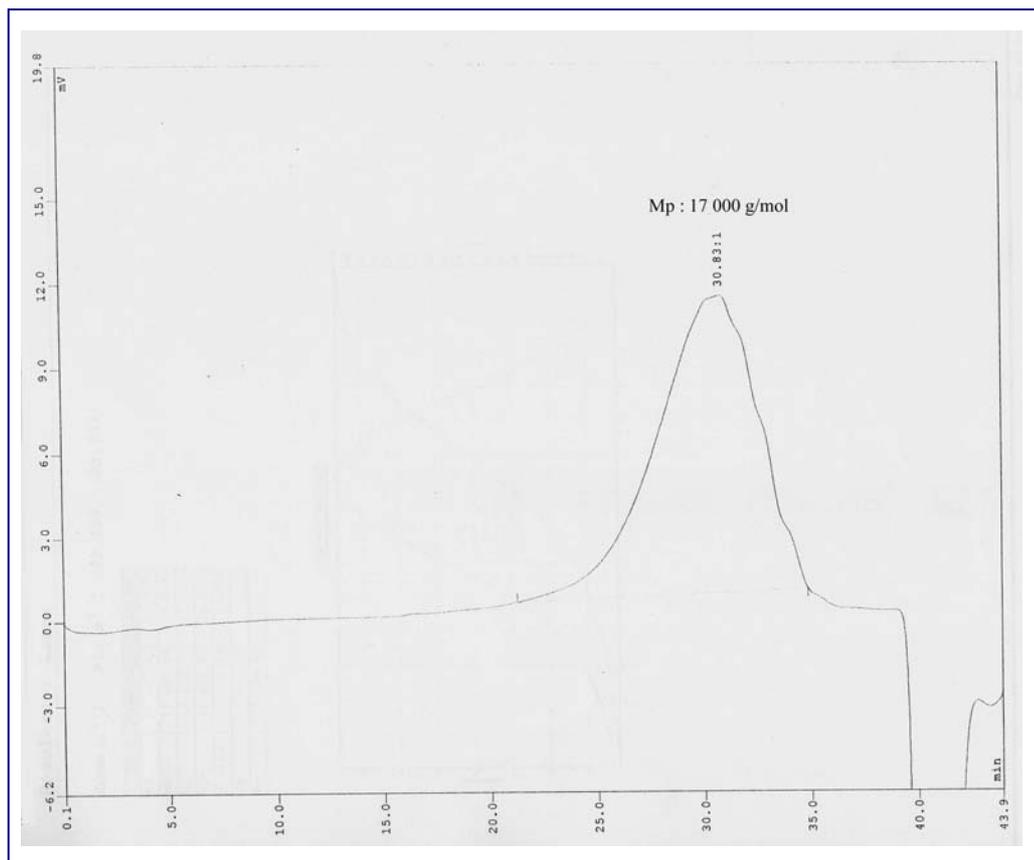


Figure 20 : Profil d'élution en HPSEC des chaînes présentes dans la fraction 3 (EI-GY785)

2.2.4.3 Purification par perméation de gel (préparation du SE-GY785)

Au vu des résultats obtenus sur EI-GY785 par HPSEC sur la colonne analytique, 50 mg de l'hydrolysate LMW-GY785 ont également été fractionnés sur une colonne de perméation de gel préparative Sephacryl S-300 HR. Cette deuxième purification a permis de confirmer les résultats précédents et de disposer de deux fractions obtenues par des méthodes différentes pour l'étude structurale.

Dix-neuf fractions de 50 ml ont été collectées, le profil d'élution est représenté sur la Figure 21. Le chromatogramme présente un pic majoritaire, collecté dans les fractions de 9 à 14, accompagné d'un épaulement (fractions 7 et 8). La composition osidique et les caractéristiques de masses molaires sont résumées dans le Tableau 15. Un deuxième pic est observable au volume d'exclusion de la colonne (fraction 19). Il représente les sels élués au

volume total de la colonne (majoritairement les sulfates résiduels de l'hydrolyse acide apportés par l'acide sulfurique).

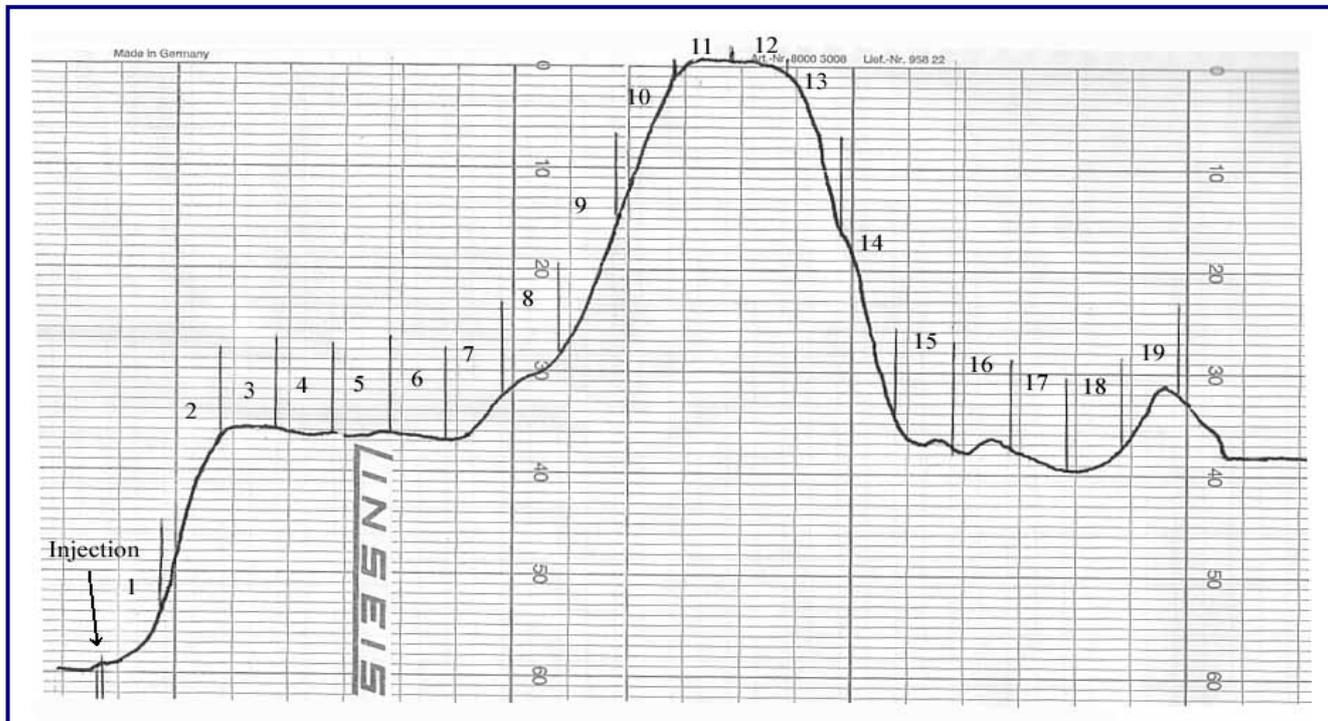


Figure 21 : Profil d'éluion de la chromatographie de perméation de gel du LMW-GY785

Les fractions 1 à 6 ne représentant que des quantités inférieures à 1 mg, n'ont pas été étudiées. La fraction 7 contient peu de polysaccharide, mais les chaînes le constituant semblent composées d'un seul monosaccharide : le rhamnose. Ce polymère est de très haute masse molaire, 531 800 g/mol et très polydisperse. Les fractions 10, 11 et 12 présentent des masses moléculaires comprises entre 29 100 g.mol⁻¹ et 12 450 g.mol⁻¹. Les masses de ces fractions sont semblables aux chaînes de faibles masses de la fraction obtenue par échange d'ions, EI-GY785. Mais il est impossible d'éliminer totalement les résidus de rhamnose par cette technique de purification. Ils appartiennent probablement à des chaînes de toutes les tailles se répartissant dans la totalité des fractions caractérisées. Toutefois, la proportion de ce résidu par rapport aux autres est plus faible, dans les fractions 10 à 14, que dans les fractions 7 et 8.

Fraction	% Rham ^a	% Gal ^a	% Glc ^a	% GlcA ^a	% GalA ^a	Mw ^c (g.mol ⁻¹)	I ^c	Rendement (mg)
7	4.2	-	-	-	-	531 800	3.12	1.8
8	1.4	6.2	11.6	1.0	0.7	179 000	4.0	7.3
9	2.8	9.8	17.6	1.5	1.3	51 500	1.32	4.2
10	3.2	23.0	42.0	7.0	5.0	29 100	1.08	7.8
11	3.3	20.9	29.4	4.7	2.5	20 800	1.05	9.6
12	3.9	20.5	27.9	3.5	2.5	12 450	1.17	8.7
13	0.5	2.3	3.1	1.2	1.2	5 400	1.33	7.2
14	-	-	-	-	-	-	-	1.4

^aObtenu par GC des dérivés *O*-triméthylsilylés après méthanolyse ; ^cdéterminée par HPSEC

Tableau 15: Composition chimique et masse molaire des fractions obtenues par chromatographie de perméation de gel à partir de LMW-GY785

Les spectres RMN 1D du proton des fractions 10, 11, et 12 exhibent des signaux extrêmement faibles entre 1.1 et 1.6 ppm. Ils indiquent une très faible proportion de protons méthyliques du rhamnose. Ces trois fractions dont les spectres sont en tous points comparables à ceux de EI-GY785, ont été rassemblées et nommées SE-GY785 afin d'effectuer les expériences de méthylation et de RMN. La Figure 22 représente le spectre 1 D du proton de la fraction SE-GY785.

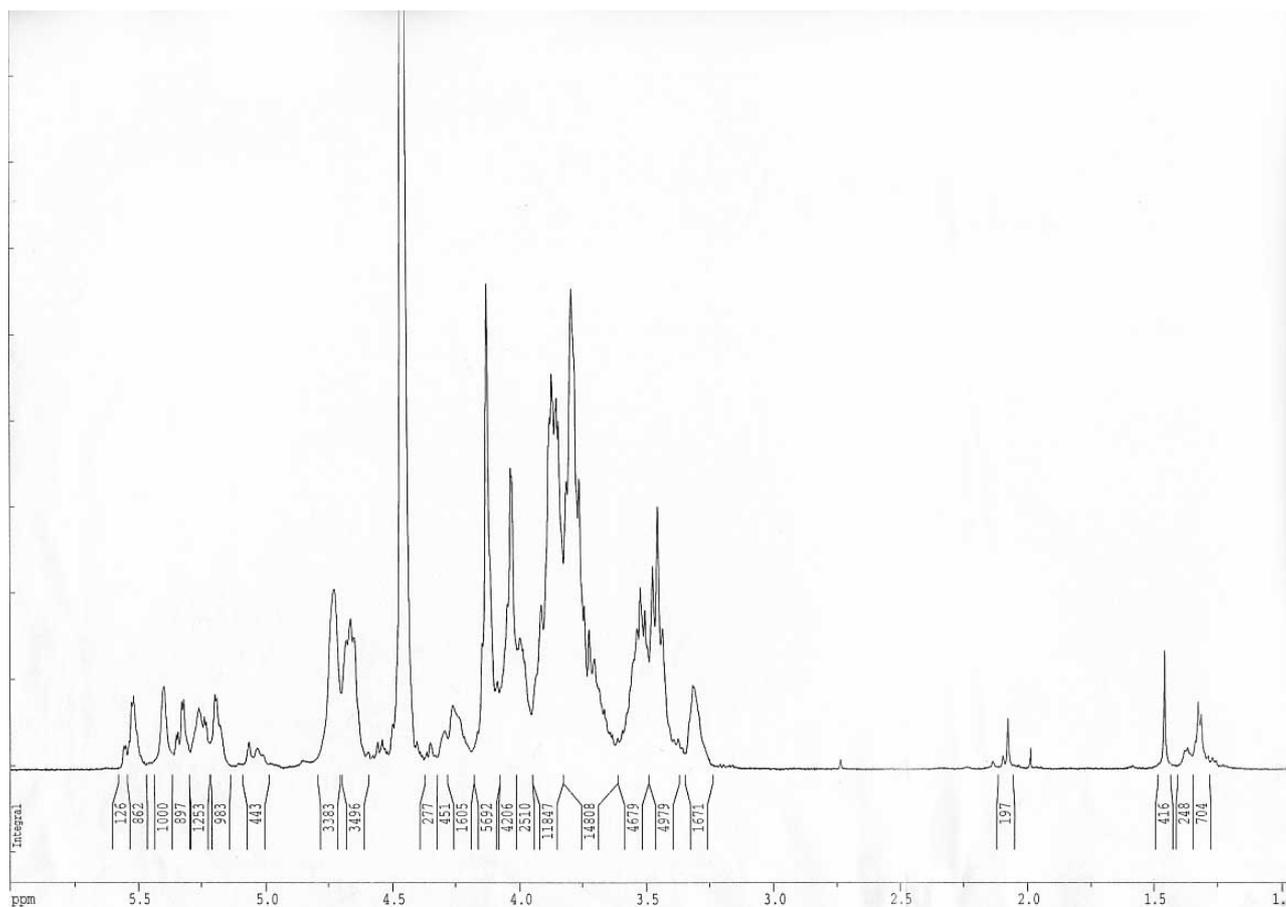


Figure 22 : Spectre 1D du proton de la fraction SE-GY785

2.2.4.4 Mise en évidence des deux polymères

D'après les résultats obtenus lors de l'étude des spectres de RMN 1D du proton de EI-GY785 et de SE-GY785 et de l'analyse par HPSEC, il apparaît clairement qu'il est possible d'obtenir des fractions, contenant un enchaînement de plusieurs dizaines de résidus osidiques, dépourvues de rhamnose. Par ailleurs, la présence de deux types de chaînes ayant des masses molaires très distinctes, montre qu'il existe deux familles de molécules qui ont un comportement différent vis à vis de l'hydrolyse acide :

Après l'hydrolyse, la fraction majoritaire est riche en acides uroniques et possède une faible masse molaire. La fraction minoritaire contient du rhamnose et est éluée au volume

d'exclusion de la colonne d'échange d'ions, elle possède donc peu d'acides uroniques et une haute masse molaire.

Quatre hypothèses peuvent être envisagées quant à la nature des deux familles de chaînes :

- La bactérie *Alteromonas infernus* produit et excrète deux polymères, l'un très minoritaire, semble neutre et principalement composé de rhamnose. Dans ce cas, pourquoi ses chaînes sont-elles « résistantes » à l'hydrolyse, alors que le polymère majoritaire ne l'est pas ?

- La deuxième hypothèse est qu'il n'existe qu'un seul polymère. Mais celui-ci est composé de « blocs ». Cette architecture commune chez les polysaccharides de plantes, n'a pas été décrite pour les EPS bactériens. En effet ces derniers sont composés d'unités répétitives très régulières.

- La troisième hypothèse est que ces chaînes de très haute masse moléculaire contenant du rhamnose sont des lipopolysaccharides (LPS). La quantification par GC des acides gras après méthylation indique la présence de 0.1 % (en masse) de lipides dans le polymère natif, ce qui peut représenter de 1 à 5 % de LPS suivant la taille de la partie osidique. Leur caractérisation, effectuée GC/MS, montre qu'il s'agit majoritairement de C12 :0 ; de C14 :0 et de C16 :0. Or le Lipide A des LPS est composé de chaînes aliphatiques de ce type. De plus, il est fréquent de rencontrer des résidus de rhamnose dans la partie glycosidique qui compose l'antigène-O. Cette hypothèse explique également la haute masse moléculaire observée pour les chaînes riches en rhamnose, par la formation de micelles en solution aqueuse. La masse observée en chromatographie d'exclusion stérique est donc élevée malgré l'hydrolyse. De plus certaines fermentations, obtenues en laboratoire permettent d'obtenir l'EPS GY785 dépourvu de rhamnose.

- La dernière hypothèse est de considérer que le polymère minoritaire est la partie osidique de peptidoglycanes. En effet, le GY785 natif peut contenir jusqu'à 13% de protéines. Le fait que les liaisons peptidiques soient plus résistantes à l'hydrolyse que les liaisons osidiques, pourrait expliquer la masse importante de la fraction plus riche en rhamnose. La méthode de purification de l'EPS après fermentation apparaît donc comme une étape cruciale dans la production d'un polymère homogène.

La suite de l'étude sera menée sur les chaînes de faibles masses molaires contenues dans LMW-GY785 et constituant le polymère largement majoritaire dans l'EPS GY 785.

2.2.5. Caractérisation du polymère majoritaire

2.2.5.1 Identification et dosage des résidus glycosidiques de la fraction EI-GY785

Les fractions EI-GY785 et SE-GY785, contenant principalement le polymère majoritaire, ont donc été étudiées de façon approfondies. L'analyse par GC des méthylglycosides-TMS de ces fractions, indique que les chaînes de ces deux fractions sont composées de galactose, de glucose, d'acide galacturonique et d'acide glucuronique en proportions variables. Ceci montre à nouveau que l'hydrolyse n'est jamais complète et plus ou moins avancée suivant le matériel de départ (Tableau 16).

	Rham ^a %	Gal ^a %	Glc ^a %	GlcA ^a %	GalA ^a %	SO ₃ Na ^b %	Mw (g.mol ⁻¹) ^c
GY 785 natif	1.5	8	13	7.5	7.5	9.6	10 ⁶
EI-GY 785	0.6	12	21	15	7	20	17 000
SE-GY785	3.4	21.4	33.1	5.1	3.3	10	22 600

^a Déterminé par analyse en G.C. en utilisant des dérivés *O*-triméthylsilylés après méthanolyse. ^b Obtenue à partir de l'analyse élémentaire du soufre. ^c Déterminée par HPSEC.

Tableau 16: Composition glycosidique du EI-GY785 et du SE-GY785 (polymère majoritaire de GY 785).

Cependant le rhamnose est toujours présent en très faible quantité. On observe également une quantité plus importante (20%) de sulfates dans la fraction EI-GY785 que dans le produit de départ ou le SE-GY785. Or la présence de sulfates libres à été mise en évidence lors du fractionnement par perméation de gel de la fraction LMW-GY785. Les ions sulfates résiduels sont élués avec la fraction EI-GY785 lors de la chromatographie par échange d'ions.

2.2.5.2 Détermination de la nature des liaisons glycosidiques

Acétates d'alditol partiellement méthylés (PMAA)	Tr*	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)		
			LMW-GY785	EI-GY785	SE-GY785
1,3,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,4-di- <i>O</i> -méthyl-rhamnitol	0.69	→3)-Rhap-(1→	11.6	0.3	2
1,5-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-glucitol	0.71	Glc-(1→	18.9	15	21
1,5-di- <i>O</i> -acétyl-2,3,4,6-tétra- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.73	Gal-(1→	9.1	8	7
1,4,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.79	→4)-Gal-(1→	11.2	12	7
1,4,5-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -méthyl-glucitol	0.80	→4)-Glc-(1→	11.7	11	8
1,5,6-tri- <i>O</i> -acétyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -méthyl-galactitol	0.85	→6)-Gal-(1→	1.2	6	2
1,4,5,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-2,3-di- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -glucitol 1,2,5,6-tétra- <i>O</i> -acétyl-4,3-di- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -glucitol	0.90	→4)-GlcA-(1→ →2)-GlcA-(1→	8.9	14.5	9
1,3,4,5,6-penta- <i>O</i> -acétyl-2- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -glucitol	0.96	→3,4)-GlcA-(1→	5.9	6.5	8
1,3,4,5,6,penta- <i>O</i> -acétyl-2- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -galactitol	0.96	→3,4)-GalA-(1→	3.5	4.5	9
1,2,4,5,6-penta- <i>O</i> -acétyl-3- <i>O</i> -méthyl-6- <i>d</i> ₂ -glucitol	0.97	→2,4)-GlcA-(1→	2	5.5	4

*Tr = Temps de rétention PMAA relatif à l'hexaacétate de *myo*-inositol (Tr = 1.00)

Tableau 17 : Identification en GC/MS des PMAA obtenus à partir du LMW-GY 785, SE-GY785 et EI-GY785 après les procédures de méthylation et de réduction des acides uroniques

La méthylation de LMW-GY785 et EI-GY785 (Tableau 17) suivie de l'identification des PMAA par GC/MS indiquent la présence de neuf résidus différents si l'on exclut le rhamnose.

Le glucose et le galactose en position terminale ainsi que celle de trois résidus di-substitués, →2,4)-GlcA-(1→ ; →3,4)-GlcA-(1→ et →3,4)-GalA-(1→ indiquent l'existence de trois

ramifications dans l'unité répétitive. La forte proportion de glucose terminal par rapport au galactose terminal montre que deux de ces ramifications se terminent par des résidus de glucose et une par un galactose.

2.2.5.3 Etude des spectres de RMN

Les résultats précédents indiquent que les fractions SE-GY785 et EI-GY785 sont très semblables. Les analyses RMN ont été réalisées simultanément. Les résultats présentés ci-dessous correspondent à la fraction SE-GY785. Cependant, certains spectres de EI-GY785 présentaient une meilleure résolution, ils ont donc été utilisés afin de confirmer et/ou d'affiner quelques interprétations.

Détermination de la configuration anomérique des liaisons glycosidiques

Le spectre 1D du proton de la fraction SE-GY785 représenté sur la Figure 22 montre clairement six massifs distincts à bas champs entre 5.1 et 5.6 ppm. Ils sont caractéristiques des protons anomériques de configuration α . L'intégration permet d'attribuer une valeur arbitraire de 1 à chaque massif (sauf pour le résidu E). Le spectre en mode hétéronucléaire HSQC (Figure 23) permet de déterminer les déplacements chimiques des carbones correspondants et de confirmer la configuration α des protons anomériques. Les résidus sont nommés A (δ 5.527/100.8), B (δ 5.402/102.9), C (δ 5.324/102.1), D (δ 5.262/101.2), E (δ 5.24/101.6) et F (δ 5.196/102.8).

La zone comprise entre 4.5 et 4.9 ppm présente un massif mal résolu, tout comme dans les spectres des oligosaccharides précédemment étudiés. L'intégration des signaux de cette région, contenant les protons anomériques de configuration β , indique la présence de 7

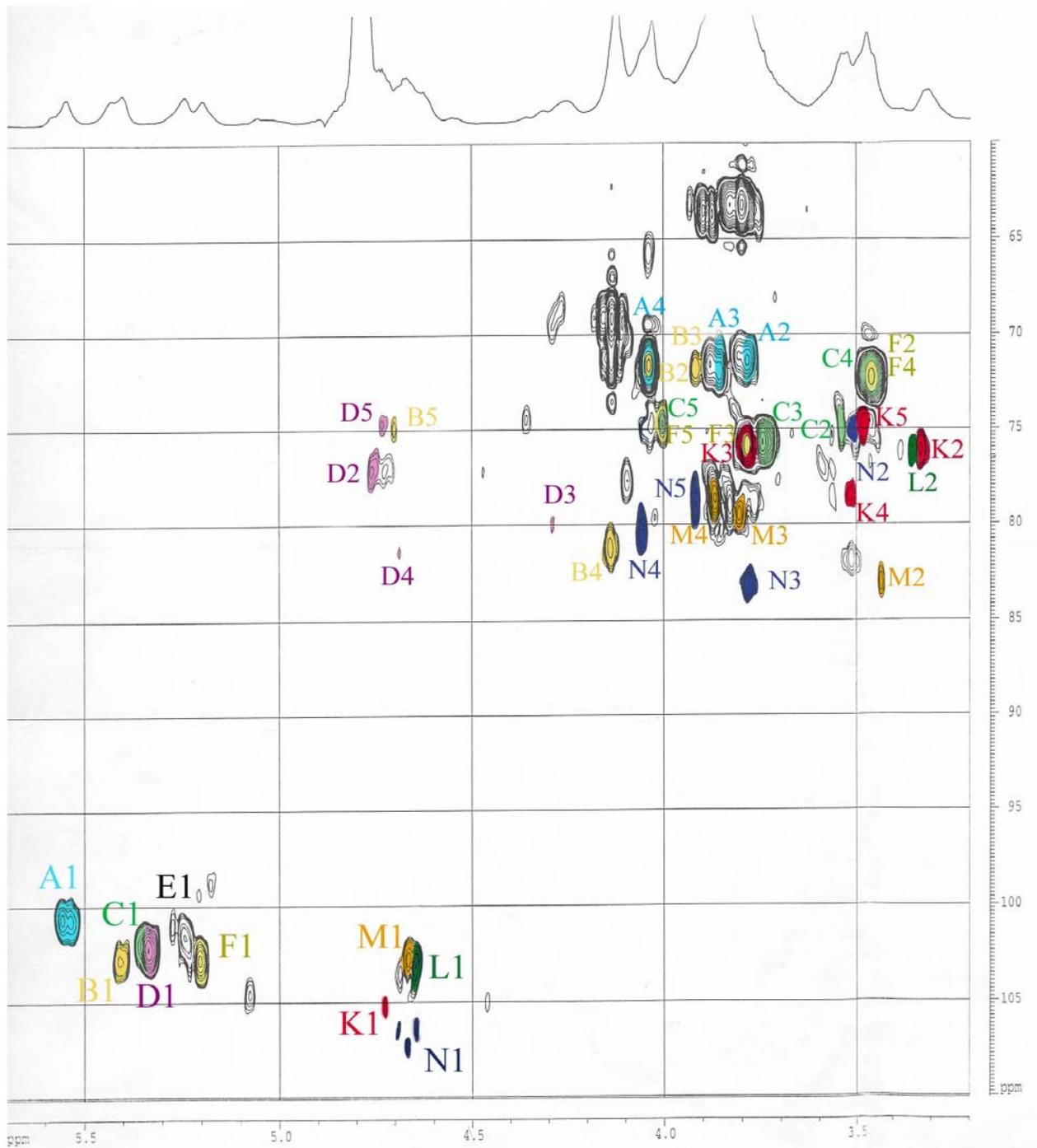


Figure 23 : Spectre RMN HSQC de la fraction SE-GY785 (300 K, 500 MHz)

à 8 protons. L'étude du spectre HSQC (Figure 23) montre seulement 4 taches de corrélations $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (entre 95 et 110 ppm) identifiées comme des carbones anomériques de configuration β . Ils sont nommés K (δ 4.73/105.4), L (δ 4.638/103.2), M (δ 4.66/102.9) et N (δ 4.67/107.8). Les autres protons de ce massif ne sont pas des protons anomériques car les déplacements chimiques des carbones qui les portent sont compris entre 74 et 81.5 ppm. Par ailleurs, aucun déplacement chimique de carbone compris entre 90 et 98 ppm, pouvant être attribué à une extrémité réductrice, n'est observable. La masse molaire de cette fraction (Mw 22600 g/mol) est trop élevée pour que de tels résidus soient détectables.

– Attribution des signaux et identification des différents résidus glycosidiques

L'attribution des signaux aux protons et aux carbones de chaque résidu a été réalisée suite à une interprétation simultanée des spectres en mode homonucléaire COSY DQF (Figure 24), TOCSY (Figure 25) et ROESY (Figure 26) pour les protons. En mode hétéronucléaire proton(s)-carbone HSQC et HMBC pour les carbones. Les résultats sont présentés dans le Tableau 18.

Résidus A

Dans le spectre 1D du proton, le massif des protons anomériques de A résulte de la superposition de plusieurs doublets (au moins 3). Cependant, le spectre TOCSY montre que les différents H-2, H-3, H-4 et H-5 correspondant aux différents H-1 de ce massif ont des déplacements chimiques identiques ou très voisins. Ceci montre qu'il s'agit toujours du même résidu dont le proton H-1 possède des environnements légèrement différents. La configuration α -galacto a été attribuée à ce résidu sur la base des déplacements chimiques des protons H-1 et H-2. Les spectres COSY et TOCSY permettent de remonter l'enchaînement jusqu'au H-5 sans ambiguïté. L'attribution des carbones est plus difficile. Elle est certaine pour les C-2 et C-4 qui ne sont pas substitués. Celle du C-3 a été faite en considérant qu'il n'y a pas de galactose substitué en 3 d'après les expériences de méthylation. Il s'agit donc d'un α -Galp-(1→.

Résidu B

Une configuration α -galacto a également été attribuée à ce résidu pour les mêmes raisons que pour le résidu A. Le déplacement chimique du C-4 à (δ 81.8) indique une liaison glycosidique sur cette position. L'attribution du H-5 à (δ 4.67) est douteuse car il est particulièrement déplacé vers les champs faibles. Si cette interprétation est correcte, il apparaît au même déplacement chimique que les protons anomériques β , et doit donc bénéficier d'un environnement particulier. Il est probablement très proche du groupement sulfate du résidu D (voir Détermination de l'enchaînement des résidus).

Résidu C

Les déplacements chimiques des protons et des carbones de ce résidu indiquent une configuration α -gluco. Aucun des carbones C-2, C-3 ou C-4 ne possède de déplacement chimique au-delà de 75.6 ppm, ce qui indique l'absence de substitution. Il est donc en position terminale. Par ailleurs, comme pour A, plusieurs formes de ce résidu semblent exister : en effet deux signaux minoritaires diffèrent de C uniquement par le déplacement chimique de leurs protons anomériques H-1 (δ 5.35) et (δ 5.24).

Résidu D

Le déplacement chimique particulièrement décalé vers les champs faibles du proton H-2 (δ 4.73) correspond à un proton dont le carbone porte un groupement sulfate. Les carbones C-3 (δ 80.0) et C-4 (δ 81.5) correspondent à des positions substituées engagées dans des liaisons glycosidiques. Une corrélation intra-résidu observée sur le spectre HMBC entre le proton H-4 (δ 4.68) et/ou H-5 à (δ 4.70) et le carbone C-6 (δ 177.6) indique que ce résidu est un acide uronique. L'ensemble des déplacements chimiques de D coïncident avec ceux du \rightarrow 3,4)- α -GalpA-(2SO₃⁻)-(1 \rightarrow) présents dans les oligosaccharides du H-GY785, précédemment décrit (résidu A').

Résidu	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$					
	1	2	3	4	5	6
A 4→)-α-Galp-(1→	5.49à5.57 100.8	3.79 71.3	3.86 71.5	4.03 72.3	4.12 67.1 à 73.5	- -
B →4)-α-Galp-(1→	5.40 102.8	3.86 71.5	3.93 71.5	4.13 81.8	4.67?	- -
C α-Glcp-(1→	5.32 102.1	3.50 75.0	3.74 75.6	3.46 72.2 ou 74.8	4.00 74.7	- -
D →3,4)-α-GalpA-(2SO ₃ ⁻)- (1→	5.26 101.2	4.73 76.9	4.25 80.0	4.68 81.5	≈4.7 74.6	177.6
E (C) α-Glcp-(1→	5.24 101.6	3.52 -	3.77 -	3.45 -	3.99 -	- -
F α- Glcp-(1→	5.20 102.8	3.47 72.2	3.78 76.1	3.47 72.2	4.00 74.7	- -
K β-Glcp-(1→	4.73 105.4	3.31 76.1	3.78 76.1	3.55 80.5	3.48 74.9	3.89 et 3.68 63.5
L β-Glcp-(1→	4.64 103.2	3.33 76.1	3.78 -	3.86 -	- -	- -
M 2,4→)-β-GlcpA-(1→	4.66 102.9	3.44 82.8	3.76 ≈79	3.86 ≈79	- -	- 180.0
N 3,4→)-β-GlcpA-(1→	4.67 106.8	3.53 ≈75	3.78 83.0	4.05 80.5	3.91 79.7	- 180.0

 Tableau 18 : Tableau récapitulatif des déplacements chimiques de SE GY785 (à 55°C dans D₂O)

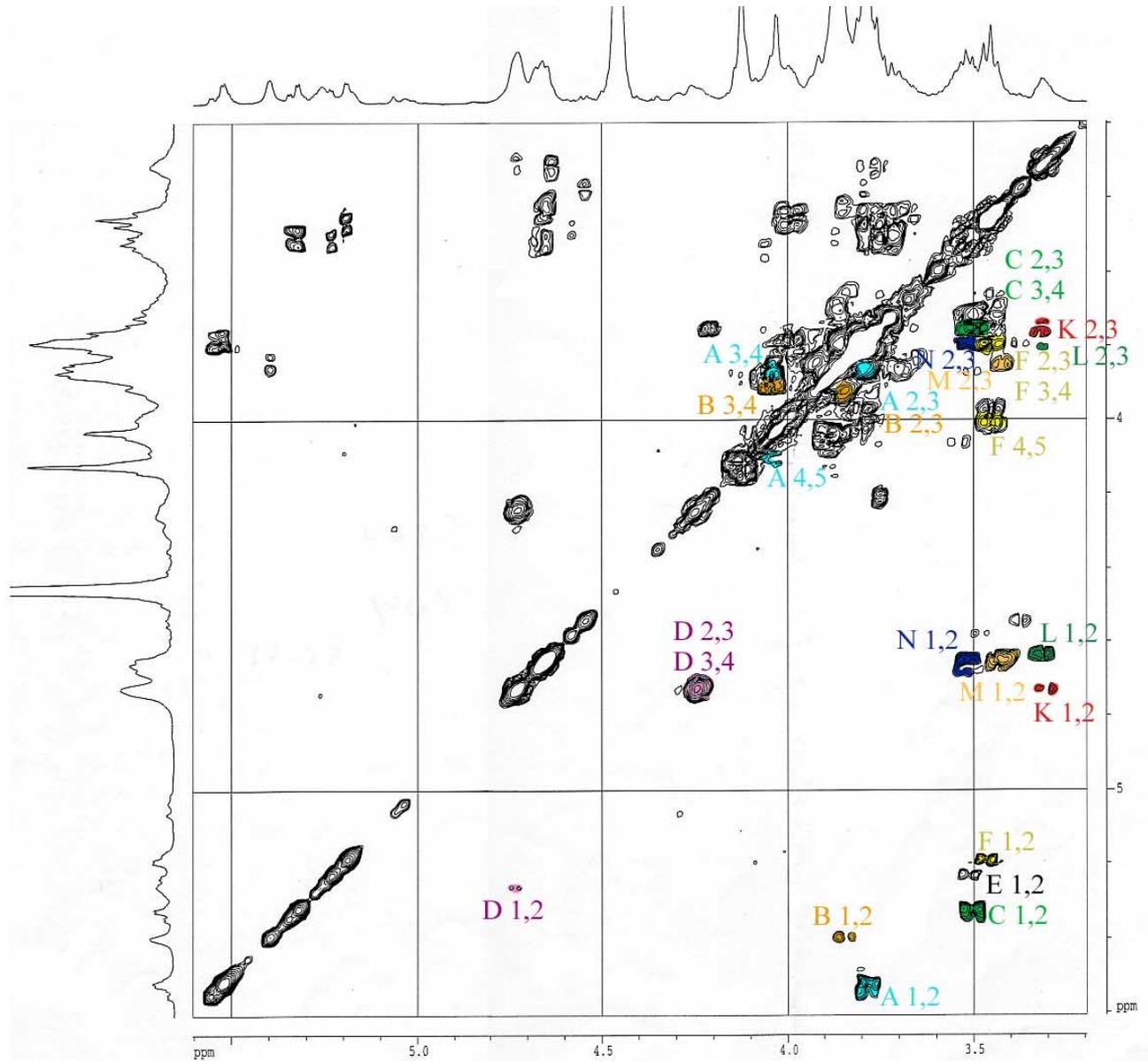


Figure 24 : Spectre RMN COSY DQF de la fraction SE-GY785 (300 K, 500 MHz)

Résidu E

Comme pour C, les déplacements chimiques indiquent une configuration α -*gluco*. L'intégration du proton anomérique de ce résidu indique qu'il ne représente que 0.5 proton, E est donc un résidu minoritaire.

Résidu F

Les déplacements chimiques des protons et des carbones de ce résidu indiquent une configuration α -*gluco*. Comme pour C, aucun des carbones C-2, C-3 ou C-4 ne possède de déplacement chimique au-delà de 76.1 ppm, ce qui indique qu'il n'est pas substitué. F est donc un glucose en position terminale.

Résidu K

Une configuration β -*gluco* est attribuée à K sur la base des déplacements chimiques des H-1, H-2 et H-3. L'enchaînement de ce résidu a pu être suivi en TOCSY et COSY jusqu'aux H-6 (δ 3.89 ; 3.68). Leur présence et celle du C-6 à (δ 63.5) indiquent que ce résidu est un ose neutre. La position du C-4 à (δ 80.5) permet de conclure sans ambiguïté à un \rightarrow 4)-Glc p -(1 \rightarrow).

Résidu L

Le signal du proton anomérique de L à (δ 4.64) est très proche de celui de M (δ 4.66) et N (δ 4.67). Toutefois les déplacements chimiques des protons H-1 et H-2 sont conformes à la configuration β -*gluco*. Les déplacements chimiques des protons de ce résidu ont été extrêmement difficiles à attribuer, par conséquent, l'attribution des carbones est incertaine sauf pour C-1 et C-2. En protons 1D, l'intégration du massif situé entre 3.2 et 3.4 ppm comprend 1.5 protons. Or dans le spectre de HMQC, ce massif présente deux taches de corrélation avec le C-2 de L et le C-2 de K. L'intégration du H-1 de K montre qu'il représente un proton, le H-1 du résidu L ne représente donc que 0.5 protons, L est par conséquent un résidu minoritaire.

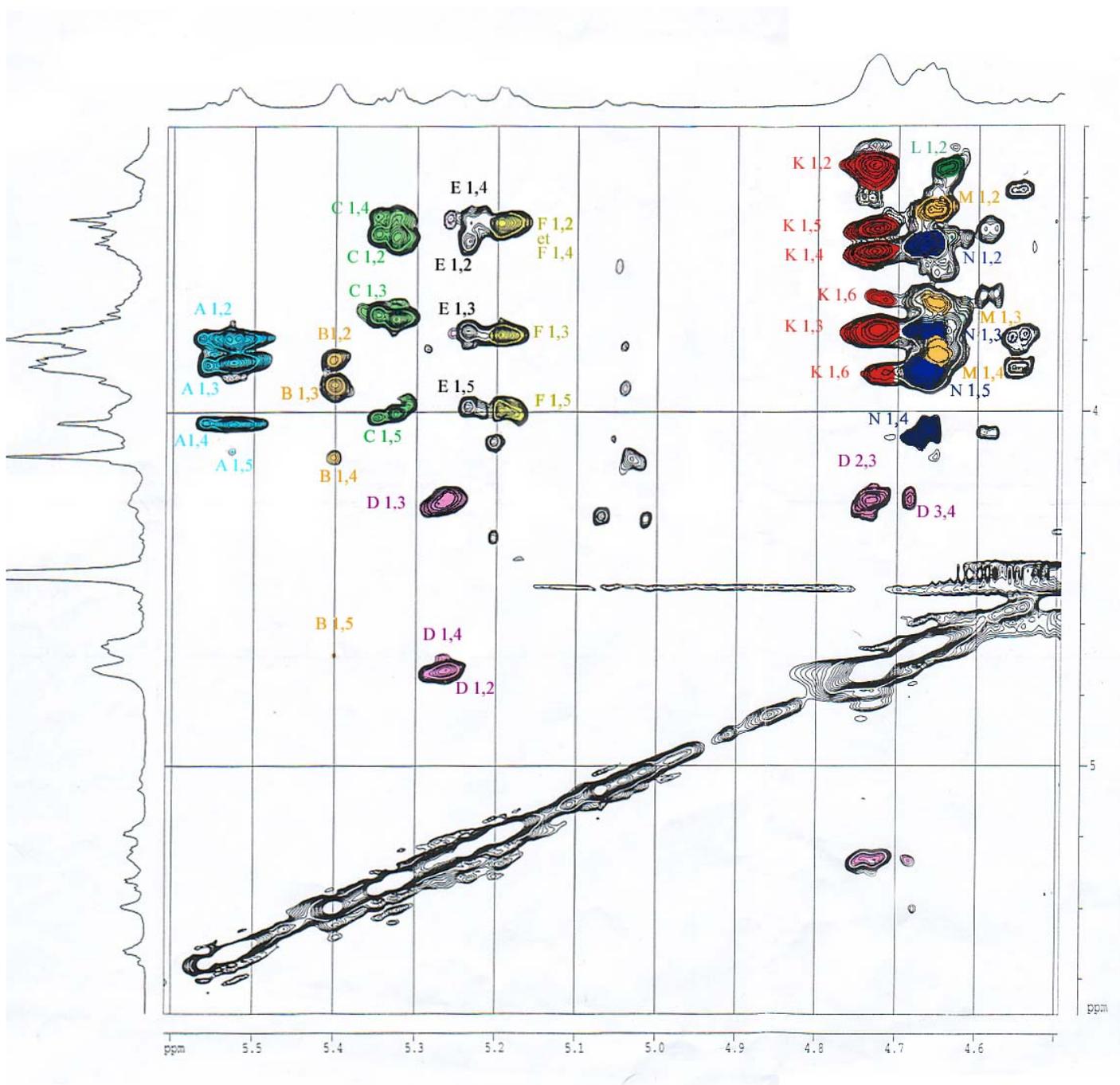


Figure 25 Spectre RMN TOCSY de la fraction SE-GY785 (300 K; 100 ms)

Résidu M

La superposition des déplacements chimiques des protons anomériques des résidus L, M, et N a rendu le spectre TOCSY difficilement interprétable. Néanmoins, d'après les déplacements chimiques des H-1, H-2 et H-3, attribués par l'interprétation simultanée des spectres TOCSY et COSY, il est possible de conclure à une configuration β -gluco. Les déplacements chimiques des carbones C-2 (δ 82.8) et C-4 (δ 79) permettent de conclure à des liaisons osidiques sur ces deux positions. Les résultats de l'analyse structurale des oligosaccharides de H-GY785 indiquent la présence de deux acides glucuroniques de configuration anomérique β . De plus les expériences de méthylation (GC/MS) ont mis en évidence l'existence de 2,4 \rightarrow)- β -Glc_pA-(1 \rightarrow), M correspond donc à ce résidu.

Résidu N

Comme le résidu M, les déplacements chimiques des protons H-1, H-2 et H-3 permettent de conclure à une configuration β -gluco pour N. Les déplacements chimiques des carbones C-3 (δ 83.0) et C-4 (δ 80.5) indiquent que ce résidu est également di-substitué sur les positions 3 et 4. Le résidu N est le 3,4 \rightarrow)- β -Glc_pA-(1 \rightarrow), identifié par GC/MS lors des expériences de méthylation.

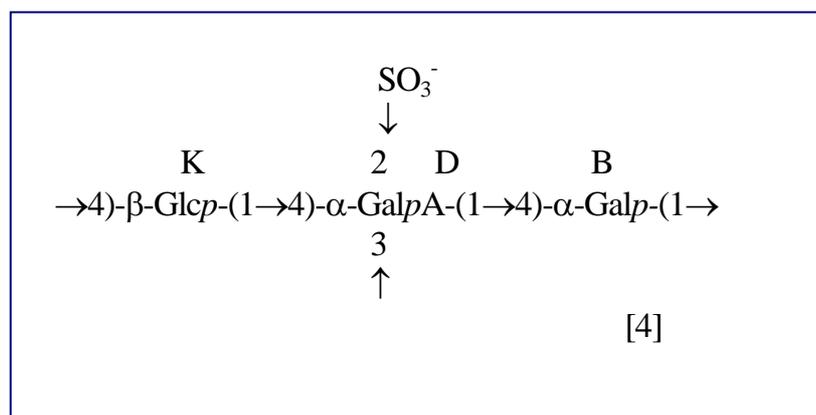
Les résidus identifiés sur les différents spectres de RMN sont en accord avec les PMAA mis en évidence lors de l'identification des liaisons glycosidiques par GC/MS. Cependant quelques résidus, comme le \rightarrow 2)- β -Glc_pA-(1 \rightarrow), le \rightarrow 4)- β -Glc_pA-(1 \rightarrow et le β -Glc_pA-(1 \rightarrow n'ont pas été identifiés par RMN. Ils sont donc présents en faibles proportions et proviennent probablement de perte des résidus en 4, en 3 ou/et en 2 du M et du N. En effet, entre 4.5 et 4.6 ppm, apparaissent des signaux très faibles correspondant à des protons de configuration anomérique β , qu'il a été impossible de caractériser de façon certaine.

– **Détermination de l'enchaînement des résidus**

Les spectres RMN des fractions SE-GY785 et EI-GY785 sont très semblables toutefois, l'intensité de certaines taches de corrélation inter-résidus en HMBC diffère de façon importante. La majeure partie des corrélations mises en évidence sur la fraction SE-GY785, par les spectres de ROESY a été confirmée par HMBC (corrélations $^3J_{C1-HX}$ et $^3J_{CX-H1}$ entre les atomes situés de part et d'autre de la liaison glycosidique). Trois corrélations sont très difficilement observables sur cette fraction mais intenses sur les spectres de la fraction EI-GY785. Elles sont notées par un * dans le Tableau 19 qui présente l'ensemble des corrélations mises en évidence.

La première étape de la détermination de la séquence a été de retrouver la structure de l'oligosaccharide 1 au sein de la fraction SE-GY785.

Une corrélation apparaît clairement sur les spectres de HMBC, entre le C-4 du résidu B (δ 81.8) et le proton H-1 du résidu D, c'est à dire entre un galactose non réducteur substitué en position 4 et le résidu D correspondant au $\rightarrow 3,4)\text{-}\alpha\text{-GalpA-(2SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow$ identifié dans le pentasaccharide de H-GY785. Une corrélation, visible en ROESY entre le H-1 de K (δ 4.73) et le H-4 de D indique que le résidu K est lié en position 4 au résidu D. Cette liaison est confirmée par une corrélation entre le proton le H-1 de K et le C-4 de D sur le spectre HMBC de EI-GY785. D'autre part, les spectres ROESY et HMBC de SE-GY785 indiquent une liaison entre le C-4 de K et le C-1 de B. Cette liaison démontre que la chaîne principale de l'EPS GY785 est constituée du trisaccharide K, D, B (voir élément de structure [4]).



Résidu (Proton anomérique δ_H)	liaison	Corrélations $^1H/^1H$ (ROESY) δ_H en ppm	Corrélations $^1H/^{13}C$ (HMBC) δ_C en ppm
A (δ 5.53)	A(1→4)M	3.79 A, H-2 et/ou M, H-3 3.86 A, H-3 et/ou M, H-4 3.44 M, H-2	71.5 A, C-3 78.9 M, C-4*
B (δ 5.40)	B(1→4)K	3.86 B, H-2 3.93 B, H-3 3.31 K, H-2 3.48 K, H-5 3.78 K, H-3	71.5 B, C-3 80.5 K, C-4*
C (δ 5.32)	C(1→3)N	3.46 C, H-4 3.50 C, H-2 et/ou N, H-2 3.74 C, H-3 3.78 N, H-3 4.05 N, H-4	75.6 C, C-3 74.7 C, C-5 83.0 N, C-3
D (δ 5.26)	D(1→4)B	4.73 D, H-2 4.25 D, H-3 4.68 D, H-4 et/ou D, H-5 3.93 B, H-3 4.13 B, H-4	81.8 B, C-4
F (δ 5.20)	F(1→2)M	3.47 F, H-2 4.00 F, H-5 3.78 F, H-3 3.44 M, H-2 3.86 M, H-4	76.1 F, C-3 82.8 M, C-2
K (δ 4.73)	K(1→4)D	3.31 K, H-2 3.78 K, H-3 3.48 K, H-5 4.68 D, H-4 4.25 D, H-3	81.5 D, C-4*
M (δ 4.66)	M(1→4)N	3.44 M, H-2 3.76 M, H-3 3.86 M, H-4	80.5 N, C-4
N (δ 4.67)	N(1→4)D	3.53 N, H-2 4.05 N, H-4 3.91 N, H-5 4.25 D, H-3	80.0 D, C-3

*Mis en évidence sur les spectres de la fraction EI-GY785.

Tableau 19 : Corrélations impliquant les protons anomériques observés sur les spectres ROESY et HMBC de la fraction SE-GY785.

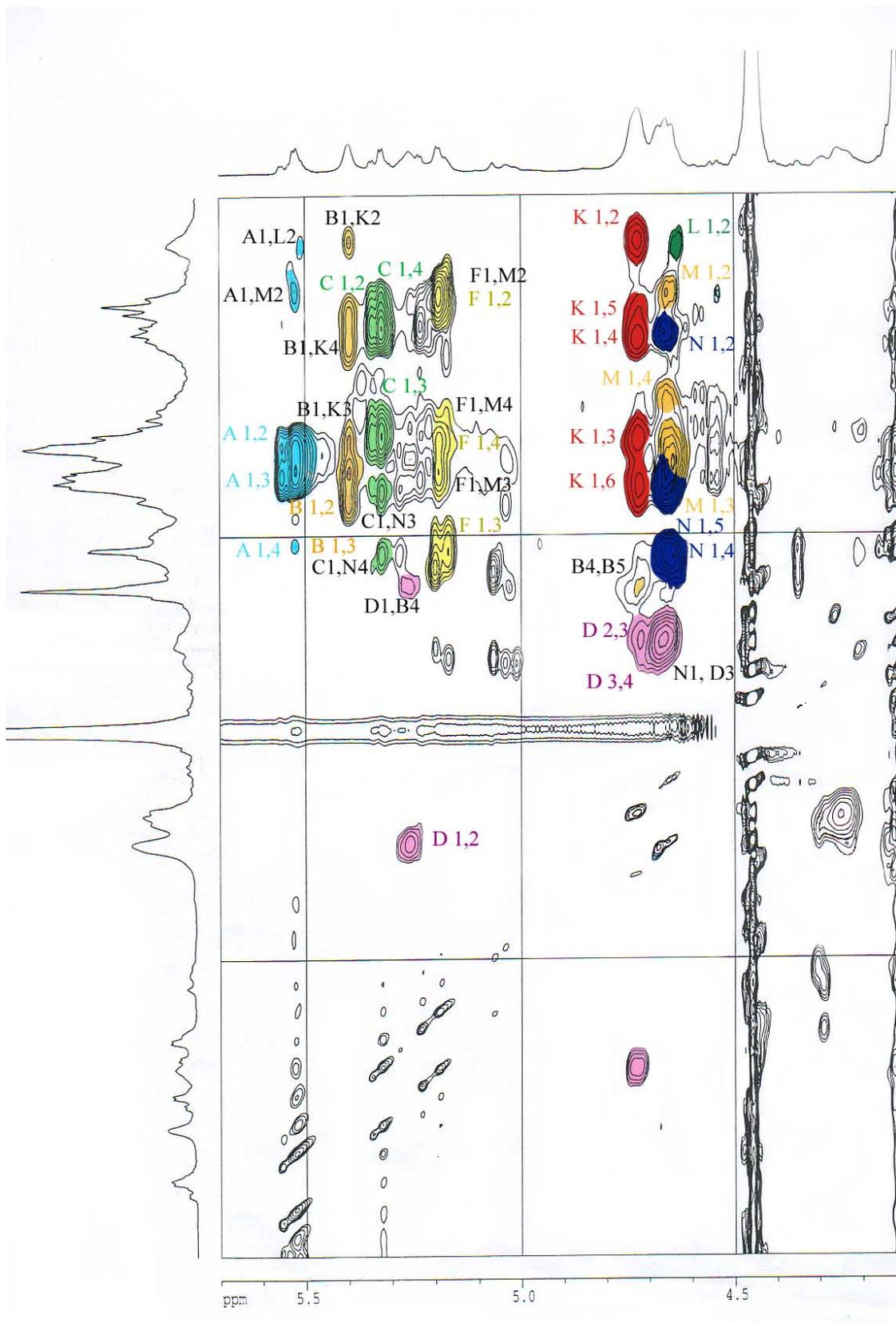
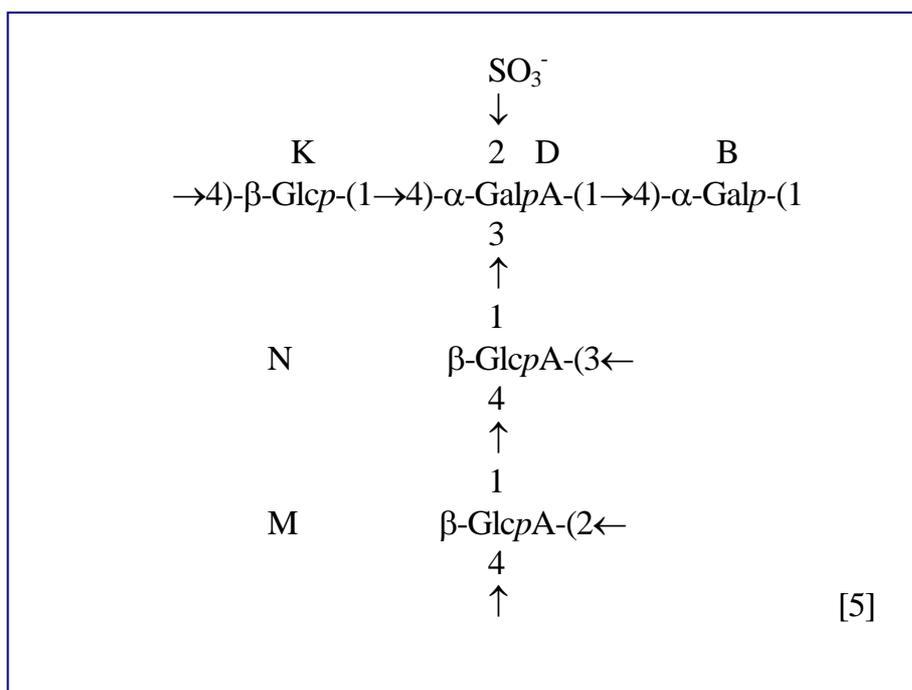


Figure 26 : Spectre RMN ROESY de la fraction SE-GY785 (300 K)

Le résidu D est le seul résidu, de la chaîne principale, engagé dans deux liaisons glycosidiques en 3 et en 4. Le trisaccharide suivant constitue le squelette de l'unité répétitive qui possède une unique ramification en 3 du résidu D :

Compte tenu de la structure des oligosaccharides de H-GY785, il est vraisemblable que la chaîne latérale soit constituée de deux acides glucuroniques.

La corrélation entre le proton H-1 de N et le C-3 de D indique que N est le premier résidu de cette ramification. La corrélation mise en évidence entre le H-1 de M et le C-4 de N mais surtout, la corrélation très nette entre le C-1 de M et le H-4 de N en HMBC permet d'établir la structure partielle [5] :

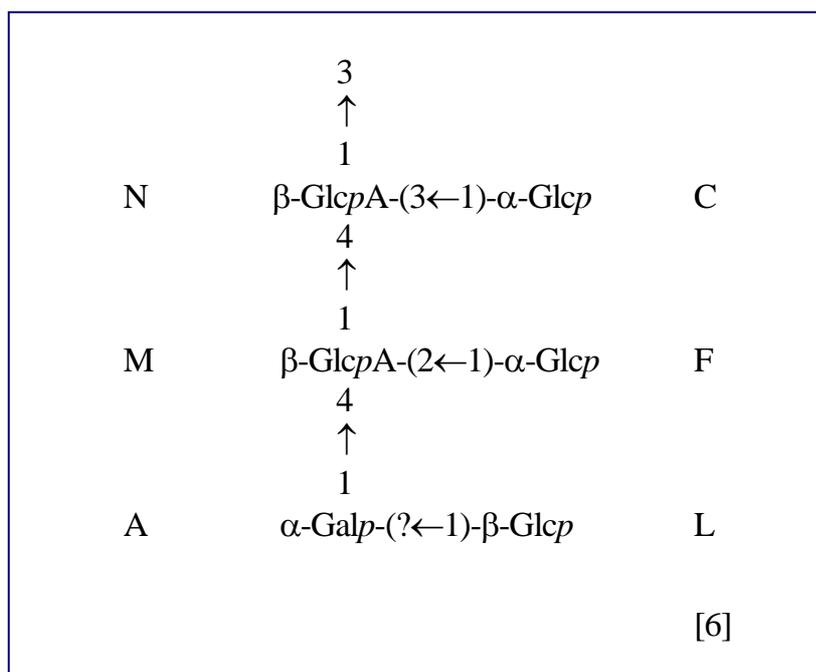


Les corrélations entre le H-1 de C (δ 5.32) et le C-3 de N (δ 83.0) en HMBC indiquent une liaison entre N et le glucose terminal C (élément de structure [6]). F a également été identifié comme un résidu en position terminale. Les corrélations entre le H-1 (δ 5.20) de F et le C-2 de M (δ 82.8) montrent le résidu F substitue M en position 2.

Le déplacement chimique relatif au C-4 de M (δ 79) et la corrélation avec le H-1 de A (δ 5.53) indiquent que A est lié à M. Cette corrélation est très intense sur les spectres HMBC de la fraction EI-GY785, mais très difficile à mettre en évidence sur ceux de la fraction SE-GY785.

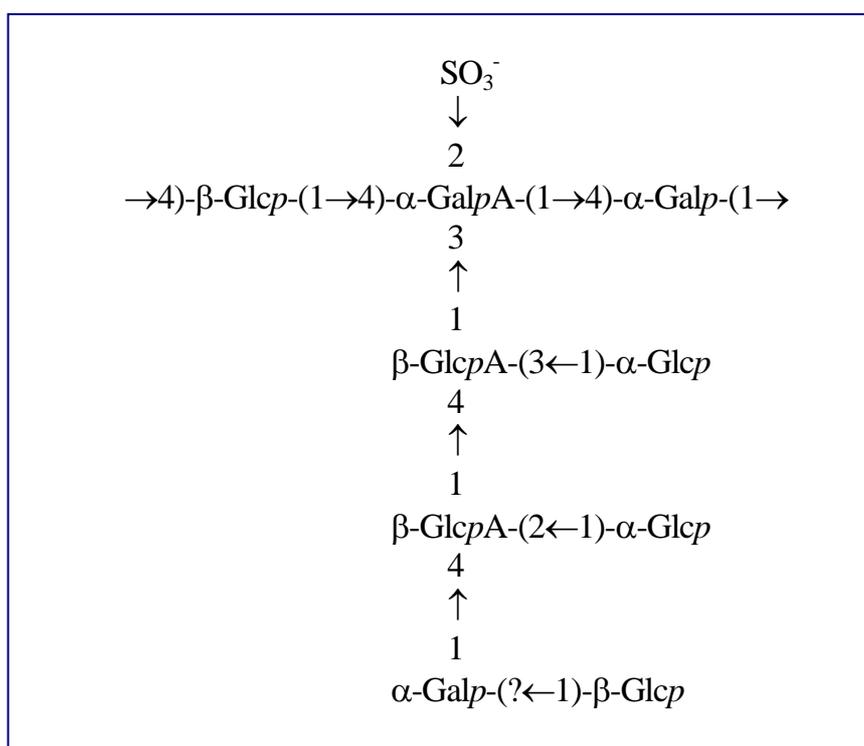
Sur les spectres ROESY, une corrélation est observable entre le proton H-1 de A (δ 5.53) et le H-2 de L (δ 3.33). Les signaux correspondant aux protons de ce résidu L sont mal résolus, il est difficile d'affirmer, par la seule interprétation du spectre ROESY, que le résidu L correspond à un glucose terminal qui substitue le résidu A. Or, l'hydrolyse de la liaison glycosidique entre deux oses neutres est plus facile que celle d'une liaison glycosidique entre un ose neutre et un acide uronique expliquant la proportion plus faible du résidu L dans les fractions hydrolysées. De plus, l'analyse des oses contenus dans l'ultra-filtrat après une hydrolyse dans des conditions douces, montre qu'il ne contient pas d'acide uronique (ni libre, ni lié), mais seulement du glucose libre, très peu de galactose libre et des quantités un peu plus importantes de glucose et de galactose liés. Les expériences de méthylation réalisées sur le polymère natif, révèlent par ailleurs la présence de $\rightarrow 6$ -Galp-(1 \rightarrow) qui pourrait correspondre au résidu A substitué en 6 par un ose neutre, et qui aurait perdu une partie de ce substituant lors de la préparation du H-GY785.

La structure suivante est proposée pour la chaîne latérale portée par le résidu D :



2.2.5.4 Conclusion

A l'issue des analyses chimiques et de l'interprétation des spectres de RMN des fractions EI-GY785 et SE-GY785, une hypothèse de structure a pu être proposée. Le squelette de ces fractions est constitué d'un trisaccharide. Celui-ci est composé de deux oses neutres et d'un acide galacturonique sulfaté en position 2 d'où part une ramification (en position 3).



Le polymère natif n'a pas pu être étudié directement par RMN du fait de sa masse molaire très élevée (10^6 g/mol). L'hydrolyse acide utilisée pour réduire cette masse introduit des irrégularités structurales qui apparaissent dans les composés EI-GY785 et SE-GY785. La structure de ces derniers reflète celle du polymère initial qui compte probablement une unité supplémentaire (le résidu L) qu'il n'a pas été possible de placer de façon certaine.

Cette étude a été particulièrement difficile en raison du manque de fiabilité des résultats déduits des expériences de méthylation. Ceci est probablement dû à la structure très ramifiée du polymère, qui conduit à de nombreuses sous-méthylations. En effet, l'acide galacturonique

tri-substitué (résidu D) n'apparaît jamais sous forme de $\rightarrow 2,3,4\text{-}\alpha\text{-GalpA-(1}\rightarrow$. La présence de ce résidu est une des particularités structurales de cet EPS qui se singularise également par la présence de chaînes latérales elles-mêmes ramifiées.

3. Modifications et Activité biologique des EPS

3.1. Matériel et méthodes

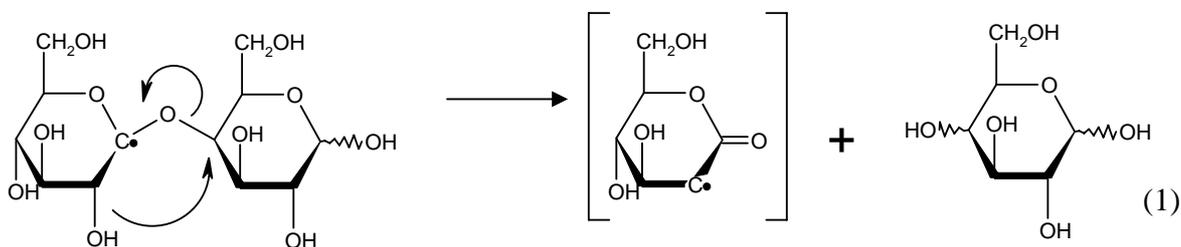
3.1.1. Modifications chimiques des EPS

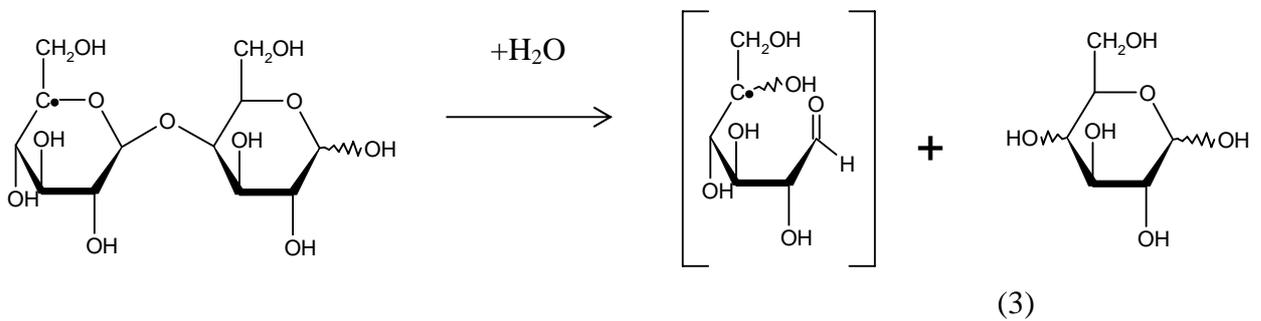
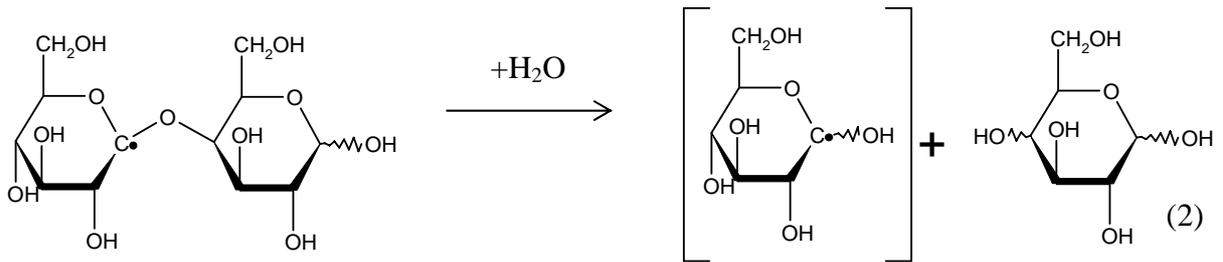
3.1.1.1 Préparation de polysaccharides de faible masse molaire par dépolymérisation radicalaire

Principe

Ce procédé de dépolymérisation est basé sur la formation de radicaux libres OH° à partir du système redox peroxyde d'hydrogène/ Cu^{++} . A pH neutre, les radicaux formés sont très réactifs sur le squelette des polysaccharides. De très nombreux réarrangements sont possibles, à partir des différents radicaux formés. Les réactions de réarrangements les plus fréquentes (Von Sonntag *et al.*, 1980) sont l'élimination d'eau (1) ou du radical HOR correspondant (2) ou (3), suivant la position du radical sur le squelette osidique.

Il résulte d'une large majorité de ces réarrangements, une rupture de la liaison glycosidique. Comme le montre les schémas, il se forme fréquemment des composés carbonylés qui sont ensuite stabilisés par une réduction avec le borohydrure de sodium.





Matériel

- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0.33% (Panreac)
- Membranes de dialyse (SPECTRA/POR) possédant un seuil de coupure de 3500
- Résine Chelex 100 (BIO RAD)
- Acétate de cuivre Cu(CH₃COO)₂ (Fluka)
- NaOH 1N
- Borohydrure de sodium (NaBH₄); (Sigma)
- Acide acétique glacial
- Réacteur maintenu à +60°C
- Pompe péristaltique (Pharmacia)

Montage

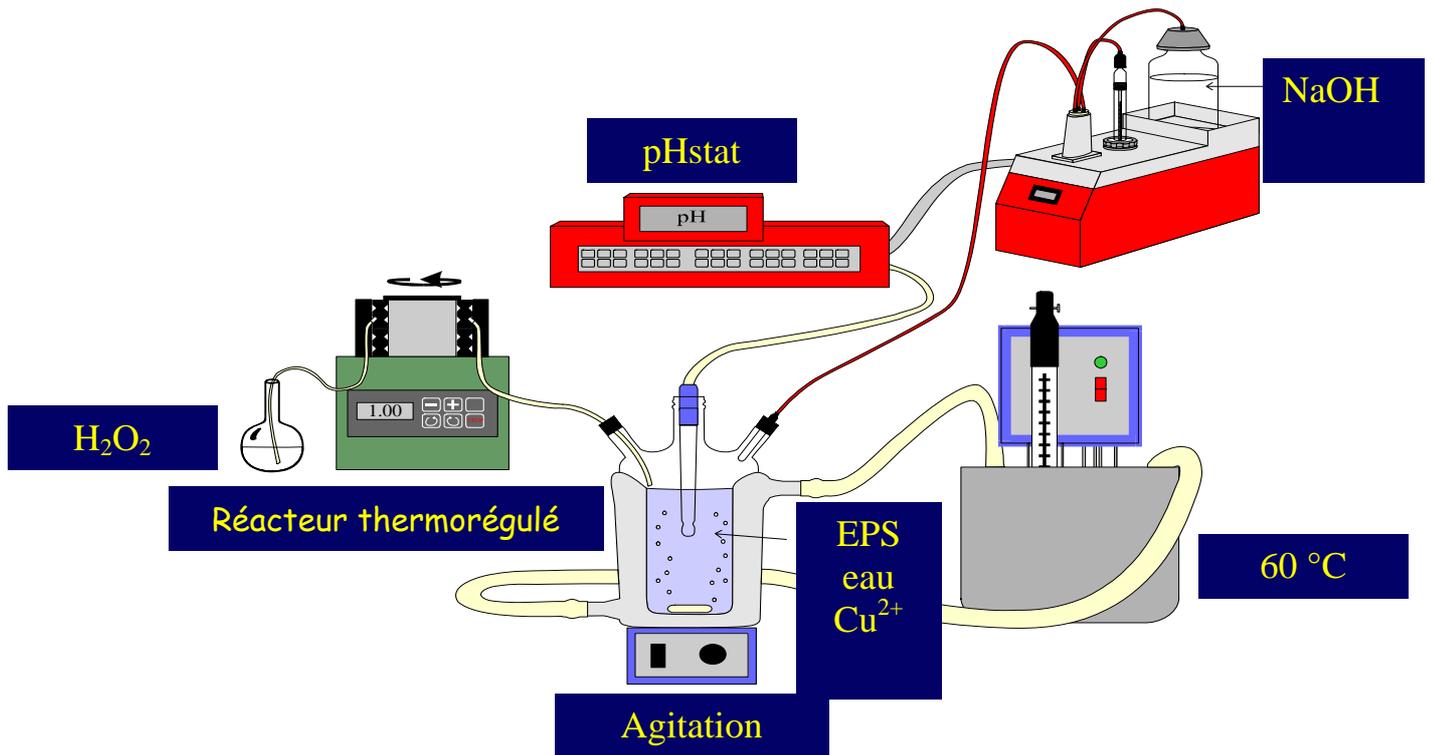


Figure 27 : Schémas du montage utilisé pour la dépolymérisation radicalaire

Modèles opératoires

Dépolymérisation radicalaire du HE800 (HE800DR)

500 mg d'exopolysaccharide sont lentement réhydratés pendant une nuit dans 80 ml d'eau milli-Q à 20°C, le lendemain, 10 ml d'acétate de cuivre (1.6×10^{-3} M) sont ajoutés. Le pH de cette solution est ajusté et maintenu à 7.5 par addition de NaOH 1 N pendant toute la réaction, le mélange est chauffé à 60°C.

Une solution d' H_2O_2 à 0.33% est ajoutée à raison de $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Des prélèvements sont effectués à 30 min, 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures et 5 heures.

Les rapports H_2O_2 /polysaccharide sont respectivement de 0.1, 0.2, 0.43, 0.7 et 1.0. Chaque prélèvement de 10 ml est ensuite purifié sur une résine Chelex 100 (20 ml) pour éliminer le cuivre puis dialysé 48 heures contre du bicarbonate d'ammonium 25 mM, en utilisant des membranes de dialyse possédant un seuil de coupure de 3500 Da. Le produit est finalement lyophilisé.

Lors de la préparation de quantités plus importantes de HE800DR (1 g), la réaction est effectuée en 1 h (pour un rapport H_2O_2 /polysaccharide de 0.43). Avant l'étape de purification par Chelex 100, le produit est réduit par addition d'une quantité de $NaBH_4$ (1 g), équivalente en masse à l'EPS de départ. Le mélange est agité 2h30 à température ambiante. L'excès de $NaBH_4$ est détruit par ajout d'acide acétique glacial jusqu'à la fin de l'effervescence, puis les étapes de purification sont reprises. La dialyse est remplacée par une ultra-filtration sur une membrane de 1 KDa, mieux adaptée aux quantités importantes.

Dépolymérisation radicalaire du GY785 (GY785DR) et du HYD721 (HYD721DR)

Pour la dépolymérisation de ces deux EPS, la technique de préparation de fraction de faible masse molaire, GY785DR et HYD721DR, est similaire à celle utilisée précédemment pour le HE 800. Seuls les rapports H_2O_2 /polysaccharide ont été modifiés. Dans le cas du GY785, un rapport H_2O_2 /polysaccharide de 0.52 a été retenu. Pour la dépolymérisation du HYD721 des

rapports de 0.39, 0.52 et 1 ont été testés. Tous les produits ont subi une réduction au NaBH_4 comme décrit précédemment, et ont été purifiés par ultra-filtration sur une membrane de 1 KDa.

3.1.1.2 *N*-désacétylation par l'hydrazine de HE800DR

Principe

La réaction de *N*-désacétylation par hydrazinolyse est réalisée suivant le protocole de Riesenfeld *et al.* (1990) et de Shaklee *et al.*, (1984). Le principe de cette réaction est schématisé sur la Figure 28 et correspond à l'attaque d'un nucléophile (NH_2NH_2) sur le carbone de la fonction amide.

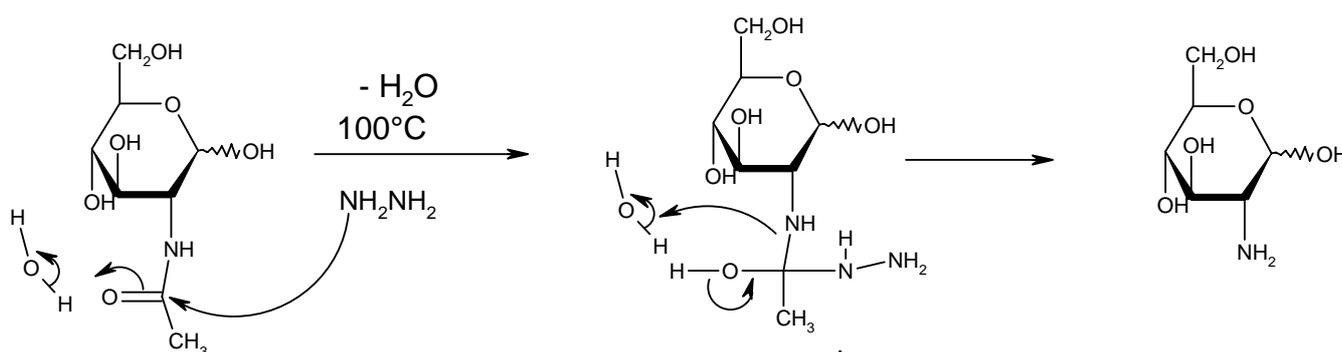


Figure 28: Mécanisme réactionnel de *N*-désacétylation du HE 800 par hydrazinolyse.

Réactifs

- Hydrazine (NH_2NH_2) 35 % (en masse) en solution dans H_2O (32.05 g/mol) ou hydrazine anhydre 1M dans le THF (Aldrich)
- Hydrazine sulfate H-3376 (Sigma)
- Toluène (Carlo Herba)
- Bicarbonate d'ammonium en solution aqueuse 0.1 M
- Tubes à vide "Vacuum Hydrolysis" (Pierce)
- Mélange éthanol et carboglace

- Membranes de dialyse (SPECTRA/POR) possédant un seuil de coupure de 3500 g.mol^{-1}

Mode opératoire

Solution d'hydrazine :

12.5 mg g d'hydrazine sulfate dans 1 ml d'hydrazine

12.5 mg de HE800DR sont déposés dans un tube à vide de 5 ml, 1 ml de la solution d'hydrazine est ajouté (le milieu réactionnel ne doit jamais dépasser 1/3 du volume du tube). La solution est alors congelée dans un mélange d'éthanol et de carboglace. Le vide est fait dans le tube. Le mélange est chauffé à 100°C dans un bain à sec pendant 3 h 30. Après refroidissement, les tubes sont débouchés, la repressurisation doit être audible. Pour la purification, 6 ml de toluène sont ajoutés et le mélange est évaporé sous jet d'azote. Lorsque le tube est sec, 6 ml de toluène sont de nouveau ajoutés et évaporés sous azote. Le polysaccharide est repris dans 10 ml de bicarbonate d'ammonium 0.1 M, agité au vortex et centrifugé. Le surnageant est dialysé contre du bicarbonate d'ammonium 25 mM en utilisant une membrane de seuil de coupure 3500 g.mol^{-1} . Le polysaccharide est congelé à -20°C puis lyophilisé.

3.1.1.3 *N*-désacétylation par la soude du HE800DR

Principe

Cette réaction de *N*-désacétylation est basée sur un mécanisme d'hydrolyse basique des amides en milieu aqueux. Le mécanisme est présenté sur la Figure 29, correspond comme pour la désacétylation à l'hydrazine à l'attaque d'un nucléophile (OH^-) sur le carbone de la fonction amide. Les conditions ont été adaptées de celles décrites par Zou *et al.* (1998).

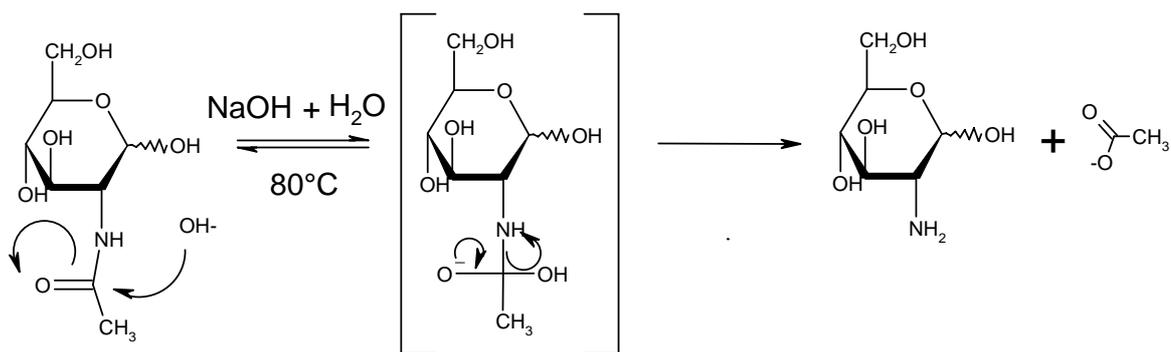


Figure 29 : Mécanisme d'hydrolyse basique d'un amide par la soude

Matériel

- HE 800 DR
- Borohydrure de sodium (NaBH_4) (Sigma)
- NaOH 1N contenant 1 % de NaBH_4 (p/p)
- Bain d'huile à 80°C
- Acide acétique glacial
- Membrane de dialyse 3500 (SPECTRA/POR)

Protocole

500 mg de HE800DR réduits sont solubilisés dans 25 ml de NaOH 1N contenant 1% de NaBH_4 . Cette solution est chauffée 1 h, à 80°C dans un bain d'huile, sous agitation. Lorsque le mélange est refroidi, l'excès de NaBH_4 est éliminé par addition d'acide acétique glacial jusqu'à la fin de l'effervescence (environ 2 ml). Le pH est alors neutre. 15 ml d'eau milli-Q sont ajoutés. Puis la solution est dialysée 4 fois contre de l'eau milli-Q, congelée à -20°C et lyophilisée.

3.1.1.4 Sulfatation des EPS de faible masse molaire

Principe

La réaction de sulfatation, par voie chimique, réalisée d'après les conditions de Nishino *et al.* (1992) est une esterification, des fonctions hydroxyles dans le N,N-diméthyl formamide (DMF) par l'anhydride de l'acide sulfurique (SO₃).

Matériel

- 60 mg d'EPS dépolymérisé
- 20 ml de résine Dowex HCR-S (Sigma) / forme H⁺ régénéré avec 200 ml d'HCl 1M puis de l'eau milli-Q jusqu'à neutralité.

- Pyridine, triéthylamine, tributylamine (Sigma)

- NaOH 1M

- DMF (N,N-diméthyl formamide) anhydre (Sigma) conditionné avec 1/3 v/v de tamis moléculaire de 4Å (Sigma)

- Bain d'huile à 45°C

- Complexe pyridine-SO₃ ("Sulfur trioxid pyridin"; Fluka)

- Membrane de dialyse 3500 (SPECTRA/POR)

Protocole

Préparation du polymère sous forme de sel :

60 mg d'EPS sont solubilisés dans 10 ml d'H₂O milli-Q. L'EPS est mis sous forme H⁺ par élution sur une colonne de résine Dowex :

L'élution est réalisée avec de l'eau milli-Q, environ un volume de colonne, l'éluat est collecté tant que le pH reste acide. Le pH est immédiatement ajusté à 6.5 avec la base désirée, (pyridine, triéthylamine, tributylamine, soude). L'EPS sous forme de sel est alors congelé à -20°C et lyophilisé.

Puis pour la sulfatation, l'EPS sous forme de sel est dissous dans les 25 ml de DMF anhydre en l'agitant pendant 1 h à température ambiante sous argon, avec du tamis moléculaire (1/3 du volume réactionnel). Lorsque la solution est parfaitement limpide, 300 mg de complexe

pyridine-SO₃ (5 fois la masse du polysaccharide) sont ajoutés, le mélange est chauffé 24 h à 45°C sous agitation. Le mélange réactionnel est transféré dans un bécher sans le tamis. La réaction est alors stoppée par addition de 2 ml d'eau milli-Q. Le pH est amené à 9 avec NaOH 1M (environ 1,4 ml).

Le mélange est alors placé dans un boudin de dialyse, il faut laisser beaucoup d'espace dans le boudin pour l'hydratation de l'EPS et dialysé d'abord contre de l'eau du robinet (1 nuit avec de l'eau courante) puis trois fois pendant 24 h contre de l'eau milli-Q.

Le contenu des boudins est filtré si la présence de particules insolubles est observée, puis congelé à -20°C et lyophilisé.

3.1.1.5 Phosphatation des EPS de faible masse molaire

Principe

La phosphatation est réalisée par une estérification par de l'acide orthophosphorique des hydroxyles de la chaîne polysaccharidique, en solution dans le DMF et l'urée d'après Khanal *et al.* (2001). L'ester-phosphate formé possède une structure très proche de l'ester-sulfate obtenu par sulfatation.

Matériel

- Urée (Sigma)
- DMF (N,N-dimethyl formamide) (Sigma)
- Acide ortho-phosphorique 84% (Prolabo)
- Méthanol (Carlo Erba)
- Bain d'huile à 120°C.
- Colonne réfrigérée
- Membrane de dialyse 3500 (SPECTRA/POR)

Protocole

Une solution de DMF contenant 100 % d'urée (p/v) est chauffée à 100°C dans un bain d'huile afin d'obtenir une solution limpide.

7.5 ml de cette solution sont placés dans un ballon de 100 ml sous agitation permanente dans un bain d'huile. Lorsque la température a atteint 120°C, 200 mg d'EPS de faible masse molaire réduit avec du NaBH₄ sont ajoutés.

Lorsque le polymère est dissous, 1.25 ml d'acide orthophosphorique sont ajoutés. Le mélange est alors maintenu à 120°C sous agitation pendant 3h30. Le ballon est équipé d'une colonne réfrigérée afin d'éviter l'évaporation du solvant. Après refroidissement, le DMF et l'urée sont éliminés par 4 rinçages avec 50 ml de méthanol. Le précipité est séché sous azote et repris dans 20 ml d'eau milliQ.

Cette solution est dialysée contre de l'eau du robinet (1 nuit avec de l'eau courante) puis trois fois 24 h contre de l'eau milliQ.

Le contenu des boudins est filtré si la présence de particules insolubles est observée, congelé à -20°C et lyophilisé.

3.1.2. Caractérisation physico-chimique des dérivés

3.1.2.1 Détermination de la masse molaire par HPSEC

Principe

Les dérivés d'EPS préparés lors de cette étude peuvent être chargés ou non et possèdent des masses molaires très variables. Trois systèmes HPSEC ont été utilisés pour estimer au mieux les masses molaires de tous les dérivés en fonction de leur nature. Des standards de pulullanes ont été utilisés pour la détermination des dérivés les moins chargés, le système est appelé "système pulullane" et donne des masses en équivalent pullulanes. Des héparines de bas poids moléculaire (HBPM) ("système héparines de bas poids moléculaire, HBPM") ont servi de standards de calibration pour estimer la masse molaire des dérivés sulfatés de faible masse molaire (masses comprises entre 1 000 et 10 000 g.mol⁻¹ environ). Des héparines de plus hautes

masses ont été utilisées pour la calibration du "système héparines non fractionnées, HNF" pour les dérivés de masses molaires comprises entre 5 000 et 40 000 g/mol environ), les masses sont données en équivalent HNF.

Protocole

Système pulullanes

Le protocole de détermination des masses molaires par HPSEC est décrit dans le chapitre 2.

Système HBPM et système HNF

Les mesures de masses molaires utilisant des héparines comme standards ont été réalisées au "National Institute for Biological Standards and Control" par B. Mulloy. Le protocole est décrit par Mulloy *et al.* (1997). Les colonnes utilisées pour le système "HBPM" sont une TSK G3000SWXL et une colonne TSK G2000SWXL en séries. Le système "HNF" utilise une colonne TSK G4000SWXL et une colonne TSK G3000SWXL en série. La phase mobile est de l'acétate d'ammonium 0.1M et la détection est effectuée par réfractométrie.

3.1.2.2 Détection des ions libres

Test à l'acétate de baryum

Principe

Ce test permet de détecter des quantités de sulfates libres en solution, de l'ordre de 10^{-5} g.l⁻¹. La présence de sulfates libres provoque immédiatement un précipité de sulfate de baryum. Cette technique de précipitation des ions sulfates est également utilisée afin de débarrasser une solution des sulfates libres qu'elle contient.

Matériel

- Acétate de baryum (CH_3COOBa) (Prolabo)
- Sulfate de sodium (SO_3Na_2) (Prolabo)

Protocole

Une solution à 90 mg.ml^{-1} d'acétate de baryum est préparée (elle peut être gardée plusieurs mois à -4°C).

100 μl de cette solution sont ajoutés à 900 μl de la solution à doser (5 à 10 mg.ml^{-1} pour une solution de polysaccharide). Le mélange est agité au vortex puis sa turbidité est mesurée. Une gamme étalon peut être préparée à l'aide de solutions de différentes concentrations de Na_2SO_3 .

Dosage des anions en solution par chromatographie d'échange d'ions

Les sulfates libres sont quantifiés par chromatographie d'échange d'ions sur un système DX-500 relié à un conductimètre (Dionex) suivant la méthode décrite par Dionex®.

3.1.2.3 Spectroscopie Infrarouge

Les spectres infrarouges à transformé de Fourier (FT-IR) des dérivés d'EPS lyophilisés ont été réalisés en pastilles de KBr (2 mg de polysaccharide sont mélangés à 200 mg de KBr sec). Tous les spectres infrarouges ont été enregistrés entre 4000 et 400 cm^{-1} , sur un Vector 22 possédant une résolution de 4 cm^{-1} .

3.1.3. Etude de l'activité anticoagulante

Tous les tests ont été réalisés au Laboratoire Hématologie/Hémostase à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques à Paris.

Temps de céphaline activée

Le temps de céphaline activé (TCA) explore la voie de la phase contact classiquement appelée “ voie endogène ” de la cascade de la coagulation. Celle-ci est déclenchée dans le test par adjonction d’un mélange d’acide éllagique, de phospholipides et d’une solution de calcium. L’effet des différents dérivés d'EPS est mesuré et comparé à une héparine de faible masse molaire (Daltéparine, Fragmine, 160 antiXa IU.mg⁻¹) de chez Kabi Pharmacia (St. Quentin, France).

Temps de thrombine

Ce test mesure le temps de coagulation du plasma citraté en présence de thrombine. Il explore donc la dernière phase de la coagulation ou fibrinofomation à l'exception du facteur XIII. Le temps de thrombine (TT), permet de mettre en évidence une inhibition de la thrombine (ajoutée à la concentration de 5 unités NIH.ml⁻¹ dans le test) par ses deux inhibiteurs naturels présents dans le plasma. Le temps de coagulation est mesuré sans (témoin) ou en présence de polysaccharides (héparine de bas poids moléculaire et dérivés d'EPS de faible masse, sulfatés) qui sont dilués à différentes concentrations dans le plasma humain pauvre en plaquettes (PPP). L’effet anticoagulant des polysaccharides est observé par un allongement des temps de coagulation par rapport aux temps témoins.

Electrophorèse d’affinité

Principe

L’affinité des polysaccharides pour l'antithrombine humaine (AT) ou le deuxième cofacteur de l'héparine (HCII) a été analysée par électrophorèse d’affinité d’après la technique de Lee *et al.* (1991). Ces deux protéines sont des serpinés (inhibiteurs des sérines protéases). Dans ce type d'électrophorèse, les chaînes polysaccharidiques migrent dans l’agarose à travers une zone contenant la protéine ou un témoin. A pH neutre, la mobilité électrophorétique des polysaccharides est plus importante que celle des serpinés plus faiblement chargées et la liaison des chaînes osidiques aux protéines provoque une diminution de leur mobilité.

Matériel

➤ Cuve de migration : Affinity co-electrophoresis system (A.C.E.), (owl Scientific)
➤ Réfrigérant réglé à +5°C: (Hubert Bioblock)
➤ Bain-marie à 37 °C
➤ Un premier peigne sert à réaliser les auges horizontales de 2 mm de largeur destinées aux dépôts des polysaccharides. Un deuxième peigne sert à réaliser les auges verticales, de 15 mm de longueurs, destinées aux protéines.

- Gel Bond Film : (84 x 94 mm) (Pharmacia)
- Agarose : Low Melt Preparative grade (Bio Rad)
- Héparine non fractionnée ("porcine mucosa") (Sigma)
- Antithrombine humaine (AT) 5 unités/mg (Chromogenix)
- Deuxième cofacteur de l'héparine (HCII) 1PEU/100 µg (Diagnostica Stago)
- Acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique (MOPSO), (Sigma)
- Acétate de sodium (CH₃COONa, 3H₂O): (Merck)
- EDTA (Prolabo)
- 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), (Fluka)
- Bleu de bromophénol (Merck)
- Sucrose (Fluka)
- Bleu de Toluidine (Sigma)
- Cetavlon (Merck)

Protocole

Préparation du tampon d'électrophorèse.

12.36 g de MOPSO (50 mM), 17.01 g de CH₃COONa (125 mM) et 0.372 g d'EDTA (1 mM) sont mélangés puis complétés à 1 l avec de l'eau milli-Q, le pH est ajusté à 7.0 avec de l'HCl 2N puis le tampon est filtré sur 0.45 µm.

Préparation du CHAPS 10 %.

0.1 g de CHAPS sont dissous dans 10 ml de tampon d'électrophorèse.

Préparation de l'allourdisseur 8X.

480 mg de sucrose, 3.2 mg bleu de bromophénol, et 400 µl CHAPS 10 % sont complétés à 1 ml avec le tampon d'électrophorèse.

Préparation du CHAPS 0.5 %.

0.1 ml CHAPS 10 % sont complétés à 2 ml avec de tampon d'électrophorèse.

Préparation gel d'agarose 1.5 %.

Pour un gel, 450 mg d'agarose dans 30 ml de tampon sont portés à ébullition jusqu'à dissolution complète de l'agarose. 25 ml sont mesurés, 1.2 ml de CHAPS 10 % sont ajoutés et le mélange est conservé à 70°C.

Préparation gel d'agarose 3%.

120 mg d'agarose et 4 ml de tampon d'électrophorèse sont portés à ébullition puis 175 µl de CHAPS 10 % sont ajoutés

Coulage du gel:

Dans un couleur de gel, une feuille de Gel Bond (10 x 7.5cm) est disposée sur le fond du support, le mélange agarose 1.5 % et CHAPS y est ensuite coulé en une seule étape. Le peigne (auges horizontales) est placé à environ 5 mm du bord supérieur du gel et aussitôt le peigne (auges verticales) est installé à 5 mm du précédent. Après 20 minutes, les peignes sont retirés, ils sont décollés légèrement en haut puis en bas avant d'être soulevés. Si le gel n'est pas utilisé immédiatement, il peut être conservé dans une atmosphère humide à 4°C.

Le gel est ensuite placé sur la plaque de la cuve de migration avant de remplir la cuve de tampon (ne pas recouvrir le gel). Les auges horizontales sont marquées avec 10 µl d'allourdisseur dilué au 1/10 par auge.

Pour couler les protéines dans les auges verticales, l'agarose 3 % est diluée en présence de protéine. Différentes dilutions de protéines dans le tampon d'électrophorèse en présence de CHAPS 0.5 % sont préparées. Dans un tube Eppendorf placé dans un thermomixeur thermostaté à 37 °C, 120 µl d'agarose 3 % sont ajoutés avec une pointe chaude à 120 µl de la dilution de protéine à différentes dilutions et 200 µl sont rapidement déposés dans chaque auge verticale. 20 minutes sont nécessaires pour que l'agarose contenant la protéine se solidifie.

Préparation des échantillons

Une dilution de l'échantillon de polysaccharide dans du tampon contenant du CHAPS 0.5 % et de l'allourdisseur 8X est faite. Le dépôt est de 10 µl par auge horizontale. Pour préparer un dépôt de 20 µg il faut mélanger 20 µl échantillon (10 mg.l^{-1}), 7 µl d'allourdisseur 8X et 63 µl de tampon contenant du CHAPS 0.5 %, centrifuger et déposer 10 µl par puits. La cuve est ensuite remplie avec le tampon d'électrophorèse afin que le gel soit recouvert de 0.5 à 1 cm.

Migration:

- Ampérage 500mA
- Voltage ~ 60V

La migration peut être variable, environ 3h30, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas des auges verticales.

Fixation

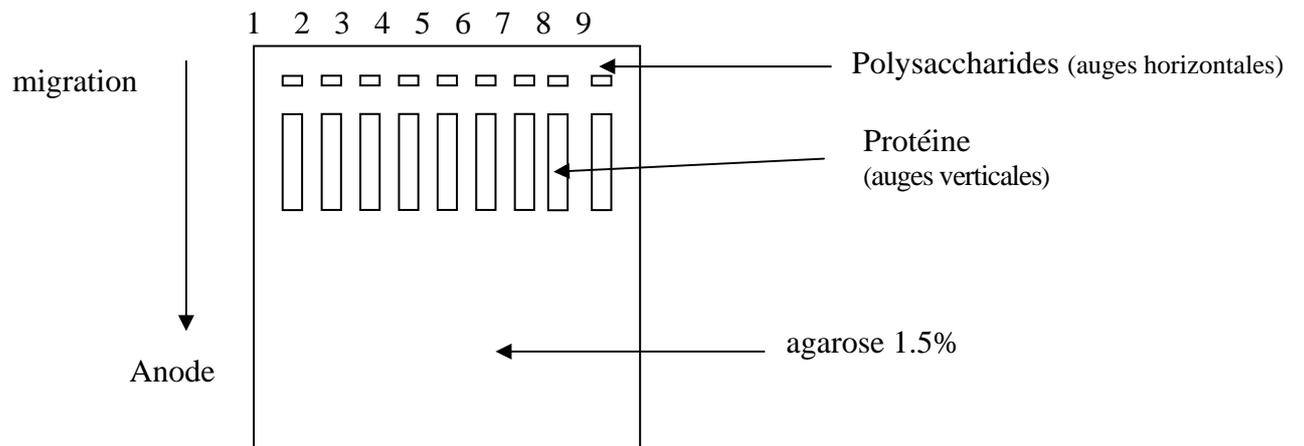
Le gel est placé dans une solution à 0.2 % de cetavlon en milieu tampon, pendant 3 h, sous agitation, puis il est séché dans une étuve ventilée avant d'être coloré.

Coloration et décoloration

La coloration est réalisée dans une solution à 0.2 % de bleu de toluidine dans un mélange: éthanol-eau-acide acétique (80:18:2), pendant 30 minutes. Le gel après coloration est rincé avec de l'eau milli-Q, puis décoloré dans différents bains successifs de décolorant composé d'un mélange éthanol-eau-acide acétique, (250:245:5).

Le gel est finalement séché 1 h dans une étuve ventilée.

Schéma du gel :



3.2. Résultats et discussion

Les polysaccharides sulfatés forment un groupe de macromolécules connues pour leurs nombreuses activités biologiques. L'héparine d'origine animale est un mélange très hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées extraites d'organes richement vascularisés (poumons de bœuf, intestins de porc). Elles présentent en effet, une hétérogénéité chimique (variation du nombre de groupements sulfates et acétyles), une hétérogénéité de taille (les chaînes d'une HNF peuvent varier de 10 à 20 KDa), et une hétérogénéité d'activité (seulement un tiers des chaînes présentent un site spécifique de liaison à l'antithrombine III). L'héparine est largement utilisée comme agent thérapeutique anticoagulant et antithrombotique, mais elle présente des effets secondaires indésirables (risque hémorragique, thrombopénie induite par l'héparine), par conséquent, son utilisation présente des limites.

De nombreuses études sont en cours pour développer de nouveaux outils thérapeutiques de substitution. Il est maintenant établi que les groupements sulfates jouent un rôle prédominant dans l'activité antithrombotique de l'héparine. Les propriétés anticoagulantes de différents polysaccharides chargés (sulfatés ou phosphatés) comme le dermatane sulfate, les fucanes, la chondroïtine sulfate ou le dextrane sulfate, ont donc été évaluées afin de développer des produits de substitution à l'héparine.

La préparation de produits bioactifs à partir de molécules bactériennes et non d'origine animale, évite le risque de contamination par des agents pathogènes, parfois présents dans les tissus de mammifères par exemple (virus, prion). Les EPS bactériens représentent une source potentielle importante de nouvelles structures polysaccharidiques. Mais les produits natifs ne possèdent aucune activité anticoagulante. Leur masse molaire est généralement de l'ordre de 10^6 g.mol⁻¹ et une large majorité d'entre eux forme un gel ou une solution visqueuse en milieu aqueux. Leur dépolymérisation est donc indispensable afin de les rendre compatibles avec une utilisation médicale: solubilité suffisante, absence de formation de gel. L'apport de groupements fonctionnels chargés par sulfatation ou phosphatation pourrait conduire à de nouveaux dérivés aux propriétés innovantes.

3.2.1. Dépolymérisation des EPS

Différentes techniques peuvent être utilisées pour la préparation de polysaccharides de faibles masses molaires. La dépolymérisation par voie enzymatique apparaît comme la plus efficace pour réduire l'hétérogénéité des chaînes polysaccharidiques. Mais la spécificité des enzymes, capables de couper la liaison glycosidique, est telle que chaque polymère demande une recherche longue et souvent infructueuse. Une solution consiste à sélectionner et tester des enzymes de la bactérie qui produit l'EPS, mais cette entreprise de longue haleine n'a pas pu être réalisée dans le cadre de ce travail.

La dépolymérisation acide est probablement la technique la plus utilisée, pour les études structurales d'un polymère lorsqu'aucune enzyme n'est disponible. La préparation de solutions de monosaccharides et de petits oligosaccharides est possible sur tous les polysaccharides (voir chapitre 2) mais demande toutefois des conditions différentes pour chacun. Cependant, les produits obtenus par dépolymérisation acide peuvent subir quelques modifications, comme perte de substituants (Rougeaux *et al.*, 1998), la perte de chaînes latérales, la destruction de monosaccharides fragiles (Dubreucq *et al.*, 1996).

La dépolymérisation radicalaire a été choisie, lors de cette étude, pour la préparation de dérivés de faibles masses molaires pour les raisons suivantes : c'est une technique récente et innovante utilisée pour la dépolymérisation de GAG (Volpi, 1994). Aucune étude structurale n'a été menée, jusqu'alors, sur les modifications structurales générées par les radicaux hydroxyles sur des EPS. Enfin, des études réalisées sur les fucanes montrent que cette technique est transposable à l'échelle industrielle (Chevolot *et al.*, 1999).

3.2.1.1 Dépolymérisation radicalaire du HE 800

– Cinétique de dépolymérisation

Les tests de dépolymérisation radicalaire, conduits sur le HE 800 natif d'une masse molaire de 10^6 g.mol⁻¹, sont adaptés des conditions de Volpi (1994) utilisées pour la dépolymérisation des GAG et celles utilisées au laboratoire pour la dépolymérisation du fucane (Nardella *et al.*, 1996). La cinétique de dépolymérisation a été réalisée en effectuant des prélèvements à 30 min,

1 heure, 2 heures, 3 heures et 4 heures, pour des rapports H₂O₂/polysaccharide respectifs de 0.1, 0.2, 0.43, 0.70 et 1. Les masses molaires, déterminées par HPSEC données en équivalent pullulanes ainsi que les rendements de chaque fraction, sont présentés dans le Tableau 20.

Les résultats montrent que les conditions utilisées permettent d'obtenir rapidement des chaînes polysaccharidiques de faibles masses molaires. En effet, une masse molaire au pic inférieure à 20 000 g/mol est obtenue après 30 minutes de réaction, à partir de l'EPS natif (10⁶ g.mol⁻¹) avec un rendement supérieur à 80 %. Puis entre 1 h et 4 h de réaction, la masse molaire au pic décroît régulièrement de 8 500 à 2 500 g/mol avec des rendements qui varient entre 65 et 45 %. La dépolymérisation augmente en fonction du rapport H₂O₂/EPS.

H ₂ O ₂ /HE 800 ^a	Mp ^b (g.mol ⁻¹)	Mw ^b (g.mol ⁻¹)	Mn ^b (g.mol ⁻¹)	I ^b	Rendements ^c (%)
0.1	19 000	17 500	6,000	2.9	82
0.2	8 500	12 000	3,700	3.2	65
0.43	6 500	6 500	2,800	2.3	45
0.7	5 000	4 600	2,400	1.9	53
1	2 500	4 700	1,500	3.3	53

^aRapport H₂O₂/ HE800 natif (w/w).

^b Mp (masse molaire au pic), Mw (masse molaire moyenne en poids), Mn (masse molaire moyenne en nombre), I (polydispersité). Les mesures ont été réalisées par HPSEC en utilisant des standards pullulanes.

^cCalculé à partir de la masse de HE800 natif de départ.

Tableau 20 : Masses molaires en équivalent pullulanes et rendements massiques obtenus lors d'une cinétique de dépolymérisation radicalaire sur le HE 800 natif

Des masses de 6 500 g.mol⁻¹ sont obtenues pour un rapport H₂O₂/EPS de 0.43. Ces conditions sont utilisées par la suite pour la préparation des fractions de HE800 de faibles masses molaires appelées HE800DR. Les chaînes osidiques sont systématiquement traitées par le NaBH₄ afin de stabiliser les extrémités réductrices et éliminer certains produits d'oxydation instables pouvant être formés (carbonyles, peroxydes...). Les produits, qui sont ensuite lyophilisés, peuvent être conservés plusieurs mois à l'abri de la lumière et de l'humidité.

– Etude de la structure du HE800DR

Une analyse structurale a été réalisée sur la fraction de $M_w = 4600 \text{ g.mol}^{-1}$ de façon à caractériser d'éventuelles modifications dues à l'action des radicaux libres sur l'unité répétitive du HE800. Cette fraction a subi un temps de réaction de 4 h pour un rapport $\text{H}_2\text{O}_2/\text{EPS}$ de 0.7.

Composition glycosidique du HE800DR

L'analyse des méthylglycosides-TMS, dont le protocole est décrit dans le chapitre 2, a été réalisée et comparée aux résultats obtenus à partir du HE 800 natif. Le Tableau 21 présente la composition osidique exprimée en rapports molaires.

EPS	GlcA	Gal-NAc	Glc-NAc
HE800 natif	2	1	1
HE800 DR (4 600 g.mol^{-1})	2	1	1

Tableau 21 : Analyse des méthylglycosides-TMS par GC du HE800 dépolymérisé par voie radicalaire.

Le HE 800 natif comme le HE800DR sont composés de GlcA, de Gal-NAc et de Glc-NAc dans des rapports molaires conformes aux résultats donnés par Rougeaux *et al.* (1999). Au regard des résultats de cette analyse, il n'apparaît pas de modification de la composition glycosidique après la dépolymérisation radicalaire.

Dosage élémentaire du cuivre dans le HE800DR

La réaction radicalaire est initiée et catalysée par le cuivre provenant de l'acétate de cuivre apporté au départ de la réaction. Le dosage élémentaire du cuivre avant et après la dépolymérisation radicalaire est indiqué dans le Tableau 22. Le pourcentage de cuivre présent dans la fraction HE800DR après la dépolymérisation est équivalent à celui du polymère natif.

L'étape de purification par chromatographie d'échange d'ions (Chélex 100) permet donc d'éliminer le cuivre en excès après la réaction.

	C ^a (%)	N ^a (%)	Cu ^a (ppm)
HE800 natif	34.7	3.0	810
HE800DR	35.9	3.1	800

^a obtenu par micro-analyse élémentaire

Tableau 22 : Dosages élémentaires du cuivre dans le HE800 natif et le HE800DR exprimés en pourcentages massiques

Etude structurale du HE800DR par RMN

L'interprétation des spectres de RMN de la fraction HE800DR ($M_w = 4\ 600\ \text{g.mol}^{-1}$), obtenue par dépolymérisation radicalaire, a été comparée aux résultats de Rougeaux *et al.* (1999b) lors de l'étude structurale du HE 800.

Le spectre 1D du proton présenté dans la Figure 30 offre une très bonne résolution. Tous les signaux ont été identifiés et l'intégration de chacun, en particulier les protons anomériques (δ 5.42 ; 4.68 ; 4.58 et 4.53) et les protons méthyliques (δ 2.07 ; 2.05), indique l'existence de quatre résidus. Ces résultats sont conformes à la présence de deux acides uroniques et deux hexosamines *N*-acétylées. L'étude des spectres COSY, TOCSY et HSQC a été réalisée. Les déplacements chimiques, obtenus à partir de cette fraction, sont présentés dans le Tableau 23.

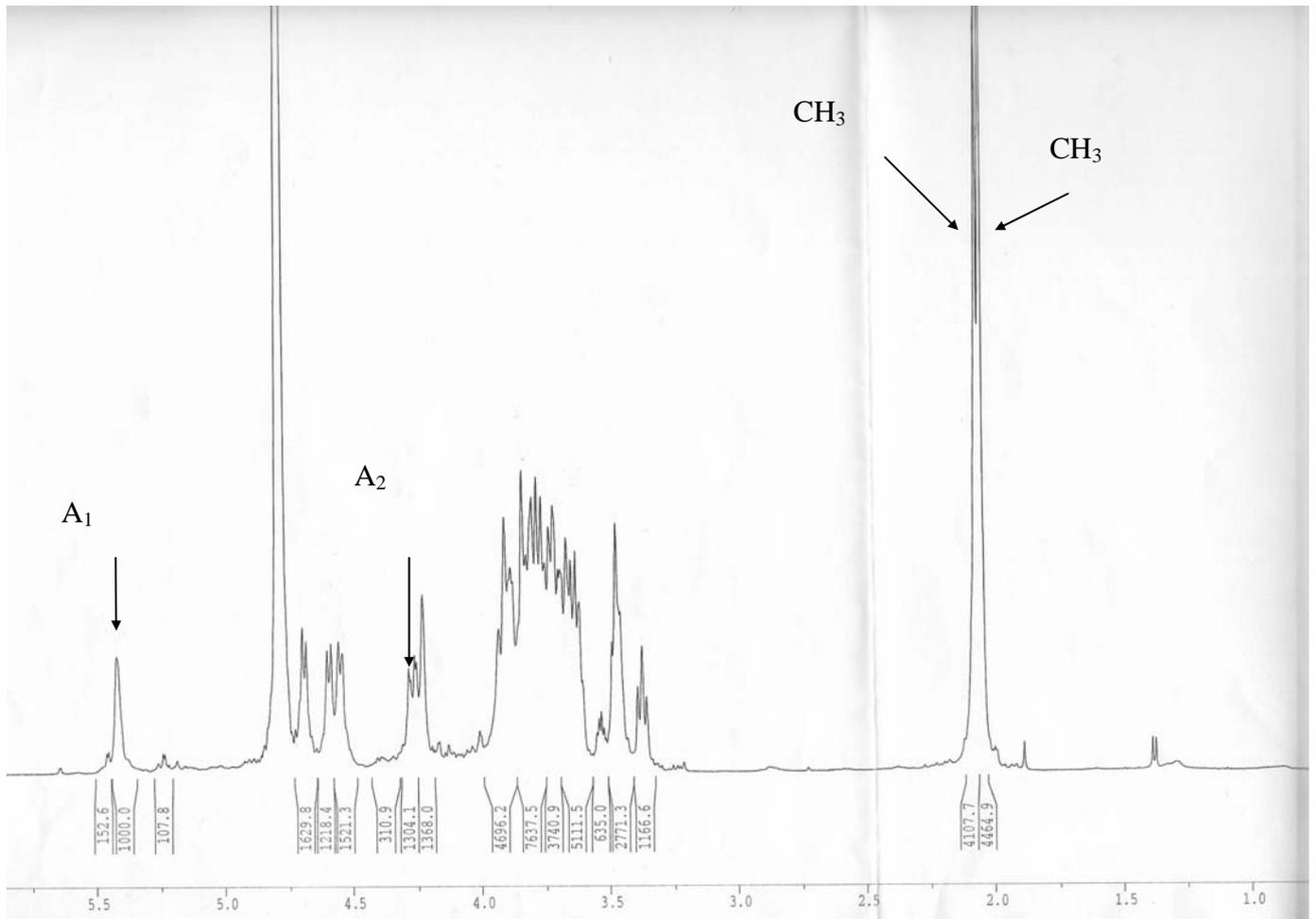


Figure 30 : Spectre RMN 1D du proton d'une fraction de HE 800 DR

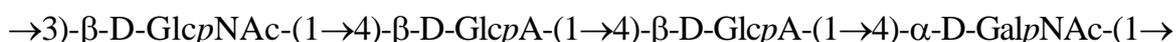
Résidu	¹ H (δ, ppm)						
	1	2	3	4	5	6	CH ₃
→4)-α-D-GalpNAc-(1→	5.42	4.26	3.88	4.20	3.84	3.84 ;3.64	2.07*
→4)-β-D-GlcpA-(1→	4.68	3.48	3.62	3.70	3.82	-	-
→3)-β-D-GlcpNAc-(1→	4.58	3.76	3.71	3.65	3.46	3.76 ;3.95	2.05*
→4)-β-D-GlcpA-(1→	4.53	3.37	3.59	3.77	3.76	-	-

*Résultats différents de ceux de Rougeaux *et al.* (1999b)

Tableau 23: Déplacements chimiques des signaux correspondant aux protons de l'EPS HE 800DR.

L'interprétation des signaux des quatre résidus indique la présence d'α-D-GalpNAc, de β-D-GlcpA, de β-D-GlcpNAc et de β-D-GlcpA. Leurs déplacements chimiques sont comparables à ceux des résidus présents dans le produit initial, et en accord avec les résultats de Rougeaux *et al.* (1999b). Seule l'attribution des signaux correspondant aux protons méthyliques est inversée, ce point sera discuté ci-après lors de l'étude de la structure des fractions ayant subi une *N*-désacétylation par la soude.

Les spectres ROESY et HMBC confirment également l'enchaînement suivant au sein de l'unité répétitive du HE800DR :



Les signaux relatifs aux protons de cycle et le massif des protons méthyliques des deux hexosamines *N*-acétylées sont très homogènes. Leur intégration démontre qu'il n'y a pas eu de *N*-désacétylation lors de la réaction. Par ailleurs, aucun nouveau signal majeur n'est apparu. Le processus de dépolymérisation radicalaire semble principalement dégrader la liaison osidique, tout en conservant l'intégrité des résidus.

D'après l'ensemble des résultats obtenus, cette réaction ne semble donc pas modifier la structure de l'unité répétitive du HE800.

3.2.1.2 Dépolymérisation radicalaire du GY785 et du HYD721

Le procédé de dépolymérisation radicalaire mis au point pour le HE800 a été adapté au GY785 et au HYD721. Les rapports H_2O_2 /GY785 et H_2O_2 /HYD721 utilisés pour la dépolymérisation ainsi que les caractéristiques de masses en équivalent pullulanes, des dérivés obtenus, sont décrits dans le Tableau 24.

EPS natif	H_2O_2 /EPS ^a	M_p^b (g.mol ⁻¹)	M_w^b (g.mol ⁻¹)	M_n^b (g.mol ⁻¹)	I^b	Rendements ^c (%)
GY785	0.52	13 400	13100	13700	2.41	50
GY785	0.52	9 137	10 700	5 760	1.86	53
HYD721	0.39	21 800	26100	11 200	2.32	97
HYD721	0.52	21 800	21 400	10 200	2.10	94
HYD721	1	10 000	11 600	6 600	1.76	94

^aRapport H_2O_2 /EPS natif (w/w).

^b M_p (masse molaire au pic), M_w (masse molaire moyenne en poids), M_n (masse molaire moyenne en nombre), I (polydispersité). Les mesures ont été réalisées par HPSEC en utilisant des standards pullulanes.

^cCalculé à partir de la masse de HE800 natif de départ.

Tableau 24 : Masses molaires des dérivés du GY785 et du HYD721 après dépolymérisation radicalaire

Pour obtenir des masses molaires du même ordre ($M_w = 10\ 000$ g.mol⁻¹ environ), les rapports H_2O_2 /EPS sont plus élevés pour GY785 et HYD721, respectivement 0.5 et 1, que le rapport utilisé pour le HE800 (0.2).

La composition glycosidique des dérivés dépolymérisés, comparée au produit natif a été déterminée par l'analyse des méthylglycosides-TMS (Tableau 25).

Les dérivés de faibles masses molaires possèdent des compositions très voisines de celles des polymères de hautes masses correspondants. Ces résultats n'indiquent pas de modification majeure de l'unité répétitive due à la dépolymérisation radicalaire.

EPS	H ₂ O ₂ /EPS	GlcA (%)	GalA (%)	Rham (%)	Man (%)	Gal (%)	Glc (%)
GY785 natif	0	5.5	3.2	2.9	-	14.6	19.3
GY785DR	0.52	4.9	2.3	4.8	-	9.2	13.3
HYD721 natif	0	5	-	9.3	20.6	16.5	17.4
HYD785DR	1	3.6	-	7.4	17.9	14.9	15.7

Tableau 25 : Analyse des méthylglycosides-TMS par GC du GY785 et du HYD721 avant et après dépolymérisation radicalaire.

Les spectres de RMN COSY, TOCSY, ROESY, HSQC et HMBC obtenus à partir du dérivé GY785DR ont été interprétés. Leur interprétation corrobore parfaitement l'hypothèse de structure avancée pour l'EPS GY785 dans le chapitre 2. Quelques hétérogénéités sont néanmoins apportées à la structure mais globalement, les déplacements chimiques des protons et des carbones de chaque résidu sont identiques à ceux des fractions dépolymérisées par voie acide et purifiées, caractérisées dans le chapitre 2 (EI-GY785 et SE-GY785).

Les radicaux hydroxyles générés lors de la réaction radicalaire sont des entités très réactives, ils attaquent le polymère de façon aléatoire et le mécanisme est différent de celui d'une hydrolyse acide. Les spectres RMN exhibent un nombre de pics secondaires de faible intensité, plus important après une dépolymérisation radicalaire qu'après une hydrolyse acide. Cependant, la confrontation des spectres obtenus à partir des deux types de réactions s'est avérée un outil de choix dans la caractérisation structurale de l'EPS GY785. En effet, des déplacements chimiques légèrement différents et des intensités de taches de corrélations plus importantes, ont permis, notamment de confirmer les attributions dans la région des protons anomériques β , entre 4.5 et 5 ppm.

Les résultats précédents montrent que l'utilisation de radicaux hydroxyles est un procédé de dépolymérisation qui permet de conserver les caractéristiques structurales de l'unité répétitive des EPS. Néanmoins, les rendements de réactions diminuent avec la masse du polymère, et une destruction totale de la molécule est inévitable si la réaction est trop sévère. La préparation d'oligosaccharides ou de monosaccharides est impossible directement par cette méthode. Mais, la dépolymérisation radicalaire de polysaccharides de hautes masses permet de produire des molécules de faibles masses molaires, sans en modifier globalement la structure lorsque celles-ci sont supérieures à 4 000 g.mol⁻¹. Ce procédé génère des dérivés stables, homogènes, présentant une faible polydispersité et ceci de façon très reproductible.

Toutefois, les résultats obtenus sur les trois EPS HE800, GY785 et HYD721 montrent un comportement différent vis à vis de cette réaction radicalaire. Le rapport H₂O₂/EPS doit être déterminé pour chaque polymère afin d'obtenir des fractions possédant la masse molaire désirée. La composition osidique, notamment la présence d'acides uroniques et l'existence de ramifications jouent probablement un rôle dans le comportement des EPS lors de la réaction. De plus, certains EPS sont d'excellents chélateurs de métaux (Loaëc *et al.*, 1997), ils peuvent donc réagir avec le Cu⁺⁺ qui catalyse la réaction et en modifier la cinétique. Par conséquent, il est impossible d'établir des conditions standards, cette réaction est probablement adaptable à tous les polysaccharides mais une étude particulière à chacun est nécessaire pour la mise au point des conditions expérimentales.

3.2.2. Sulfatation des EPS

De nombreuses études sur les GAG ont montré que le nombre et la position dans l'espace des groupements sulfates sont responsables de l'activité anticoagulante et antithrombotique de ces polymères (Petitou *et al.*, 1983). Les groupements sulfates présents dans l'héparine sont soit des O-sulfates qui peuvent se trouver sur tous les résidus, soit des N-sulfates qui sont présents uniquement en position 2 des hexosamines.

La sulfatation des EPS a été réalisée soit directement dans le but d'apporter des groupements O-sulfates, soit après N-désacétylation dans le cas du HE800, afin de libérer les

fonctions amines des hexosamines *N*-acétylées et introduire également des groupements *N*-sulfates.

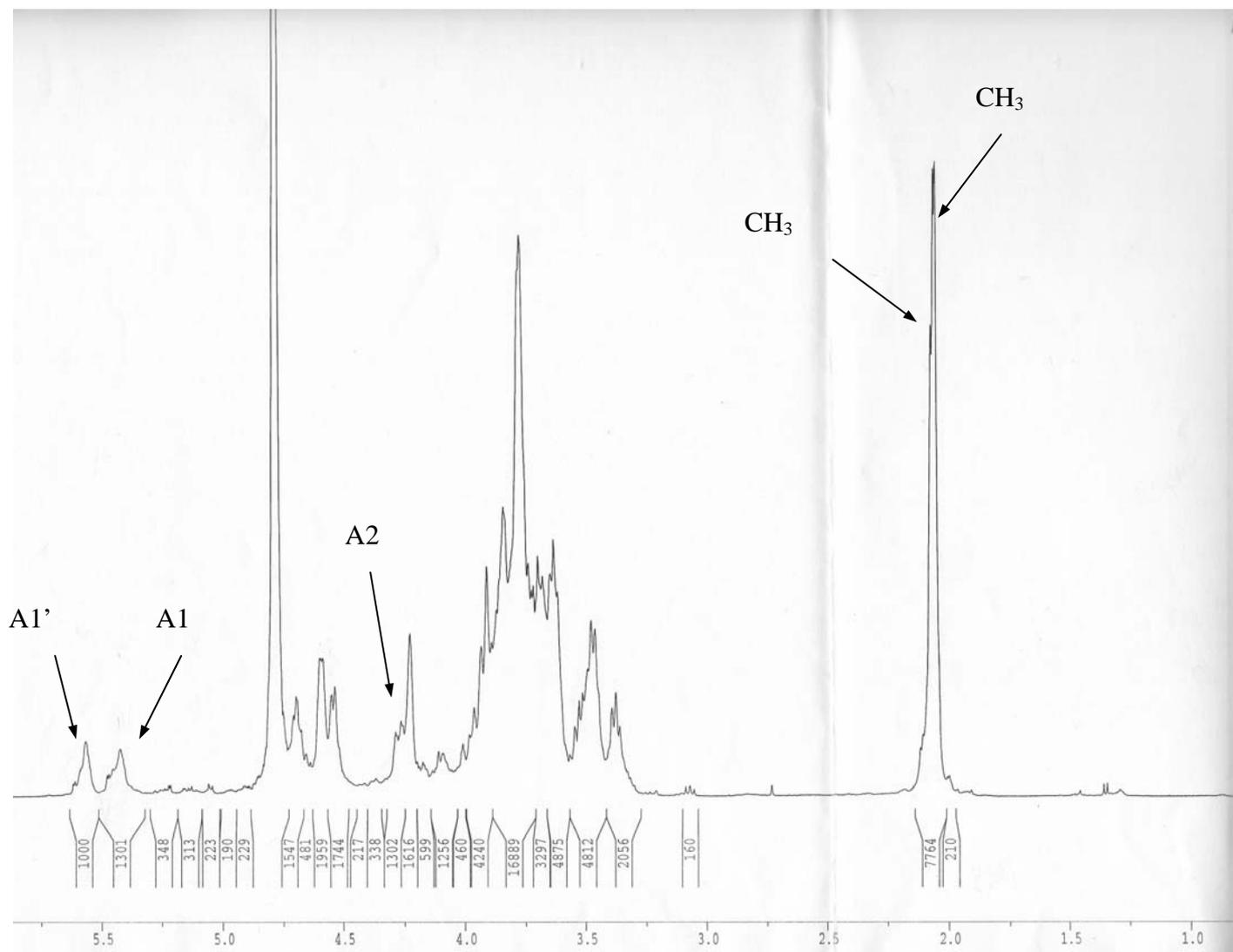
La technique de sulfatation utilisée dans cette étude est adaptée des conditions mises au point par Nishino (1992), sur le fucane. Cette réaction utilise comme agent de sulfatation le complexe pyridine-SO₃, très réactif sur les fonctions hydroxyles. Mais les traces d'eau éventuellement présentes lors de la réaction, réagissent avec ce complexe pour former de l'acide sulfurique. L'agent de sulfatation est donc détruit, la sulfatation est moins efficace. L'acide formé peut alors contribuer à la dépolymérisation des polysaccharides. Toute trace d'eau a donc été éliminée par l'utilisation de DMF anhydre, d'une atmosphère saturée en argon, de tamis moléculaire, l'utilisation de polysaccharides lyophilisés juste avant la réaction et une extrême précaution a été apportée à la conservation du complexe pyridine-SO₃ en milieu anhydre.

3.2.2.1 *N*-désacétylation du HE800

– ***N*-désacétylation par hydrazinolyse**

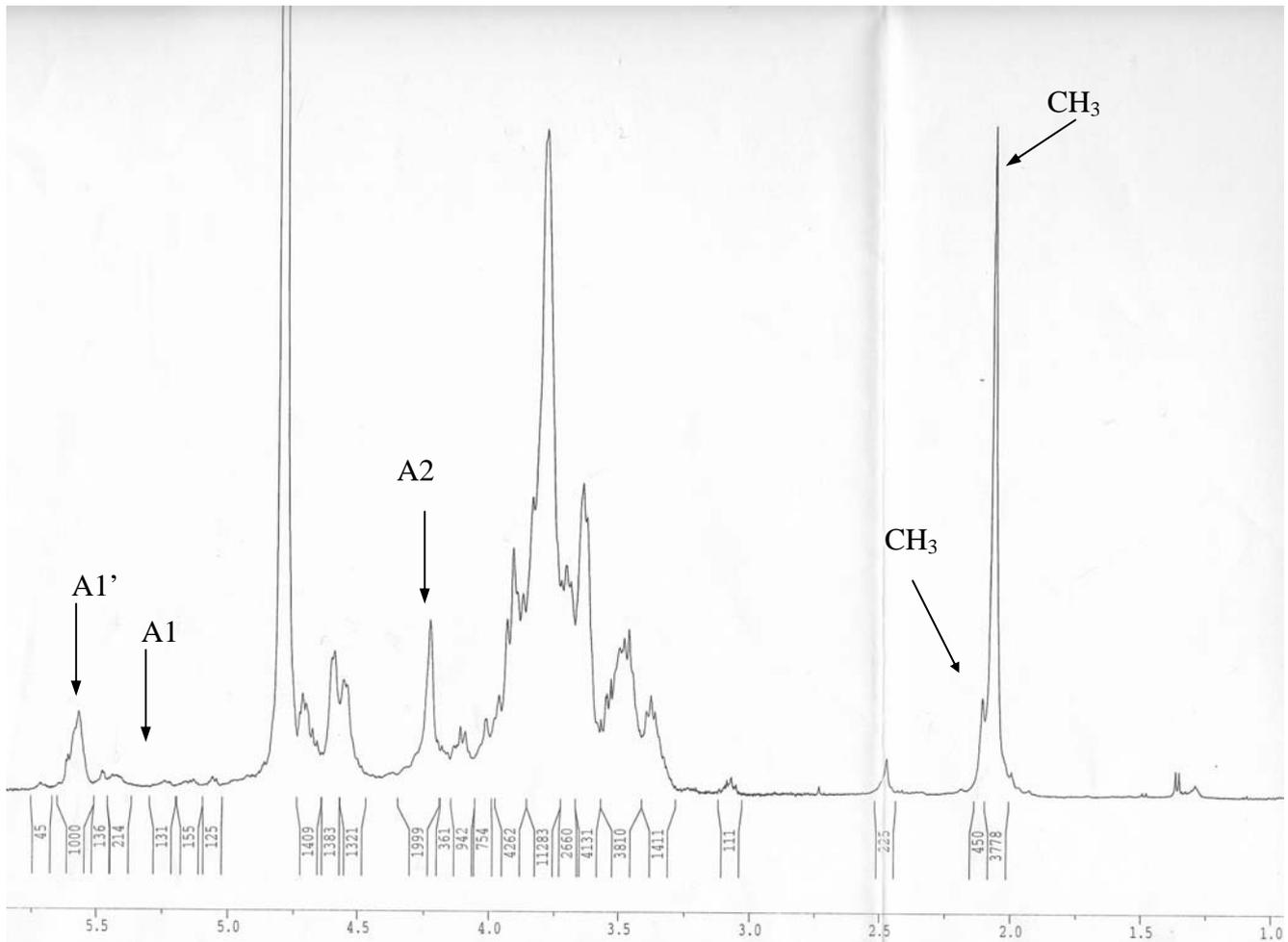
Deux types d'hydrazine ont été testés dans le but de *N*-désacétyler le HE800: l'hydrazine hydrate, (hydrazine-H₂O) et l'hydrazine dans le tétrahydrofurane (hydrazine-THF). En effet, l'hydrazine « pure » est un puissant explosif qui n'est actuellement fabriquée et vendue qu'aux Etats Unis. Son importation vers l'Europe est prohibée.

Le pourcentage de *N*-désacétylation a été mesuré en comparant les spectres RMN du HE 800DR qui constitue la référence (Figure 30) et les dérivés *N*-désacétylés soit par l'hydrazine-H₂O hydrate (Figure 31), soit par l'hydrazine-THF (Figure 32). Les signaux situés entre 2.0 ppm et 2.25 ppm correspondent aux protons des méthyles portés par les groupements acétyles des deux hexosamines présentes dans le polymère HE800.



A1 = signal correspondant au proton anomérique du résidu $\rightarrow 4$ - α -D-GalpNac-(1 \rightarrow) ; A1' = signal correspondant au proton anomérique du résidu $\rightarrow 4$ - α -D-N-Galp-(1 \rightarrow) après N-désacétylation; A2 = signal correspondant au proton H-2 du résidu $\rightarrow 4$ - α -D-GalpNac-(1 \rightarrow) ; CH₃ = signaux correspondant aux protons des deux groupements acétyles des hexosamines.

Figure 31 : Spectre RMN 1D ^1H de l'EPS HE 800 après 3h30 de N-désacétylation (hydrazine-H₂O)



A1 : signal correspondant au proton anomérique du résidu $\rightarrow 4$ - α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow) ; A1' : signal correspondant au proton anomérique du résidu $\rightarrow 4$ - α -D-N-Galp-(1 \rightarrow) après N-désacétylation; A2 : signal correspondant au proton H- 2 du résidu $\rightarrow 4$ - α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow) ; CH₃ : signaux correspondant aux protons des 2 groupements acétyle des hexosamines.

Figure 32: Spectre RMN 1D ¹H de l'EPS HE 800 après 3h30 de N-désacétylation (hydrazine-THF)

L'intégration de ce massif révèle la quantité de protons méthyliques et donc le taux de groupements *N*-acétyles présents.

Lors de l'utilisation de l'hydrazine-H₂O (Figure 31), la diminution du signal à 2.07 ppm traduit une perte de 20 % d'un seul des deux acétyles portés par les résidus d'hexosamines, soit une *N*-désacétylation totale de 10 %. Lors de l'utilisation de l'hydrazine-THF (Figure 32), la *N*-désacétylation de ce même résidu est de 90 %, alors que le deuxième résidu n'a subi une *N*-désacétylation de seulement 10 %. La *N*-désacétylation cumulée des deux résidus représente 50 %. Par ailleurs, aucune diminution de masse molaire n'a été observée après la réaction.

La *N*-désacétylation par hydrazinolyse, très utilisée sur l'héparine, donne de bons résultats sur le HE 800DR, mais semble être très sélective de l'un des deux résidus de *N*-acétylhexosamine : l' α -D-GalpNAc. Cependant, le coût des réactifs et la difficulté d'approvisionnement en hydrazine sont tels, qu'il a été indispensable d'envisager une autre méthode de *N*-désacétylation pour la suite de l'étude et notamment la préparation de quantités importantes de HE 800 *N*-désacétylé.

– **N-désacétylation par la soude**

Une cinétique de *N*-désacétylation a été effectuée, dans un premier temps, afin de définir les conditions de réaction permettant la meilleure adéquation entre le rendement de *N*-désacétylation et le rendement massique. Une fraction de 5 800 g.mol⁻¹ a été traitée avec de la soude pour réaliser cette cinétique. Du NaBH₄ a été ajouté dès le départ de la réaction de façon à réduire les aldéhydes terminaux du polysaccharide éventuellement formés au cours de la réaction. Cette précaution permet d'éviter une dégradation alcaline totale de l'EPS (très probable dans ces conditions). La masse molaire du HE800DR a été déterminée au cours de la cinétique, les masses molaires sont exprimées en équivalent pullulanes dans le Tableau 26).

	Degré de N-acétylation ^a (%)	^a GalpNAc (%)	^a Glc pNAc (%)	Rendements ^b (%)	Mw ^c (g/mol)
0 min	100	50	50	-	5 800
40 min	63	50	76	56	5 600
60 min	40	16	67	32	4 000

^a Calculé à partir de l'intégration des spectres 1D NMR du proton

^b Rendements massiques par rapport au HE800 de départ

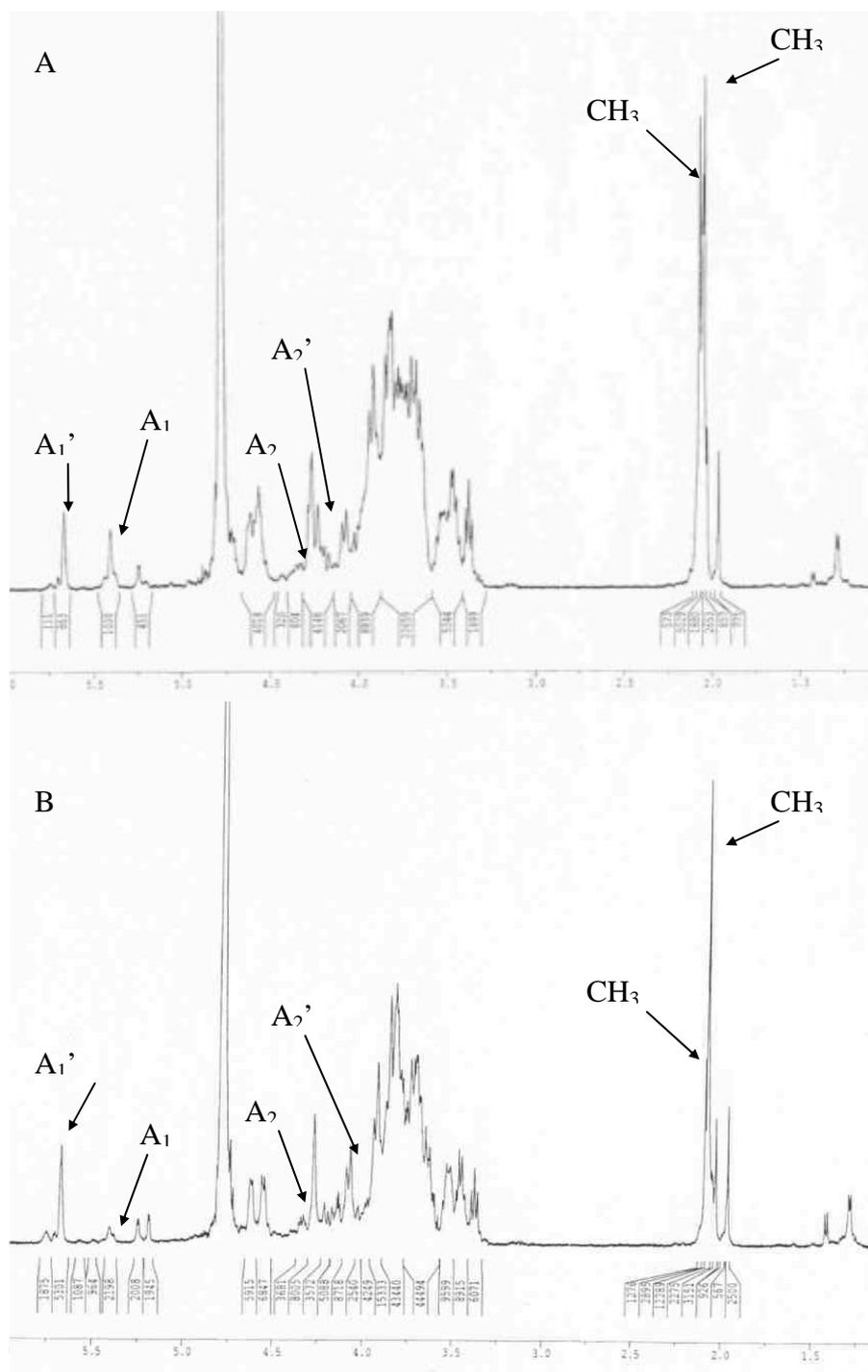
^c Mw (masse molaire en poids) mesurée par HPSEC en utilisant les standards pullulanes

Tableau 26 : Cinétique de *N*-désacétylation du HE 800 DR par la soude

Le degré de *N*-désacétylation a été calculé, de la même façon que lors de la *N*-désacétylation par hydrazinolyse, en mesurant l'intégration des groupements méthyles résiduels. La Figure 33 représente les spectres RMD 1D du proton des dérivés après 40 min de *N*-désacétylation (A) et 60 min de *N*-désacétylation (B).

Après 40 min de réaction en présence de soude, le degré de *N*-désacétylation diffère pour les deux hexosamines *N*-acétylées présentes dans l'unité répétitive du HE800. En effet, 50 % des groupements méthyles du résidu GalpNAc (δ 2.07) sont présents pour 76 % des groupements méthyles portés par le résidu Glc pNAc (δ 2.05). Les spectres RMN montrent la diminution simultanée des signaux correspondant aux protons H-1 (δ 5.42) et H-2 (δ 4.26) du résidu GalpNAc. Une diminution, plus faible est également observable pour les signaux correspondant aux protons H-1 (δ 4.58) et H-2 (δ 3.76) du résidu Glc pNAc. Ces résultats confirment l'attribution du signal à (δ 2.07) aux protons méthyliques de l' α -D-GalpNAc et le signal à (δ 2.05) aux protons méthyliques du β -D-Glc pNAc conformément aux résultats exposés dans le Tableau 23. Ces résultats conduisent à inverser les attributions proposées antérieurement par Rougeaux et al. (1999b) sur la base d'une expérience HMBC.

La différence de *N*-désacétylation entre les deux résidus GalpNAc et Glc pNAc a encore augmenté après 1 h de réaction. Le degré de *N*-désacétylation est alors de 84 % pour le résidu de galactosamine et de 33 % pour le résidu de glucosamine. Une *N*-désacétylation totale de 40 % a été réalisée en 1 heure. Le dérivé ainsi obtenu possède donc



A₁ : signal correspondant au proton anomérique de $\rightarrow 4$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow); A₁' : signal correspondant au proton anomérique de $\rightarrow 4$)- α -D-N-Galp-(1 \rightarrow); A₂ : signal correspondant au proton H-2 de $\rightarrow 4$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow); A₂' : signal correspondant au proton H-2 de $\rightarrow 4$)- α -D-N-Galp-(1 \rightarrow); CH₃ : signal correspondant aux protons des méthyles de $\rightarrow 4$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow et $\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow).

Figure 33: Spectre RMN 1D du proton de HE800DR après 40 min de *N*-désacétylation par la soude(A) et 1 h de *N*-désacétylation par la soude HE800DRN-D (B)

40 % d'hexosamines présentant une fonction amine primaire. Ce produit est nommé HE800DR-ND et sera utilisé ultérieurement pour la sulfatation.

Au cours de la réaction, la masse molaire du produit initial est de 5 800 g/mol. Après 1 h de la réaction de *N*-désacétylation, cette masse est de 4 000 g/mol. Lorsque le temps réactionnel dépasse 1 heure, les rendements massiques obtenus dans ces conditions sont tellement faibles (inférieurs à 10 %) qu'il a été impossible de réaliser une caractérisation structurale. Les rendements de *N*-désacétylation n'ont donc pas pu être calculés.

3.2.2.2 Sulfatation des HE800 de faibles masses molaires

Deux types de dérivés ont été utilisés pour la sulfatation du HE800 : le HE800DR obtenu par dépolymérisation radicalaire et le HE 800DR-ND obtenu par *N*-désacétylation du HE800DR. L'objectif était d'obtenir des fractions de HE800 de faibles masses molaires possédant différents taux de sulfates et des sites de sulfatations différents (O- et N-sulfates).

– Sulfatation du HE800 DR

La sulfatation du HE800DR a été réalisée directement ou en utilisant le polymère sous forme de différents de sels : forme H^+ , sel de sodium, sel de triéthylammonium, sel de tributylammonium ou sel de pyridinium. Les pourcentages de sulfates, les rendements et les masses molaires sont indiqués dans le Tableau 27.

La sulfatation du HE800DR sous forme H^+ conduit à un taux de sulfate de 21.4%. Mais, la masse molaire (M_w) observée pour ce dérivé sous forme H^+ décroît de 10 000 $g \cdot mol^{-1}$ à 7 400 $g \cdot mol^{-1}$. Lorsqu'aucun contre-ion n'est présent sur ses fonctions acides, le polymère fait lui-même diminuer le pH de la solution et provoque une dépolymérisation acide appelée autohydrolyse. Les rendements et le taux de sulfate obtenus pour sel de sodium sont acceptables malgré une mauvaise solubilité du polymère en début de réaction.

L'utilisation de polysaccharides sous forme de sels organiques permet, dans certains cas, d'augmenter de façon importante la solubilité de ceux-ci dans les solvants organiques, tels que le DMF, avec lequel cette réaction est favorisée.

	Sel	SO ₃ Na ^a (%)	Rendements ^b (%)	Mp ^c (g.mol ⁻¹)	Mw ^c (g.mol ⁻¹)
HE800DR	-	>1	-	9300	10 000
HE800DR-S	H ⁺	21.4	75.2	7300	7 400
HE800DR-S	Sodium	16.6	>100	9300	9 500
HE800DR-S	Triéthylammonium	5.8	60	9300	9 500
HE800DR-S	Tributylammonium	-	3.2	-	-
HE800DR-S	Pyridinium	24.6	>100	7500	7 900

^a Déduit du taux de soufre obtenu par micro-analyse élémentaire.

^b Calculé à partir de la masse de HE800DR de départ

^c Mw (Masse molaire moyenne en poids); Mp (masse molaire au pic) mesurées par HPSEC en utilisant des standards pullulanes.

Tableau 27 : Caractérisation chimique des différentes fractions de HE800DR sulfatés.

Le sel de triéthylammonium autorise des rendements massiques acceptables, mais ne conduit qu'à une très faible sulfatation. Le sel de tributylammonium du HE800DR conduit à de très faibles rendements (3.2 %) en raison d'une très mauvaise solubilité en milieu aqueux. En effet, lors des étapes réhydratation, de neutralisation à la soude et de purification du polymère, la tributylamine précipite de façon irréversible.

La sulfatation directe du HE800DR et la sulfatation du HE800DR sous forme de sel de triéthylammonium forment des mélanges réactionnels peu homogènes qui conduisent à une mauvaise sulfatation et une très probable hétérogénéité dans les produits formés.

Le sel de pyridinium donne, quant à lui, de bons rendements massiques, un taux de sulfate de l'ordre de 24 % et ceci de façon reproductible. En effet la pyridine permet une solubilisation immédiate du polysaccharide dans le DMF à température ambiante. De plus ce composé est soluble dans l'eau, il peut donc être éliminé par dialyse ou ultra-filtration. Une diminution de masse est toutefois observable dans les dérivés sulfatés.

La sulfatation du HE 800DR mis sous forme de sel de pyridinium semble la méthode la plus efficace par rapport aux autres méthodes testées, on obtient à la fois le meilleur taux de

sulfate, le meilleur rendement, tout en ayant une dépolymérisation modérée du polymère. Le produit obtenu sera nommé HE800DR-S par la suite.

La masse molaire du tétrasaccharide de HE800 est de 758 g/mol lorsque qu'il n'est pas sulfaté. 24 % de sulfates représentent environ 3 groupements sulfates par unité répétitive de HE800DR-S.

La micro-analyse élémentaire permet un dosage très précis du soufre dans un polysaccharide, mais ne permet pas de différencier les sulfates liés au polymère des sulfates libres qui n'ont pas été éliminés lors de la purification. Dans le cas du HE800DR-S, le test à l'Azure A indique la présence de 20 à 25 % de sulfates liés au polysaccharide. Le test à l'acétate de baryum et le dosage des sulfates libres par chromatographie d'échange d'ions (méthode Dionex®) permettent d'affirmer que le HE800DR-S contient moins de 1% de sulfates libres (voir Figure 34).

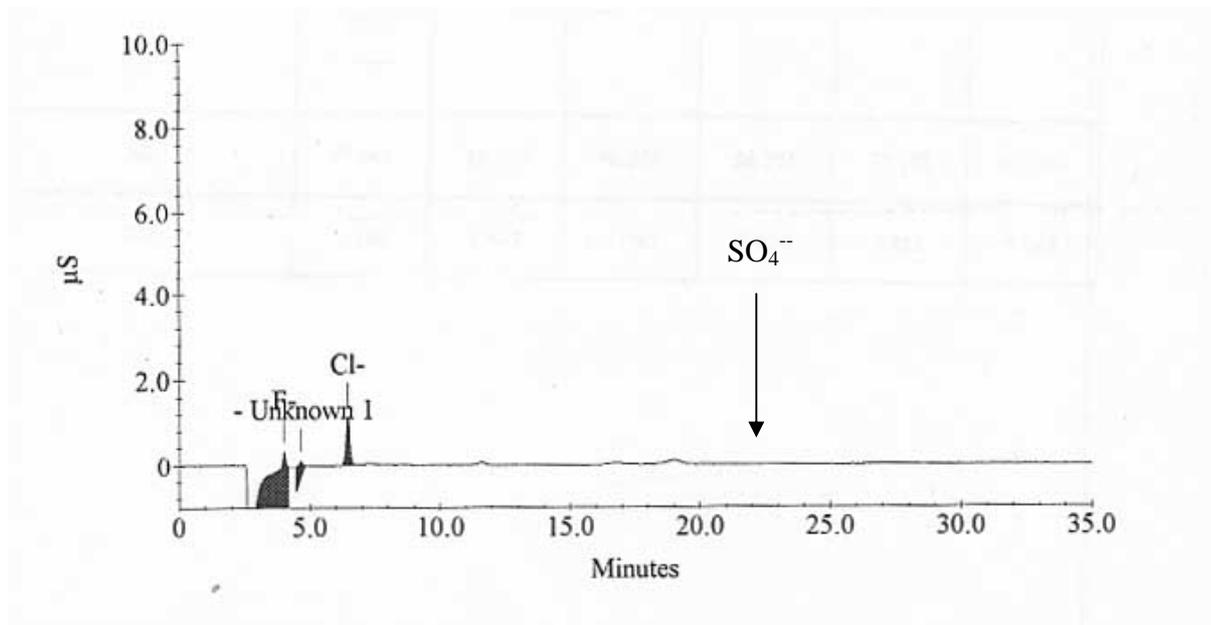


Figure 34 : Dosage des sulfates libres par chromatographie d'échange d'ions dans une solution de HE800DR-S (24% de sulfates).

– Sulfatation du HE800DR après *N*-désacétylation

Le HE800DR *N*-désacétylé par la soude (HE 800DR-ND), a été sulfaté sous forme de sel de pyridinium (Tableau 28).

	Sel	Degré de <i>N</i> -acétylation ^a (%)	SO ₃ Na ^b (%)	SO ₃ Na liés (%)	Rendement ^c (%)	Mw ^d (g/mol)
HE800DR	-	100	<1	-		8 800
HE800DR-ND-S	Pyridinium	40	40	40	78.1	6 400

^a Déterminé par RMN

^b Dédruit du taux de soufre obtenu par micro-analyse élémentaire.

^c Calculé à partir de la masse de HE800DR-ND de départ

^d Mw (Masse molaire moyenne en poids) mesurée par HPSEC en utilisant des standards pullulanes.

Tableau 28 : Caractérisation physico-chimique du HE800DR-ND-S sulfaté

Les résultats obtenus lors de la caractérisation de ce dérivé (paragraphe 3.1.1.3) montraient que 40 % des hexosamines de ce polysaccharide présentent une fonction amine primaire. Après sulfatation, il possède 40 % de groupements sulfates. Aucune trace de sulfate libre n'a été détectée par chromatographie d'échange d'ions ou par le test à l'acétate de baryum, le HE800DR-ND-S possède donc 40 % de sulfates liés.

La Figure 35 représente les spectres infrarouges du HE800DR et du HE800DR-ND-S. La *N*-désacétylation partielle provoque une diminution des bandes à 1665 et 1567 cm⁻¹ associée respectivement à la bande amide I (C=O) et amide II (N-H) confirmant les résultats précédemment obtenus par RMN. Les esters de sulfates sont caractérisés, sur le spectre du HE800DR-ND-S, par 3 bandes à 1231-1260, 820 et 600 cm⁻¹, ils sont présents en quantité importante. L'absence de bande à 1118 cm⁻¹ (correspondant aux sulfates libres mesurés à partir du sulfate de sodium) confirme que les 40 % de sulfates détectés dans ce dérivé sont liés au polymère. En revanche, cette technique ne permet pas de différencier les *N*-sulfates des *O*-sulfates. Mais la réactivité des amines primaires étant supérieure à celle des alcools primaires, des groupements *O*-sulfates et des groupements *N*-sulfates ont pu être formés.

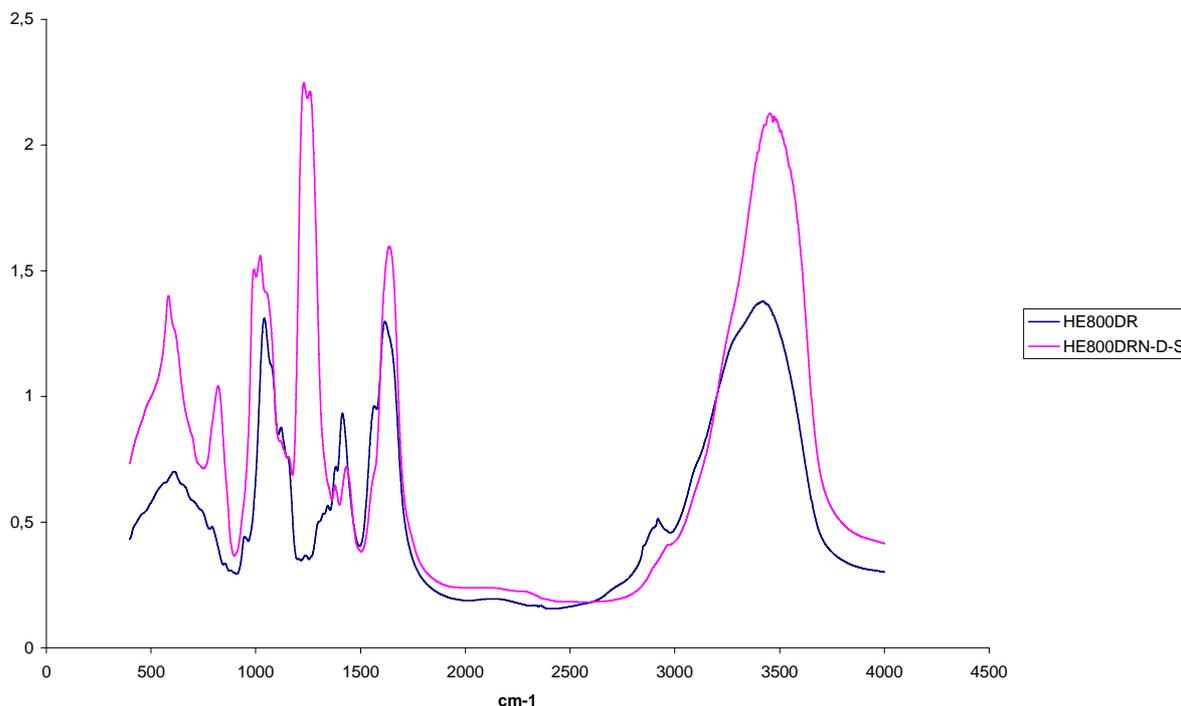


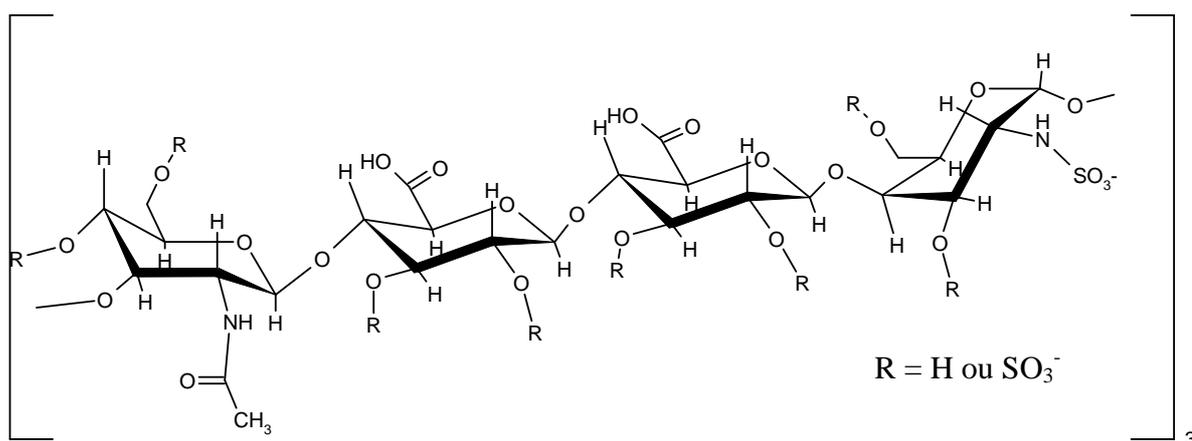
Figure 35 : Spectre infrarouge (FT-IR) des dérivés HE800DR et HE800DRN-D-S

La masse molaire exprimée en équivalent pullulanes permet d'estimer d'éventuelles modifications de la masse sur les chaînes polysaccharidiques. Mais l'apport de 40 % de sulfates modifie considérablement la conformation et la charge globale de ce dérivé. La valeur de la masse donnée par ce système est donc erronée.

La masse molaire du HE800DR-ND-S a été estimée HPSEC dans un système dont les standards de calibration sont des héparines de faibles masses molaires "système HMBP". C'est à dire que les standards sont des polysaccharides linéaires qui possèdent à la fois un rapport acides uroniques/hexosamines et un taux de groupements sulfates semblable à celui du HE800 étudié. Le standard utilisé présente donc une structure proche de la fraction étudiée. Dans ces conditions la masse molaire M_w est de $3\,400\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ avec une polydispersité de 1.24. Ces résultats sont très différents de ceux obtenus à partir du "système pullulane" qui surestime visiblement la masse des dérivés sulfatés. Les étapes successives de *N*-désacétylation et de

sulfatation conduisent à une diminution importante de la masse molaire du dérivé de 8800 à 3454 g.mol⁻¹, malgré l'apport en groupements sulfates.

La masse molaire du tétrasaccharide constituant le motif répétitif du HE800 *N*-désacétylé à 40 % est de 709 g.mol⁻¹. Lorsque ce motif possède 40 % de groupements sulfates, le tétrasaccharide de HE800DR-ND-S présente une masse molaire de 1189 g.mol⁻¹. Cette masse correspond à 6 groupements sulfates par tétrasaccharide. Par conséquent, la masse molaire moyenne de 3 400 g.mol⁻¹ représente 2.9 unités répétitives. Le degré de polymérisation (dp) moyen de la fraction HE800DR-ND-S est de 12 et cet oligosaccharide possède environ 18 sulfates. La structure suivante peut donc être proposée.



→3)-β-D-GcpNAc-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-α-D-Galp-(1→

Figure 36 : Structure du dérivé HE800DR-ND-S (40% de sulfates)

La réactivité des amines primaires et l'augmentation du taux de sulfates de 24 à 40 %, après *N*-désacétylation, indique la présence de *N*-sulfates dans le dérivé HE800DR-ND-S. Mais aucune technique n'a permis de confirmer cette hypothèse. Les spectres RMN sont très mal résolus pour cette fraction et la position des sulfates n'a pas pu être déterminée de façon certaine.

3.2.2.3 Sulfatation du GY785 et du HYD721

La sulfatation du GY785, a été réalisée à partir du GY785DR préparé par dépolymérisation radicalaire. La sulfatation du HYD721 a été réalisée sur la fraction HYD721DR également préparée par dépolymérisation radicalaire.

Les sulfatations de ces deux EPS de faibles masses molaires ont été réalisées sur la base des résultats obtenus pour le HE800. Les dérivés du GY785 et du HYD721 sous forme de sels de pyridinium possèdent une excellente solubilité dans le DMF. Les conditions de la réaction utilisées précédemment pour le HE800, ont donc été gardées pour la préparation des produits sulfatés à partir de ces EPS dépolymérisés.

Les sulfatations du GY785DR et du HYD721DR conduisent à des dérivés sulfatés à 40% et 31% respectivement, d'après la micro-analyse élémentaire (Tableau 29). Ils sont appelés GY785DR-S et HYD721DR-S.

Le test à l'acétate de baryum présente un léger précipité blanc indiquant la présence d'une faible quantité de sulfates libres dans le cas du GY785DR-S. Le dosage des ions en solution par chromatographie d'échange d'ions (système Dionex), indique 3 % de sulfates libres. 37 % de sulfates sont donc liés de façon covalente au polysaccharide. Concernant le HYD721DR-S, ces deux techniques n'ont pas révélé la présence de sulfates libres.

	Sel	SO ₃ Na ^a (%)	SO ₃ Na liés (%)	Rendement ^b (%)	Mw ^c (g.mol ⁻¹)
GY785DR	-	8.2	8.2	-	13 400
GY785DR-S	Pyridinium	40	37	87	17 000
HY721DR	-	11.2	11.2	-	21 830
HYD721DR-S	Pyridinium	31.0	31	54	19 800

^a Déduit du taux de soufre obtenu par micro-analyse élémentaire.

^b Calculé à partir de la masse de HE800DR-MD de départ

^c Mw (Masse molaire moyenne en poids) mesurée par HPSEC en utilisant des standards pullulanes.

Tableau 29 : Caractéristiques physico-chimiques des dérivés sulfatés du GY785DR et du HYD721DR

De même que pour le HE800DR-ND-S, les masses molaires des dérivés sulfatés mesurées par HPSEC en utilisant le "système pullulane" sont probablement erronées à cause de l'abondance des sulfates liés présents dans ces dérivés.

La masse molaire de GY785DR-S a également été déterminée en équivalents HNF. La Mw mesurée par rapport aux standards sulfatés, est alors de 11 900 g.mol⁻¹ avec un indice de polydispersité de 1.6. Malgré l'apport des groupements sulfates, la fraction GY785DR subit une faible diminution de la masse molaire pendant le procédé de sulfatation.

Une estimation du degré de polymérisation et du nombre de groupements sulfates par résidus a pu être réalisée. D'après la structure du GY785, la masse molaire de l'unité répétitive est de 1 491 g.mol⁻¹. Une valeur de 37 % de sulfates en masse, représente environ 11 sulfates par unité répétitive. Cette unité répétitive sulfatée possède alors une masse de 2 366 g.mol⁻¹. Le dérivé GY785DR-S correspond en moyenne à un enchaînement de 5 unités répétitives (dp = 40), ce qui coïncide avec la présence d'environ 1 sulfate par résidu.

Lors de l'étude structurale du GY785, un groupement sulfate a été identifié en position 2 du résidu →3,4)-GalpA-(1→, dans le polymère natif et dans les fractions dépolymérisées par voie radicalaire. Compte tenu de la structure de ce motif, il est vraisemblable que les oses neutres terminaux (glucose et galactose) soient plus réactifs et donc préférentiellement sulfatés par rapport aux deux résidus d'acides glucuroniques déjà disubstitués (en position 2,4 et 3,4).

La détermination des liaisons osidiques par méthylation des dérivés sulfatés n'a pas été possible. Le caractère anionique ou la présence de sulfates en grandes quantités ne permet pas d'obtenir des résultats fiables et reproductibles à partir de ces dérivés. Seule une augmentation des résidus →4)-GlcP-(1→ est observable, indiquant la présence d'une partie des groupements sulfates en position 4 des deux glucoses terminaux de la chaîne latérale. Ce dérivé sulfaté posséderait, dans ce cas, une structure ramifiée dont chaque chaîne latérale identique serait composée de deux acides uroniques →3,4)-β-GlcP A et →2,4)-β-GlcP A. Les ramifications de ces deux résidus substitués par deux glucoses et un disaccharide de galactose et de glucose porteraient la majorité des sulfates. Cette structure et la position des sulfates sont très différentes de celle du HE800DR-ND-S ou d'une héparine qui sont linéaires et qui portent donc les sulfates sur la chaîne principale puisqu'ils ne possèdent pas de ramifications.

Les faibles quantités de produits disponibles pour le dérivé HYD721DR-S n'ont permis la préparation que de quelques milligrammes de produit seulement. L'analyse des caractéristiques massiques de ce produit par HPSEC, dans le "système héparine", n'a pas été possible. En revanche, la structure de ce polymère est connue (Rougeaux *et al.*, 1999a). Le polymère natif est majoritairement composé d'oses neutres. Un résidu mannose en position terminale d'une des deux chaînes latérales porte un groupement sulfate en position 3. Concernant les groupements apportés lors de la sulfatation (dérivé HYD721DR-S), le nombre d'hydroxyles qui peuvent être estérifiés est trop important (13 par unité répétitive) pour pouvoir émettre des hypothèses quant à la position de ces groupements.

3.2.3. Phosphatations du HE800 et du GY785

Afin de comprendre le rôle des groupements chargés négativement (sulfates et phosphates) dans les mécanismes d'interactions polysaccharides-protéines, la phosphatation des fonctions d'hydroxyles a été réalisée suivant le protocole de Khanal *et al.* (2001). Les glucosamines de la chitine sont phosphatées en utilisant ce protocole pour donner des produits possédant des propriétés anti-inflammatoires. Par ailleurs, la phosphatation de fucoïdanes, Kappa carraghénanes ou de xylanes, confère à ces polysaccharides des propriétés anticoagulantes (Dace *et al.*, 1997).

La phosphatation a été réalisée sur deux dérivés du HE800 de faibles masses molaires, le HE800DR obtenu par dépolymérisation radicalaire et le HE800DR-ND obtenu par dépolymérisation radicalaire et *N*-désacétylation par la soude. Un dérivé du GY785 a également été phosphaté, il s'agit du GY785DR obtenu par dépolymérisation radicalaire.

3.2.3.1 Caractérisation physico-chimique

Afin d'obtenir plusieurs taux de phosphates liés, trois dérivés, ont été soumis à une phosphatation. Les caractéristiques physico-chimiques des différentes fractions obtenues sont présentées dans le tableau 30.

	HPO ₄ ^a %	HPO ₄ % liés	SO ₃ Na ^a % liés	Rdt ^b (%)	Mw ^c (g.mol ⁻¹)
HE800DR	<1	<1	<1	-	8800
HE800DR-P	50.8	20	-	55	6400
HE800DR-ND-P	27.4	27.4	-	90	7600
GY785DR	<1	<1	8.5	92.7	41 600
GY785DR-P	35.3	35.3	7.3	80.0	51 600

^a Déduit du taux de phosphore obtenus par micro-analyse élémentaire.

^b Calculé à partir de la masse de polysaccharide de départ

^c Mw (Masse molaire moyenne en poids) mesurée par HPSEC en équivalents pullulanes.

Tableau 30 : Caractéristiques physico-chimiques des dérivés phosphatés du HE800 et du GY785.

Le HE800 de faible masse molaire (HE800DR) ne possède pas de groupements phosphates avant la réaction. Après phosphatation, la microanalyse élémentaire révèle un taux de 50 % de phosphates or, le dosage par chromatographie d'échange d'ions en (méthode Dionex), représenté sur la Figure 37, indique la présence de 30 % de phosphates libres dans cette fraction (HE800DR-P). C'est à dire que ce dérivé ne contient, en réalité, que 20 % de phosphates liés.

L'analyse du dérivé de faible masse *N*-désacétylé par la soude et phosphaté (HE800DR-ND-P) révèle 27.4% de phosphates. Le dosage des anions en solution n'indique qu'un très faible pourcentage de phosphates libres (<1% en masse du produit final). Ce dérivé possède donc un taux de phosphates liés de 27.4%. La *N*-désacétylation du HE800 permet une augmentation du taux de phosphates liés au polysaccharide. La présence de groupements phosphates sur les fonctions amines est très probable mais de même que pour la sulfatation de ce dérivé *N*-désacétylé, la substitution des amines primaires n'a pas été prouvée.

Dans le cas du dérivé de faible masse issu du GY785, la phosphatation permet d'apporter 35 % de groupements phosphates. Aucune trace de phosphates libres n'a pu être détectée par le dosage des ions en solution par chromatographie d'échange d'ions.

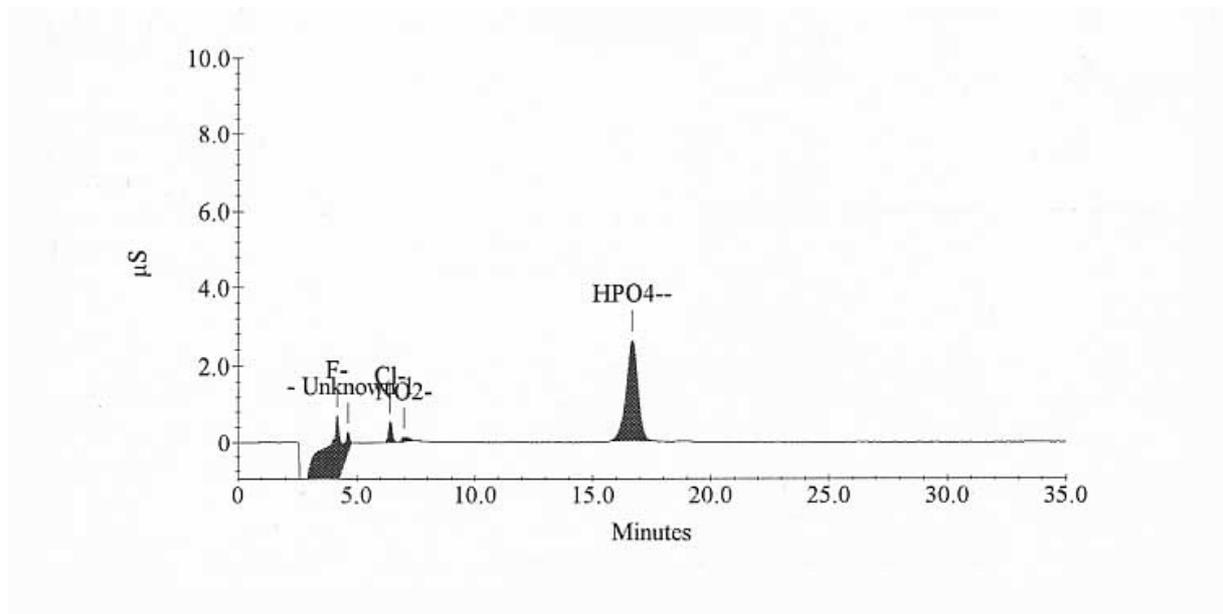


Figure 37 : Dosage des phosphates libres par chromatographie d'échange d'ions sur le HE800DR-P

La baisse de la masse molaire déterminée par HPSEC du HE800DR après phosphatation est très probablement due aux conditions de chauffage (3h30 à 120°C) en milieu légèrement acide pH 5-6. En effet, ces conditions sont favorables à l'hydrolyse partielle des liaisons osidiques. Or, des temps réactionnels inférieurs à 3h30 (30 min et 1h30) ou des températures de chauffage inférieures à 120°C, provoquent des taux de phosphatation très médiocres de l'ordre de 2 à 3% de phosphore apportés. Toutefois, comme cela a été montré précédemment pour les dérivés sulfatés, la charge du polymère influence fortement le résultat obtenu par HPSEC dans le "système pullulane". Les valeurs du

Tableau 30 donnent un ordre de grandeur des masses des produits phosphatés.

3.2.3.2 Caractérisation par RMN

Les spectres RMN 1D ^1H des dérivés phosphatés de faible masse molaire, comme ceux des dérivés fortement sulfatés sont très mal résolus et très difficiles à interpréter.

En revanche, la RMN du phosphore réalisée uniquement sur le HE800DR-P révèle la présence de deux signaux sous forme de massifs (Figure 38). Le premier est entre -8 ppm et -11 ppm et le second entre -1 ppm et $+2$ ppm. L'attribution de ces deux massifs est encore incertaine.

Une interprétation, proposée par Dace et *al.* (1997), est d'attribuer les signaux situés entre -8 ppm et -11 ppm aux liaisons diphosphodiester, c'est à dire des liaisons inter-chaînes polysaccharidiques. Le signal situé à 1.49 ppm est dû à la présence de phosphomonoesters (généralement rencontré entre 1.2 et 4.8 ppm). Les signaux compris entre 0.40 et 1.0 ppm indiquent la présence de liaisons phosphodiester correspondant à des groupements phosphates liés à une seule chaîne. Ces trois types de liaisons laissent envisager des chaînes ramifiées formant un réseau relié par des ponts phosphodiester. Paradoxalement, une faible diminution de la masse molaire est observée par HPSEC. On peut penser que le polymère subit d'une part une dépolymérisation due aux conditions de la réaction qui sont favorables à ce phénomène. Et d'autre part une polymérisation par les ponts diesters conduisant à une masse molaire du dérivé final, qui varie peu.

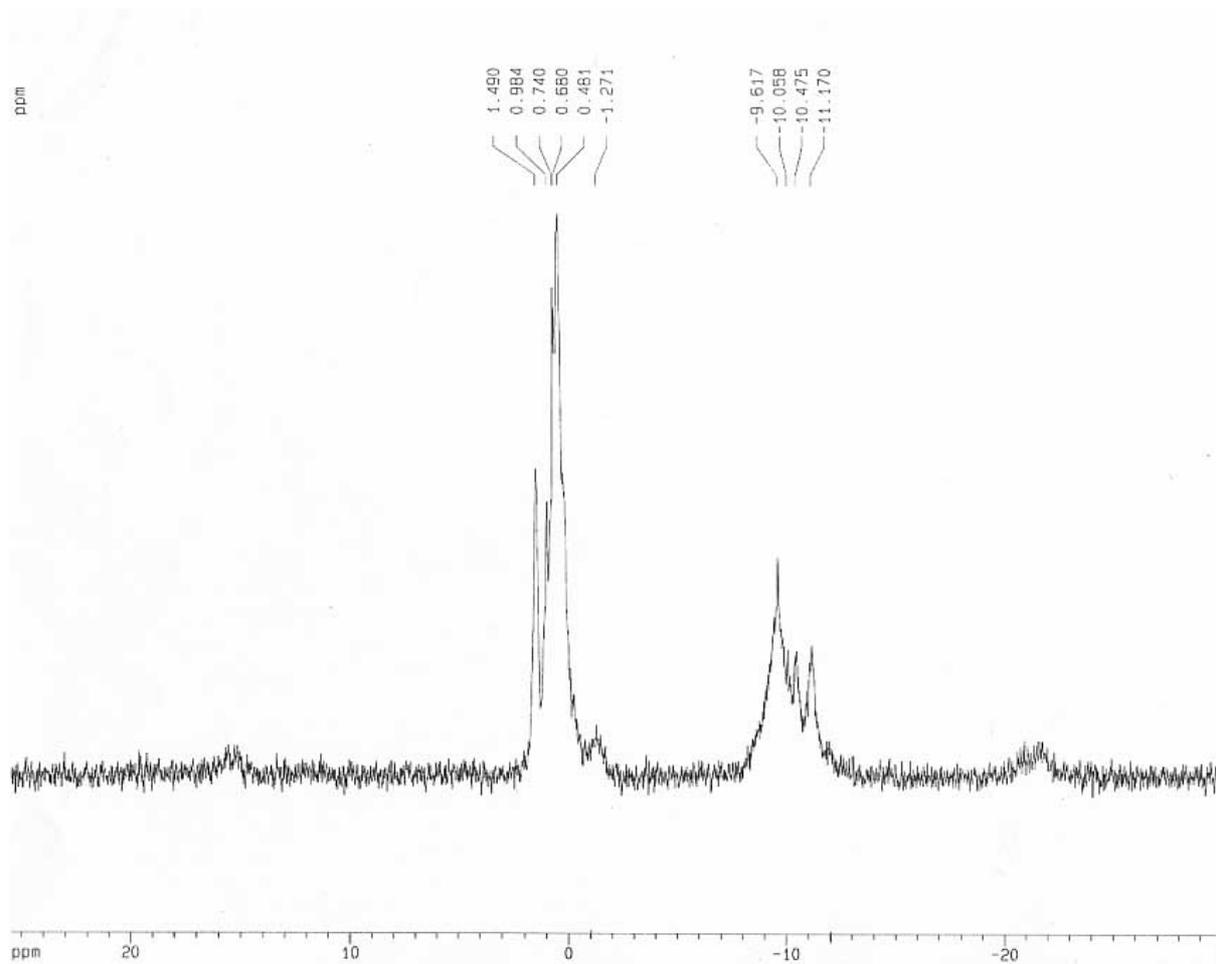


Figure 38 : Spectre RMN du phosphore réalisé sur le dérivé HE800DR-P

3.2.4. Propriétés anticoagulantes

3.2.4.1 Temps de céphaline activée des EPS sulfatés de faible masse molaires

Les activités anticoagulantes *in vitro* de dérivés sulfatés de faibles masses molaires ont été mesurées par le temps de céphaline activée (TCA). Les résultats ont été comparés à ceux d'une héparine de faible masse molaire commerciale. Ce test explore la voie endogène de la cascade de la coagulation et la formation de la thrombine. Les TCA de l'héparine et des dérivés de faibles masses molaires présentant différents taux de sulfates, obtenus précédemment par dépolymérisation radicalaire et sulfatation à partir des EPS HE800, GY785 et HYD721 ont été déterminés.

Tout d'abord, l'EPS HE800 a été testé sous forme de trois fractions obtenues par dépolymérisation radicalaire et présentant différents taux de sulfates: le HE800DR (0% de sulfate), le HE800DR-S (24 % de sulfates) et le HE800DR-ND-S (40 % de sulfates). Les résultats concernant ces trois fractions et l'héparine sont présentés dans la Figure 39. L'héparine de faible masse molaire qui constitue la référence, présente un doublement du temps de coagulation pour $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de plasma. Les valeurs obtenues pour des concentrations de 0 à $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de plasma avec le dérivé non sulfaté (HE800DR), sont identiques au contrôle. Sans substituant chargé, ce polymère ne possède aucune activité anticoagulante.

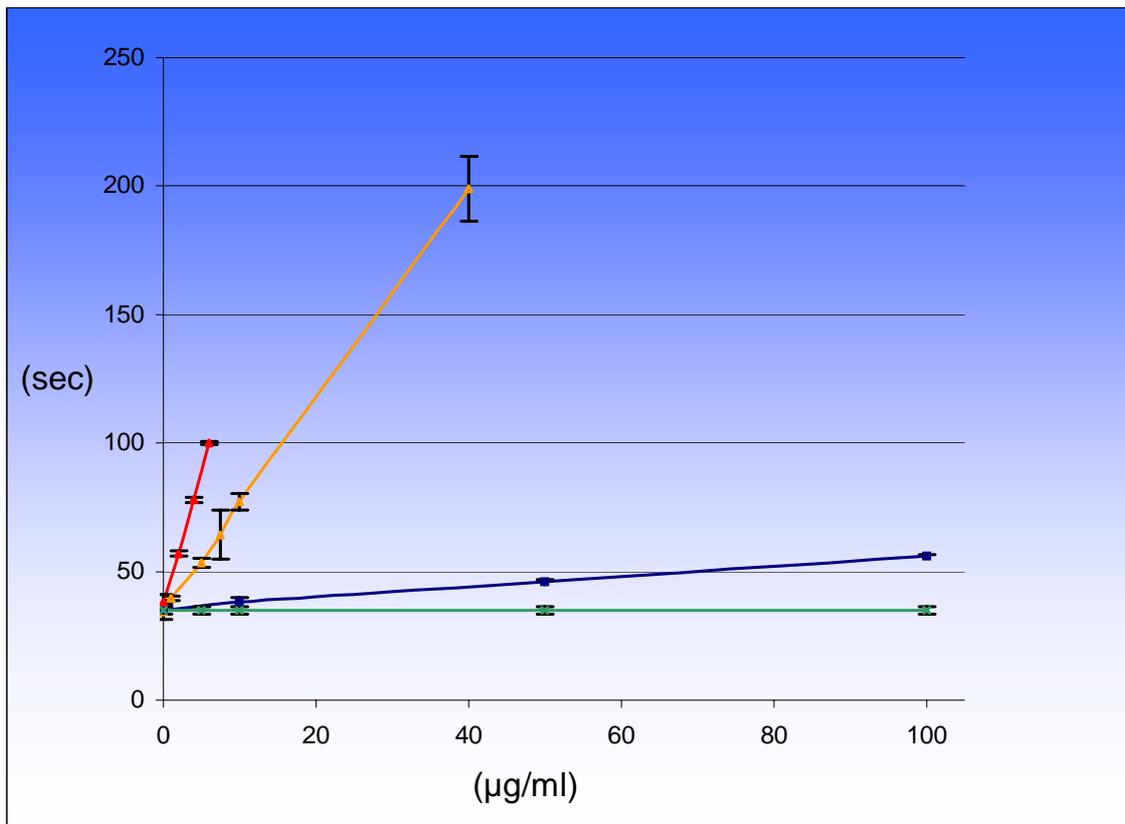


Figure 39 : Activités anticoagulantes des dérivés sulfatés du HE800 mesurées par temps de céphaline activée. -**Héparine** : Héparine de faible masse moléculaire ; **HE800DR (0% de sulfates)** : HE800 dépolymérisé par voie radicalaire non sulfaté ; **HE800DR-S (24 % de sulfates)** : HE800 dépolymérisé par voie radicalaire et sulfaté à 24% ; **HE800DR-MD-S (40 % de sulfates)** : HE800 dépolymérisé par voie radicalaire *N*-désacétylé par la soude et sulfaté à 40%.

La concentration en HE800DR-S (24 % de sulfates) requise pour le doublement du temps témoin est supérieure à $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de plasma pauvre en plaquettes. Une très grande quantité de produit est nécessaire pour observer un allongement par rapport au temps témoin. Ce dérivé est très peu actif comparé à l'héparine de faible masse molaire.

Le dérivé HE800DR-MD-S (40 % de sulfate) allonge le TCA de façon importante. La concentration nécessaire pour doubler le temps de contrôle est 10 fois moins importante que dans le cas du HE800DR-S (24 % de sulfates). L'activité des fractions testées augmente en fonction du taux de sulfate mais reste inférieure à celle de l'héparine pour un taux de sulfate équivalent (40 %).

Concernant l'EPS GY785, deux fractions de faibles masses molaires, produites par dépolymérisation radicalaire ont été testées: les TCA de la fraction GY785DR (8.2 % de sulfates) et GY785DR-S (37 % de sulfates) sont présentés dans la Figure 40.

Le GY785DR (8.2 % de sulfates) n'a pas été sulfaté par voie chimique, mais ce dérivé présente tout de même 8.2 % de sulfates. Cette valeur est obtenue grâce à un groupement sulfate initialement présent dans le polymère natif et qui persiste après la dépolymérisation.

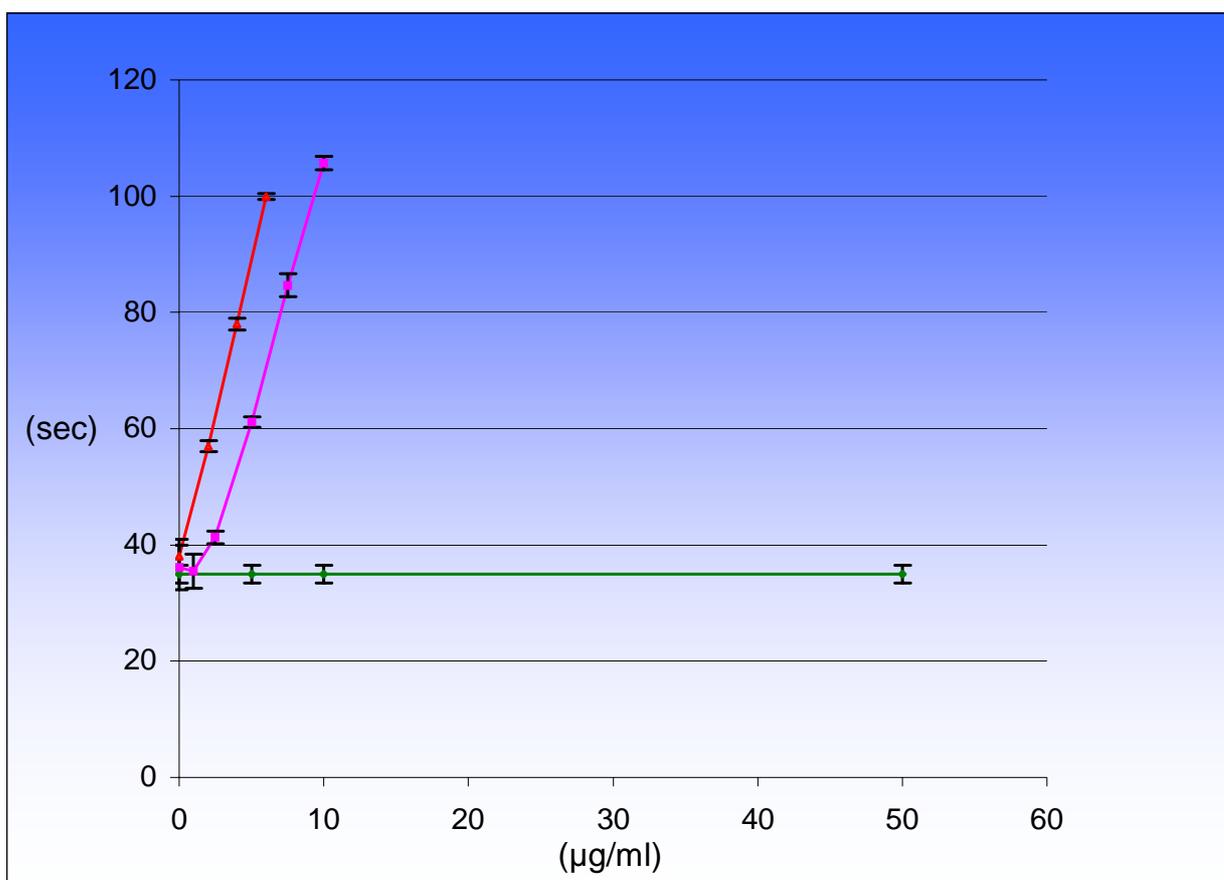


Figure 40 : Activités anticoagulantes des dérivés du GY785 mesurées par le temps de céphaline activée. **Héparine** : Héparine de faible masse moléculaire ; **GY785DR (8.2 % de sulfate)** : GY785 dépolymérisé par voie radicalaire non sulfaté; **GY785DR-S (37 % de sulfates)** : GY785 dépolymérisé par voie radicalaire et sulfaté à 37%. Résultats exprimés avec \pm SD (n=4)

Cependant il ne prolonge pas le temps de coagulation. En revanche, le dérivé sulfaté GY785DR-S (37 % de sulfates) allonge le TCA, la concentration requise pour doubler le temps de contrôle est seulement deux fois supérieure à celle de l'héparine (10 µg/ml).

Dans le cas du HYD721, deux fractions de faibles masses, produites par dépolymérisation radicalaire et présentant des taux de sulfate différents, ont également été testées. Les TCA, sont présentés dans la Figure 41.

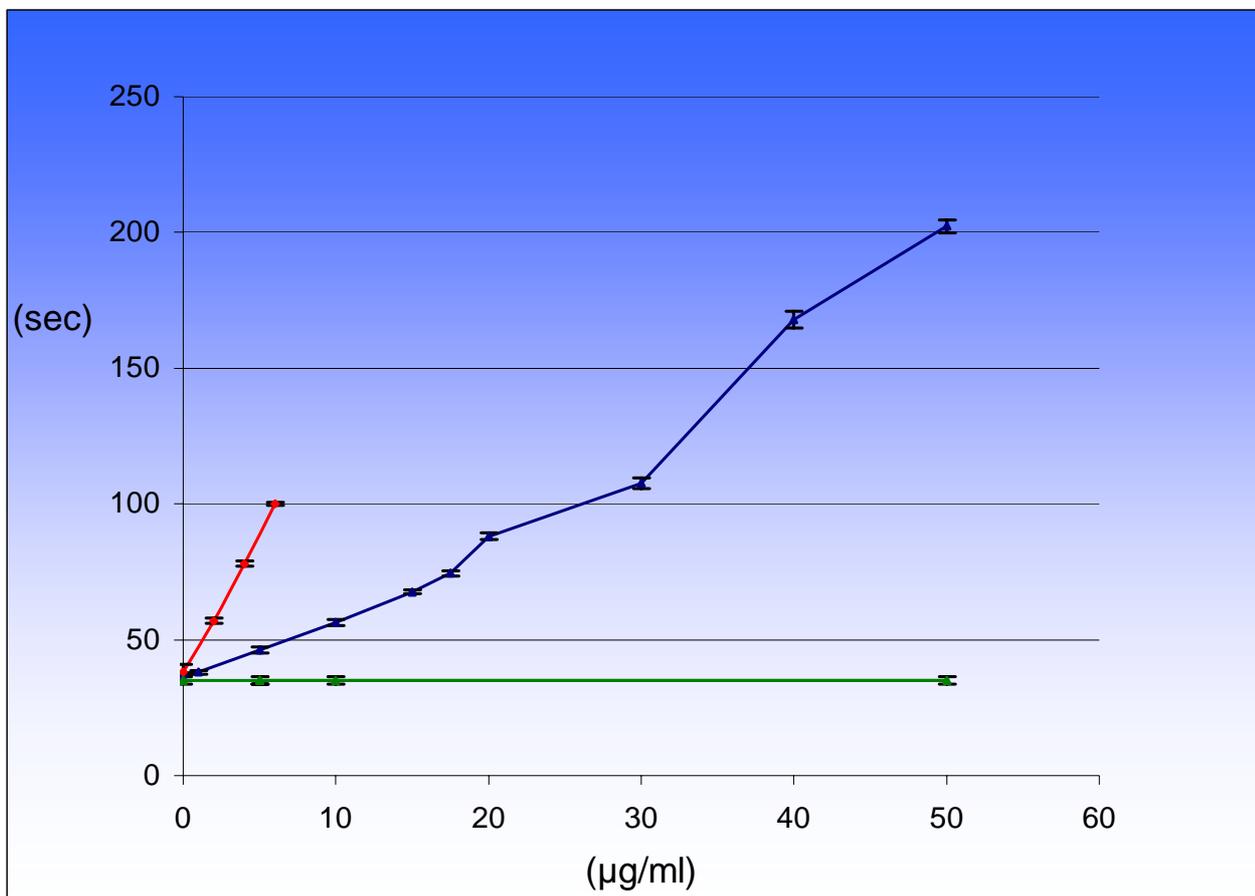


Figure 41: Activités anticoagulantes des dérivés du HYD721 mesurées par le temps de céphaline activée. **Héparine** : Héparine de faible masse moléculaire ; **HYD721DR (11.2 % de sulfates)** : HYD721 dépolymérisé par voie radicalaire; **HYD721DR-S (31% de sulfates)** : HYD721 dépolymérisé par voie radicalaire et sulfaté à 31 % . Résultats exprimés avec \pm SD (n=4)

La fraction HYD721 (11.2 % de sulfates) n'a pas été sulfatée mais, offre naturellement 11.2 % de sulfates. D'après la structure de ce polymère, un seul groupement sulfate est présent dans l'unité répétitive. Mais ce groupement n'est pas suffisant pour prolonger le temps de coagulation.

La fraction HYD721DR-S (31 % de sulfates) à été obtenue après sulfatation. Ce dérivé présente une activité modérée, puisque le doublement du TCA intervient pour $17 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

De manière générale, tous les dérivés possédant un taux de sulfate supérieur à 20 % allongent significativement le TCA. Une relation est évidente entre le taux de sulfates et l'activité anticoagulante. Quelle que soit la nature du polymère, les résultats précédents démontrent que le taux de sulfates influence directement l'allongement du temps témoin. Pour des taux de sulfates de l'ordre de 20 à 30 % l'activité est modérée, en revanche, au-delà de 35%, elle est beaucoup plus importante (doublement du temps témoin à $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Mais ces activités restent nettement inférieures à celle d'une héparine de faible masse molaire (doublement du temps témoin à $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) malgré un taux de sulfate équivalent.

Il a été montré, lors de l'étude physico-chimique des dérivés sulfatés, que les structures, par conséquent les positions des groupements sulfates sont très différentes d'un dérivé à l'autre. En effet, le HE800 possède une structure linéaire proche de celle de l'héparine, avec un mélange de *O*- et de *N*-sulfates lorsqu'il est *N*-désacétylé et sulfaté. Alors que le GY785 et le HYD721, après sulfatation, sont ramifiés et ne présentent que des *O*-sulfates.

3.2.4.2 Temps de céphaline activée des dérivés phosphatés

Les TCA des dérivés de faibles masses molaires présentant différents taux de phosphates, obtenus par dépolymérisation radicalaire et phosphatation à partir des EPS HE800 et GY785 ont été déterminés.

Les activités anticoagulantes des dérivés phosphatés du HE800 sont présentées dans la Figure 42. Deux fractions ont été testées, le HE800DR-P (20 % de phosphates) et le HE800DR-ND-P (27 % de phosphates). Les temps de coagulation de ces dérivés sont très proches du

temps témoin. Le test ne révèle aucune activité jusqu'à $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de plasma pour les deux dérivés.

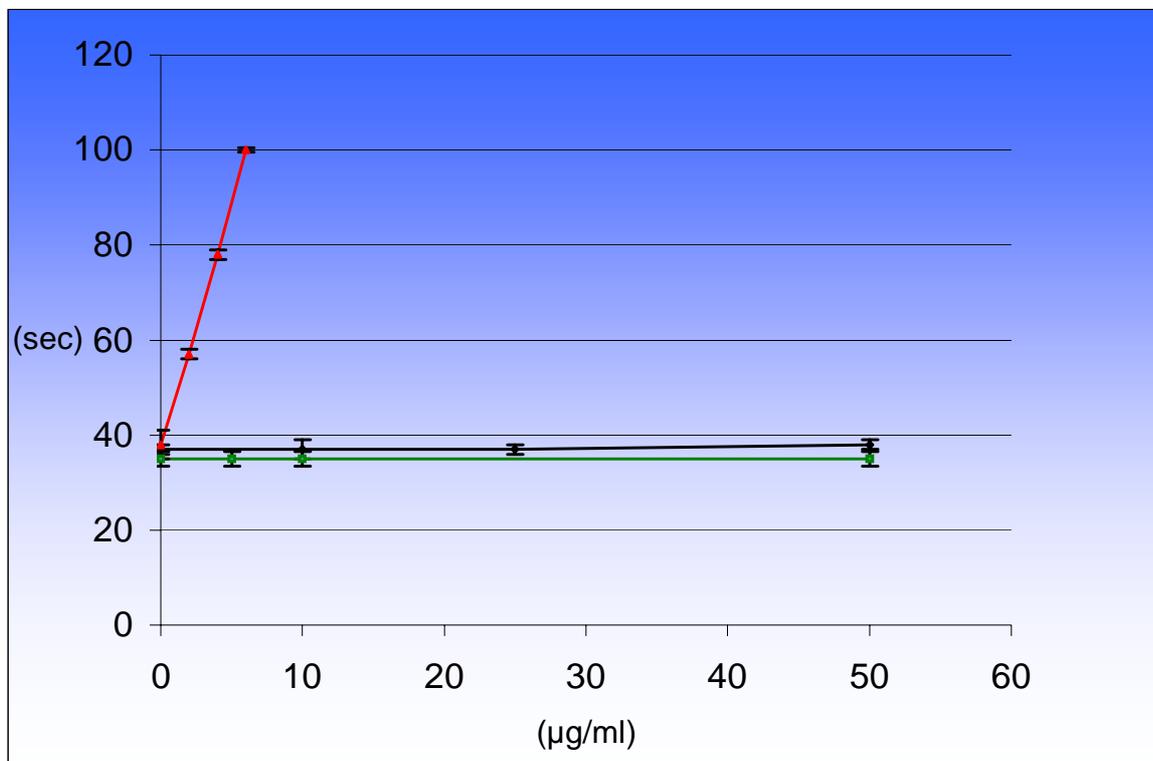


Figure 42 : Activités anticoagulantes du dérivé du HE800DR-P (20 % de phosphates) et du HE800DR-ND-S (35 % de phosphates) mesurées par le temps de céphaline activée. **Héparine** : Héparine de faible masse moléculaire; **HE800DR (0 % de phosphates)** : HE800 dépolymérisé par voie radicalaire; **HE800DR-P (20 % de phosphates)** : HE800 dépolymérisé par voie radicalaire et phosphaté; **HE800DR-ND-P (27 % de phosphates)** : HE800 dépolymérisé par voie radicalaire *N*-désacétylé et phosphaté

La Figure 43 présente les activités anticoagulantes des dérivés GY785. Deux fractions ont également été testées, le GY785DR (0 % de phosphates) et le GY785DR-P (35 % de phosphates).

Le dérivé phosphaté GY785DR-P (35 % de phosphates) présente un faible allongement du TCA par rapport à l'héparine. Le doublement du temps témoin intervient pour $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. L'étude structurale du GY785 a révélé la présence d'un groupement sulfaté qui persiste après

dépolymérisation et phosphatation. Or il a été montré précédemment que le dérivé de faible masse molaire, GY785DR non phosphaté, ne présente aucun allongement par rapport au temps témoin. Ce groupement sulfate, seul n'induit donc pas d'activité.

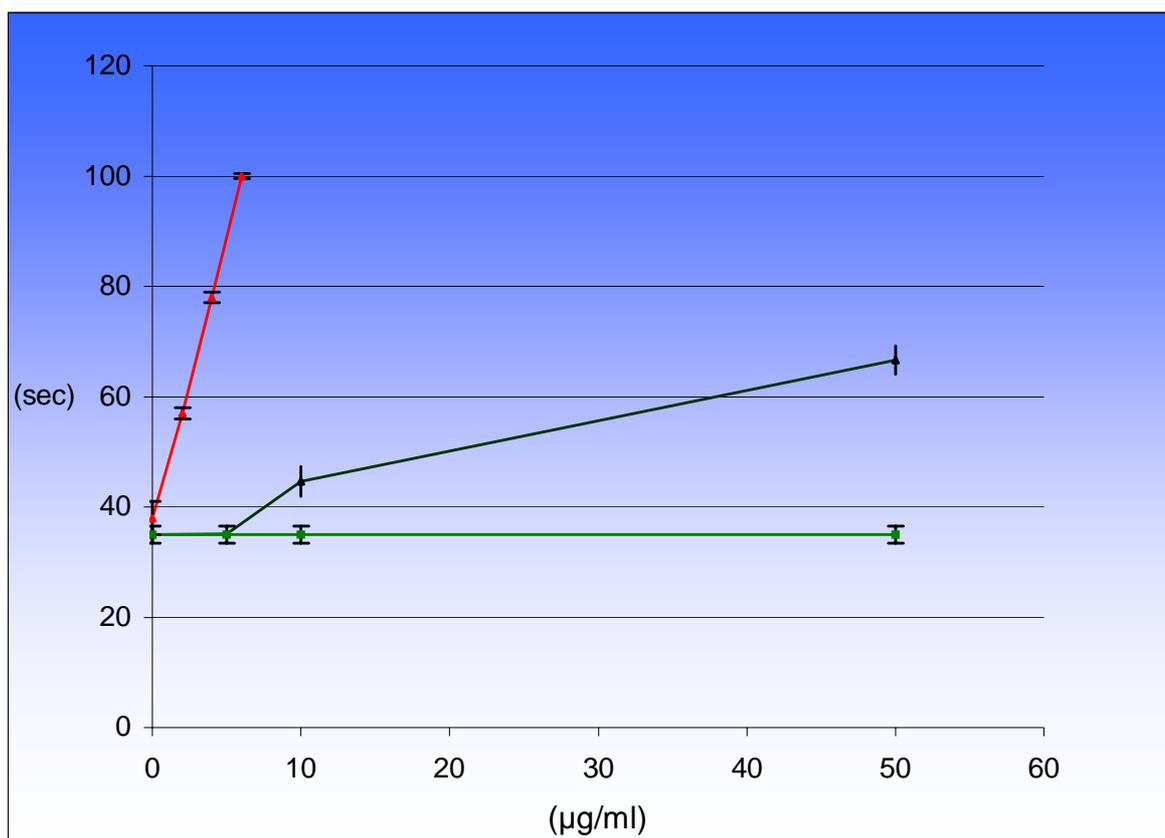


Figure 43: Activités anticoagulantes du dérivé phosphaté du GY785 mesurées par le temps de céphaline activée. **Héparine** : Héparine de faible masse moléculaire ; **GY785DR (0% de phosphates)**: GY785 dépolymérisé par voie radicalaire ; **GY785DR-P (35% de phosphates)**: GY785 dépolymérisé par voie radicalaire et phosphaté à 35.3% . Résultats exprimés avec \pm SD (n=4)

Avec 7.3 % de sulfates et 35 % de phosphates, le GY785DR-P est le plus chargé des produits testés dans cette étude. La présence de ce groupement sulfate doit être prise en compte dans le faible allongement du temps témoin. L'activité anticoagulante est une résultante de la structure globale de la molécule, donc de la présence de l'ensemble des substituants, sulfates et phosphates.

Il est difficile de comparer les dérivés d'EPS chargés entre eux, car chaque polymère possède une structure différente et leur sulfatation/phosphatation conduit à des produits dont le taux de substitution est variable. La composition osidique et la présence de ramifications influencent également le nombre et la position des sulfates sur la molécule.

Les dérivés du HE800, du GY785 et du HYD721 de faibles masses molaires présentant de faibles taux de sulfates (inférieurs à 15 %) n'ont aucune activité anticoagulante. Ces résultats confirment que l'apport de charges négatives par des groupements fonctionnels est indispensable à ce type d'activité biologique.

Les dérivés sulfatés (<30%) et phosphatés provoquent un allongement modéré du TCA. Une quantité minimum de groupements sulfates (de l'ordre de 20 %) est indispensable pour induire un allongement du temps de coagulation.

Au regard des résultats obtenus sur les dérivés phosphatés du HE800 et du GY785, l'apport de charges négatives n'est pas suffisant pour induire une activité anticoagulante significative. L'apport de groupements phosphates ne semble provoquer qu'un très faible allongement du temps de coagulation. Les protéines impliquées dans l'activité anticoagulante semblent très spécifiques des conformations et des charges négatives apportées par les groupements sulfates. Les dérivés les plus actifs sont le HYD721DR-S, le GY785DR-S et le HE800DR-ND-S, ils possèdent respectivement 31%, 37% et 40% de sulfates. Leurs structures sont très différentes, pourtant les allongements de TCA semblent proportionnels au taux de sulfates indépendamment de la structure. Une caractérisation plus approfondie de l'activité de ces trois dérivés a été réalisée afin de découvrir leur mécanisme d'action dans la cascade de la coagulation

3.2.4.3 Temps de thrombine

L'activité anticoagulante des trois dérivés les plus actifs en TCA a également été mesurée par rapport aux temps de thrombine puis comparée aux résultats obtenus avec l'héparine de faible masse molaire. Ce test mesure l'inhibition de la thrombine (un facteur clé de la cascade

de la coagulation) dans du plasma humain en présence de l'EPS étudié. Les résultats sont présentés dans le Tableau 31.

Temps de Thrombine (secondes)				
$\mu\text{g/mL PPP}$	0	10	50	100
HE800DR-ND-S (40 % sulfates)	15 ± 0.6	22.6 ± 0.1	108.7 ± 2	>200
GY785DR-S (37 % sulfates)	15 ± 0.6	25.5 ± 0.5	>200	>200
HYD721DR-S (31 % sulfates)	15 ± 0.6	21.2 ± 1	166.4 ± 5	>200
$\mu\text{g/mL PPP}$	0	2	4	6
Héparine	15 ± 0.6	96 ± 8	>200	>200

HE800DR-ND-S: HE800 dépolymérisé par voie radicalaire N-désacétylé par la soude et sulfaté à 40% ; GY785DR-S : GY785 dépolymérisé par voie radicalaire et sulfaté à 37% ; HYD721DR-S: HYD721 dépolymérisé par voie radicalaire et sulfaté à 31% Résultats exprimés avec \pm SD (n=4)

Tableau 31 : Temps de thrombine des dérivés sulfatés du HE800, du GY785 et du HYD721

Contrairement à l'héparine, qui présente un allongement du temps de thrombine par rapport au temps témoin de 96 sec pour $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de plasma, les dérivés sulfatés des EPS ne provoquent qu'un très faible allongement du temps de thrombine, celui-ci intervient pour des quantités supérieures à $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.2.5. Interaction des dérivés sulfatés avec les serpinés

L'héparine catalyse l'inhibition de plusieurs facteurs de la coagulation par leurs inhibiteurs naturels, l'antithrombine III (AT) et le deuxième cofacteur de l'héparine (HC II). L'AT présente en effet une très forte affinité pour une séquence particulière de l'héparine constituée d'un

pentasaccharide (Choay *et al.*, 1983). L'AT subit alors un changement conformationnel et voit ainsi augmenter son affinité pour la thrombine qu'elle inhibe. L'héparine interagit également avec l'HCII mais présente une affinité plus faible engendrée par des liaisons électrostatiques. La fixation de l'HCII à l'héparine entraîne un changement conformationnel de l'HCII qui va pouvoir se lier à la thrombine et l'inhiber (Tollefsen *et al.* 1982)

L'objectif de l'étude suivante est d'évaluer l'affinité des trois dérivés sulfatés les plus actifs en TCA vis à vis de l'AT et de l'HC II, afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action dans la cascade de la coagulation.

3.2.5.1 Affinité des dérivés sulfatés avec l'antithrombine

L'affinité des dérivés de faibles masses molaires HE800DR-ND-S (40% de sulfates), GY785DR-S (37 % de sulfates) et HYD721DR-S (31 % de sulfates) pour l'AT a été testée par électrophorèse d'affinité et comparée à une héparine (Figure 44).

L'héparine constitue la référence dans cette technique d'électrophorèse. Une héparine non fractionnée de 29 KDa (en équivalents pullulanes) à été utilisée car l'héparine de faible masse molaire présente une affinité plus faible pour l'AT difficile à mettre en évidence par ce test. Lors de sa migration, l'héparine possède une mobilité importante en l'absence d'AT (0). Elle migre dans le bas du gel, ses chaînes ne sont pas retardées. En présence d'AT (1) et (2), un tiers des chaînes sont retardées au niveau de la zone contenant l'AT. Les chaînes liées à l'AT présentent une haute affinité pour la protéine, elles restent dans la première moitié du gel. Un complexe indissociable s'est formé puisque entre la protéine et le polymère.

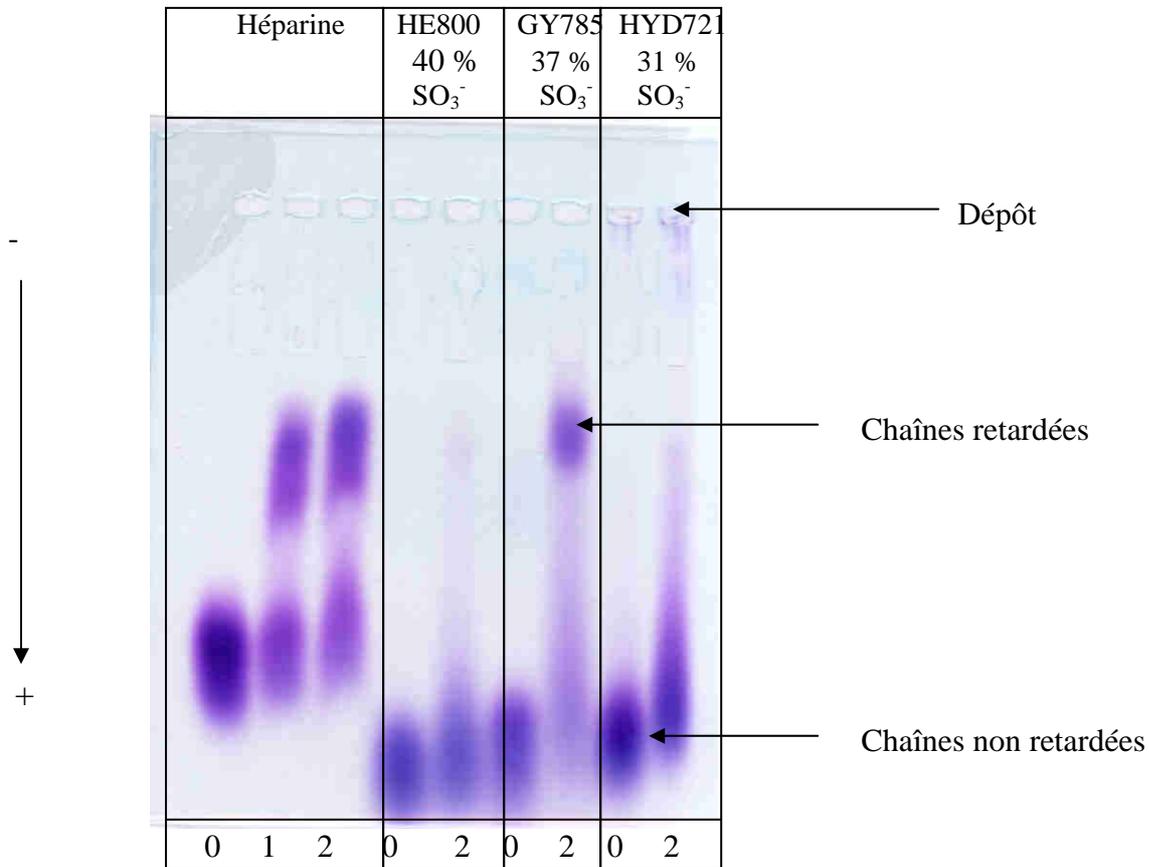


Figure 44 : Analyse de l'affinité des dérivés de faible masse moléculaire, du HE800DR-ND-S (20 μg), du GY785DR-S (20 μg) et du HYD721DR-S avec l'antithrombine III. L'électrophorèse des polysaccharides est réalisée à travers les auges contenant le tampon (contrôle) ou la protéine. Les concentrations en antithrombine sont 0 μM (0), 43 μM (1) et 86 μM (2)

Le HE800DR-ND-S (40 % de sulfates) ne présente qu'une très faible quantité de chaînes retardées. La quasi-totalité des chaînes présente une grande mobilité et migre dans le bas du gel. Malgré la présence des 40 % de groupements sulfates, ce dérivé ne semble avoir aucune affinité pour l'AT.

L'électrophorèse, révèle une forte proportion de chaînes du GY785DR-S (37 % de sulfates) possédant une faible mobilité. Ces dernières sont retardées dans la zone où la protéine est présente. Ces chaînes de haute affinité pour l'AT constituent la quasi-totalité des chaînes présentes dans ce dérivé. Alors que dans l'héparine, un tiers seulement des chaînes présentent

une forte affinité pour l'AT, le GY785DR-S voit toutes ses chaînes former un complexe indissociable avec la protéine. Le GY785 possède en effet, un motif répétitif très régulier de neuf oses. Les groupements sulfates sont donc très probablement répartis de façon homogène le long de la chaîne polysaccharidique. La séquence responsable de cette interaction est donc omniprésente dans le GY785. Au contraire, l'héparine possède un seul motif pentasaccharidique de haute affinité pour l'AT, qui n'est présent que sur un tiers des chaînes de l'héparine. Bien que la structure du GY785 soit totalement différente de la structure du pentasaccharide de l'héparine, l'AT retarde près de 100 % des ses chaînes. Mais il est impossible de savoir si ce dérivé se lie de la même façon que l'héparine à l'AT et la séquence responsable de cette affinité n'a pas été déterminée.

Le dérivé du HYD721DR-S (31 % de sulfates) présente un faible retard au niveau de la zone où se situe en protéine. Ce dérivé présente un spot de forme allongée dans le bas du gel ceci traduit une affinité modérée pour l'AT. Mais son taux de sulfates est inférieur à celui du GY785DR-S ou celui de l'héparine. Le complexe formé entre les chaînes du HYD721DR-S et l'AT se dissocie au cours de l'électrophorèse. Contrairement à l'héparine, il n'est pas possible d'observer des familles de chaînes de forte affinité pour l'AT.

De façon à vérifier les résultats inattendus obtenus pour le HE800DR-ND-S, un deuxième gel a été réalisé afin de confirmer l'hypothèse de l'absence d'affinité de ce dérivé pour l'AT. Les concentrations en polysaccharides déposées au départ ont été augmentées de 20 µg à 50 µg pour bien visualiser d'éventuels retards sur les chaînes des dérivés du HE800 (Figure 45).

Trois dérivés de faible masse molaire du HE800 ont été testés, le HE800DR (0 % de sulfates), le HE800DR-S (24 % de sulfates) et le HE800DR-ND-S (40 % de sulfates).

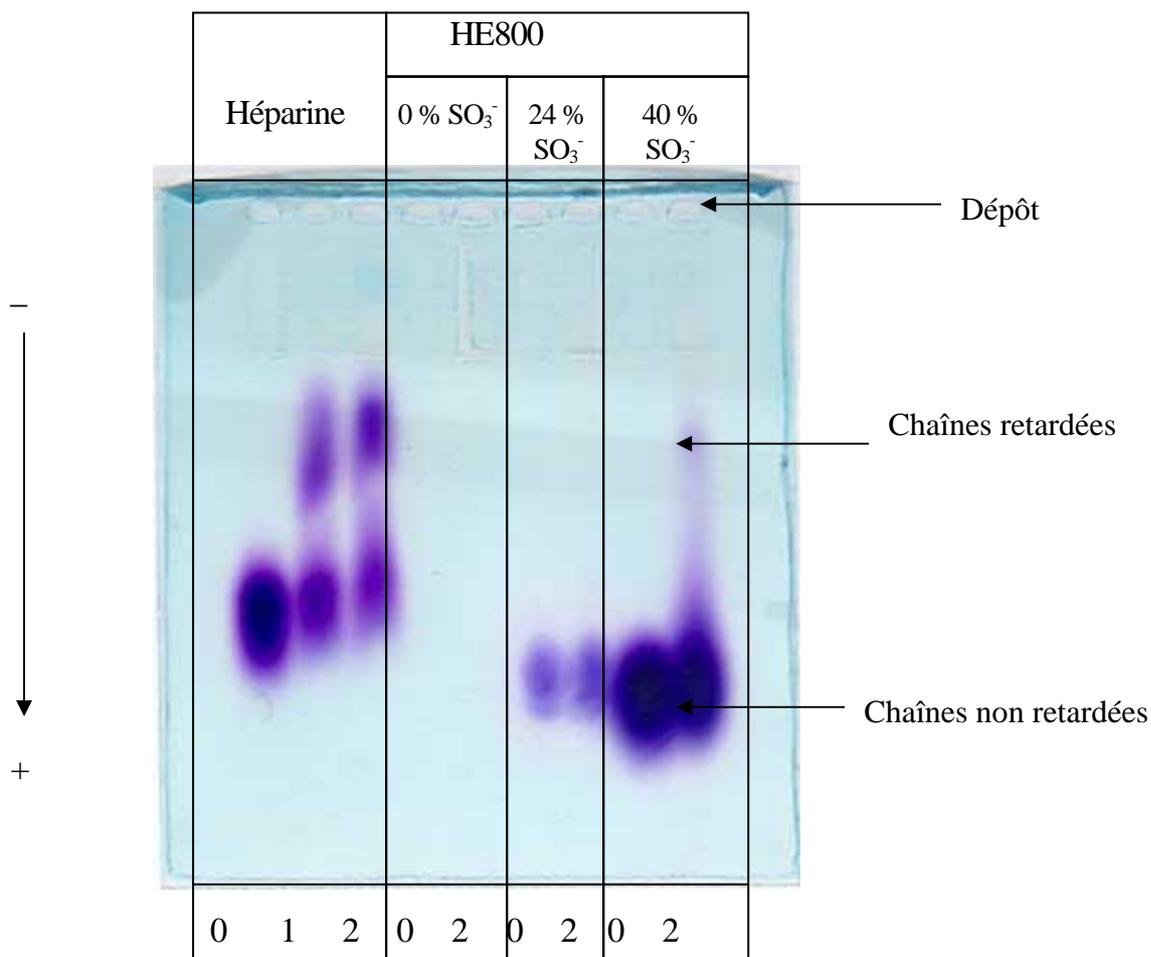


Figure 45 : Analyse de l'affinité des dérivés HE800DR ; HE800DR-S et HE800DR-ND-S (50 μg) et de l'héparine de basse masse moléculaire (20 μg) avec l'antithrombine III. L'électrophorèse des polysaccharides est réalisée à travers les auges contenant le tampon (contrôle) ou la protéine. Les concentrations en antithrombine sont 0 μM (0); 43 μM (1) et 86 μM (2).

L'héparine présente les mêmes caractéristiques que dans le gel précédent. Le dérivé du HE800 qui ne possède pas de groupement sulfate n'apparaît pas dans ce gel car la coloration est réalisée avec le bleu de toluidine. Ce colorant est spécifique des chaînes polyanioniques. Le HE800DR-S (24% de sulfates) est visible mais la coloration présente une faible intensité.

Ce dérivé ne montre aucun retard dû à une interaction spécifique ou non avec l'AT. En revanche, le HE800DR-ND-S (40% de sulfates) présente une coloration très intense,

proportionnelle à son taux de sulfate, comparable celui de l'héparine. Ce gel confirme que très peu de chaînes sont visibles (malgré la forte concentration de départ) au niveau de la zone où se situe la protéine. Bien que le taux de sulfates soit élevé et les similitudes structurales avec l'héparine soient fortes, les chaînes du HE800DR-ND-S ne présentent aucune interaction spécifique avec l'AT.

3.2.5.2 Interaction avec le deuxième cofacteur de l'héparine

L'affinité des dérivés sulfatés de faible masse molaire du HE800 (40% de sulfates), du GY785 (37 % de sulfates) et du HYD721 (31 % de sulfates) pour l'HCII a été testée par électrophorèse d'affinité (Figure 46).

En présence d'HC II, aucune liaison de forte affinité n'est mise en évidence avec l'héparine. En effet il résulte de l'interactions entre l'HCII et l'héparine un complexe instable qui est très vite dissocié au cours de l'électrophorèse. L'héparine poursuit la migration dans le gel sans présenter de retard visible.

Le dérivé HE800DR-ND-S (40 % de sulfates), comme l'héparine, ne possède aucune chaîne retardée et les profils de migration de ces deux polysaccharides sont identiques en présence de protéine ou de tampon (contrôle).

Par contre le dérivé GY785DR-S présentent des chaînes retardées en présence d'HCII. La position de ce spot traduit une interaction forte entre une partie des chaînes du GY785DR-S et l'HCII.

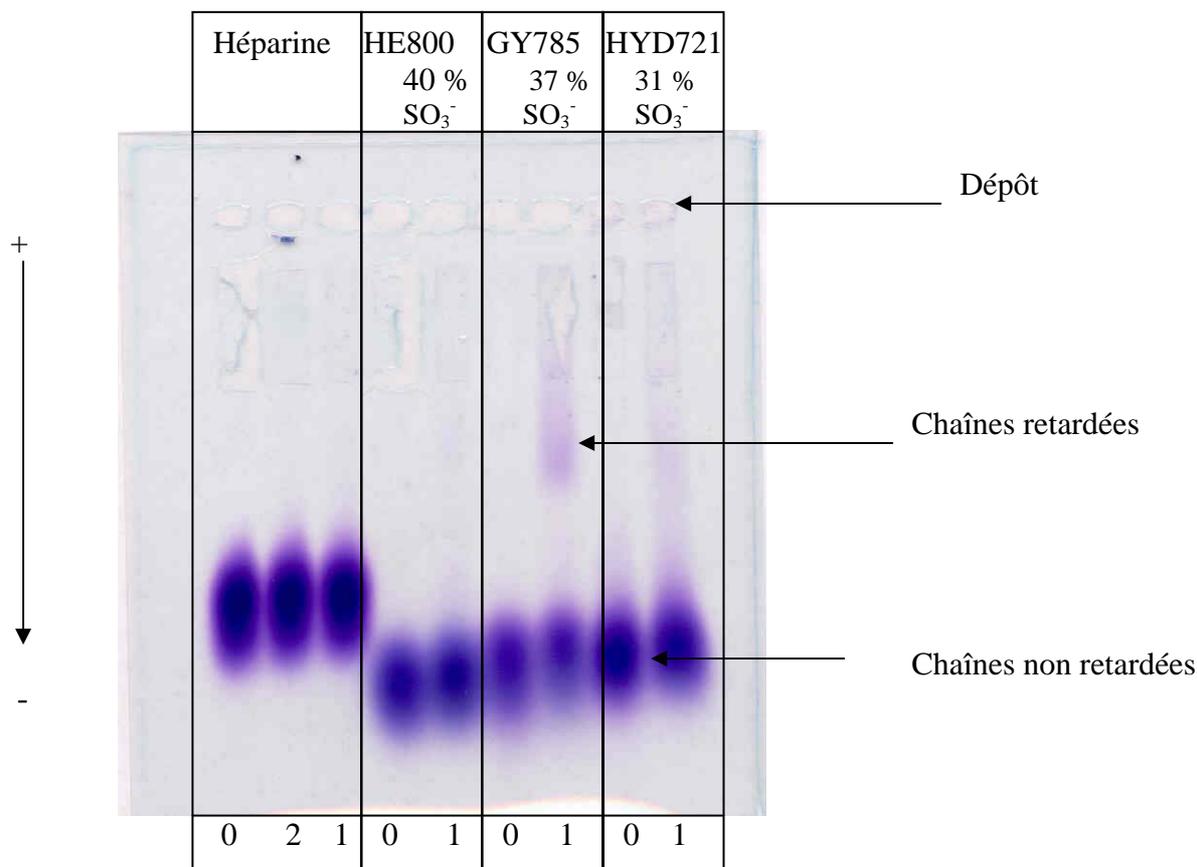


Figure 46 : Analyse de l'affinité des dérivés de faible masse moléculaire du HE800 (20 µg), du GY785 (20µg) et du HYD721 (20µg) avec l'HC II. L'électrophorèse des polysaccharides est réalisée à travers les auge contenant le tampon (contrôle) ou la protéine. Les concentrations en cofacteur II de l'héparine sont 86µM (1) ; 43 µM (2) et 0 µM (0).

Le dérivés HYD721DR-S présente également des chaînes retardées en présence d'HCII. Mais le spot est plus diffus que pour le GY785DR-S et se répartit entre la zone où se situe l'HCII et le bas du gel. Le complexe formé est donc dissociable, l'interaction entre la protéine et le HYD721DR-S apparaît peu spécifique, ce qui peut être traduit comme une faible affinité de ce dérivé pour l'HCII.

Les résultats précédents indiquent que les mécanismes d'interaction entre les trois dérivés les plus anticoagulants et l'AT sont différents. Les dérivés GY785DR-S et HYD721DR-S, semblent présenter une affinité pour cette protéine qui pourrait expliquer leur activité anticoagulante. Par contre, le dérivé HE800DR-MD-S ne présente aucune affinité pour les deux

serpines étudiées. Les mécanismes d'action de ces dérivés dans la cascade de la coagulation restent à définir.

Conclusion et perspectives

La première partie de cette étude a consisté à caractériser la structure de l'unité répétitive de l'exopolysaccharide GY785 produit par une bactérie issue du milieu hydrothermal profond *Alteromonas infernus*. En raison de la complexité de sa structure, l'étude de ce polymère a nécessité la préparation par hydrolyse acide partielle, d'oligosaccharides et de fractions purifiées de faibles masses molaires. L'ensemble des informations obtenues en combinant des techniques de méthylation, de spectrométrie de masse et de RMN 2D, a conduit à une hypothèse de structure. La particularité de cette unité, composée de neuf résidus, est la présence d'une ramification elle-même substituée. Le départ de cette ramification est composé de deux acides glucuroniques, substitués par deux glucoses et un galactose. La chaîne principale est constituée d'un résidu de glucose, d'un résidu de galactose et d'un acide galacturonique trisubstitué portant un groupement sulfate en position 2.

Une étude des propriétés anticoagulantes *in vitro* a été réalisée sur des dérivés du GY785 et de deux autres exopolysaccharides de structures connues. L'unité répétitive de l'EPS HE800 est constitué d'un tétrasaccharide linéaire composé de deux acides glucuroniques, d'une *N*-acétylglucosamine et d'une *N*-acétylgalactosamine (Rougeaux *et al.*, 1999b). Ce dernier présente une structure proche de celle des glycosaminoglycanes rencontrés chez les mammifères. L'EPS HYD721 (Rougeaux *et al.*, 1998) possède une unité répétitive octasaccharidique composée de deux ramifications dont l'une est sulfatée.

Considérant les faibles taux de sulfates (entre 0 et 10 %) présents dans les exopolysaccharides natifs et de faibles masses molaires, il n'est pas surprenant que ces EPS ne possèdent aucune activité anticoagulante. Nishino *et al.*, (1991) ont effectivement montré que le fucane ne possède pas de propriétés anticoagulantes significatives tant que le nombre de sulfate par résidu n'excède pas un. Il était donc nécessaire de modifier ces polymères dans le but de leur conférer une activité anticoagulante. Pour cela, des fractions ont été obtenues par dépolymérisation radicalaire et sulfatation ou phosphatation afin d'obtenir des produits actifs possédant la plus faible masse molaire possible et différents taux de sulfates ou de phosphates.

L'utilisation de radicaux libres pour la dépolymérisation apparaît comme une technique non dénaturante pour l'unité répétitive au regard de l'étude physico-chimique des trois exopolysaccharides utilisés. Les produits de faibles masses molaires obtenus sont homogènes par rapport aux produits de départ et ont une polydispersité généralement comprise entre 1 et 2. Les résultats sont reproductibles, avec des rendements de l'ordre de 60 %.

Le GY785 et le HYD721 possèdent tous deux des structures ramifiées. Ils présentent de nombreux oses neutres peu substitués. Lors de la sulfatation, les hydroxyles accessibles de ces résidus neutres offrent de nombreux sites possibles pour les groupements sulfates. Des fractions de faibles masses molaires possédant des taux de sulfates compris entre 30 et 40 % ont pu être obtenus.

L'activité anticoagulante du dérivé GY785 (37 % de sulfates) est deux fois plus faible que celle de l'héparine. L'électrophorèse d'affinité a montré une forte affinité de ce dérivé pour l'AT. Ce dérivé pourrait inhiber l'activité ou la formation de la thrombine comme le suggère Ofosu *et al.* (1986) pour l'héparine. Trois voies sont possibles : (i) catalyse de l'inhibition de la thrombine par l'antithrombine; (ii) catalyse de l'inhibition de la thrombine par le deuxième cofacteur de l'héparine; (iii) inhibition du complexe prothrombinase ou de l'expression de son activité. De récentes études ont montré que l'effet catalytique sur l'inhibition de la thrombine (plutôt que sur l'inhibition du facteur Xa) est capital pour une activité anticoagulante ou antithrombotique optimale. D'ailleurs, des polysaccharides présentant une activité anticoagulante plus faible que celle de l'héparine pourraient exhiber un pouvoir antithrombotique avec un plus faible risque hémorragique. 100 % de ses chaînes du GY785 (37 % de sulfates) sont capables de former un complexe avec l'antithrombine. Ce complexe apparaît indissociable lors des électrophorèses d'affinité. Pourtant, les données structurales de ce polysaccharide montrent de façon certaine la présence d'une ramification qui porte la majorité des groupements sulfates. Cette structure ramifiée est très différente de celle du pentasaccharide de l'héparine décrite par Choay *et al.* (1983).

La structure de l'exopolysaccharide HE800 est linéaire. La sulfatation directe des dérivés de faible masse molaire ne permet pas d'obtenir des taux de sulfates supérieurs à 24%. Les

dérivés du HE800 préparés de cette manière, ne présentent qu'une très faible activité anticoagulante. En revanche, la *N*-désacétylation partielle du HE800 a permis d'augmenter le taux de sulfatation d'environ 70 % par rapport au produit acétylé. Le dérivé ainsi obtenu est un oligosaccharide de 12 résidus en moyenne, présentant un groupement *N*-sulfate et 5 *O*-sulfates par tétrasaccharide. Ce dérivé présente un taux de sulfate équivalent à celui de l'héparine (40 %). Cependant, il possède une activité inférieure à celle de l'héparine. Cette activité est comparable à celle du pentosane polysulfate (Giedrojc *et al.*, 1999). Malgré les similitudes structurales avec l'héparine, ce dérivé ne présente aucune affinité ni pour l'antithrombine, ni pour le deuxième cofacteur de l'héparine. Ces résultats indiquent que le HE800 allonge le temps de coagulation en utilisant un mécanisme différent de celui de l'héparine. L'absence d'acide L-iduronique au sein de cet oligosaccharide implique une configuration de la molécule différente de celle de l'héparine. En effet, la majorité des séquences de haute affinité pour l'AT, identifiées dans les glycosaminoglycanes, contiennent au moins un tel résidu dans leur unité répétitive (Kovensky *et al.*, 1999). Les motifs exhibés par cet oligosaccharide ne sont pas reconnus par le site spécifique du pentasaccharide de l'héparine porté par l'antithrombine.

L'étude des dérivés phosphatés du GY785 et du HE800 de faible masse molaire démontre que l'apport de charges négatives sur ces polysaccharides n'est pas suffisant pour induire une activité anticoagulante *in vitro*. Toutefois, l'étude par RMN du phosphore semble indiquer la présence de ponts diester. Les groupements phosphates relient, dans ce cas, deux résidus glycosidiques. Le réseau de chaînes ainsi formé rend les groupements phosphates peu accessibles pour d'éventuelles interactions électrostatiques avec des protéines. En revanche, cette capacité à former des liaisons inter-chaînes, pourrait être utilisée comme agent de polymérisation pour former des composés polysaccharidiques insolubles. Des dérivés de dextrans sont effectivement préparés en utilisant un agent de polymérisation (épichlorohydrine) qui crée des liaisons inter-chaînes de façon à obtenir un composé de haute masse molaire insoluble dans l'eau. Ce produit réduit le dessèchement des plaies et favorise la cicatrisation (Lloyd *et al.*, 1998).

Conformément à nos attentes, les résultats de ce travail combinant l'étude structurale, les modifications chimiques et les propriétés biologiques mettent en évidence les propriétés originales et innovantes des exopolysaccharides bactériens issus des sources hydrothermales. Cependant la nature des interactions entre les exopolysaccharides ramifiés, sulfatés tels que le GY785 et l'antithrombine ou le deuxième cofacteur de l'héparine, est inconnue. Seule une étude approfondie par cristallographie et modélisation moléculaire du complexe protéine-polysaccharide pourrait révéler le mode de liaisons de ces polymères sur ces deux protéines. L'oligosaccharide dérivé du HE800 et possédant 40 % de sulfates possède une activité anticoagulante deux fois plus faible que celle de l'héparine. Des études ultérieures devront être réalisées afin de préciser son mécanisme d'action dans la cascade de la coagulation.

Cependant, cette activité était un moyen de valider et d'éprouver des modifications apportées aux polysaccharides. Mais des exopolysaccharides de faibles masses molaires, préparés lors de cette étude, à partir du HE 800 et du GY 785, sont actuellement étudiés pour leur capacité à moduler l'effet angiogène du FGF-2 et du VEGF. L'intérêt de ces recherches est de découvrir des molécules naturelles qui modulent l'angiogenèse en l'absence ou en présence de facteurs pro-angiogènes. Des études sont également menées sur l'action de ces dérivés sur la recatrisation tissulaire et la cancérologie/onco-hématologie.

L'extrême variété des structures des exopolysaccharides bactériens d'origine hydrothermale, combinée aux modifications chimiques font de ces polymères une source importante de nouvelles molécules bioactives. Les modifications par voie chimique présentent de nombreux avantages : elles sont en générale applicables d'un polysaccharide à l'autre, sont rapides et peu onéreuses. Les dépolymérisations par voie acide ou radicalaire permettent de préparer des fractions de faibles masses molaires à partir de polymères inconnus, ce qui facilite leurs caractérisations structurales par exemple. Mais les connaissances acquises lors de cette étude permettent d'envisager l'identification d'enzymes capables de dépolymériser et de fonctionnaliser ces exopolysaccharides mieux connus à présent.

Bibliographie

Banik M., Kanari B. and Updhyay S. (2000). Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 407-414.

Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J. and Stone B.A. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.*, 113, 291-299.

Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, 54, 484-9.

Bozzi L., Milas M. and Rinaudo M. (1996). Characterization and solution properties of a new exopolysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas sp.* strain 1644. *Int. J. Biol. Macromol.*, 18, 9-17.

Calazans G.M.T., Lima R.C., de Franca F.P. and Lopes C.E. (2000). Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis levans*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 27, 245-7.

Carlfors J., Edsman K., Petersson R. and Jornving K. (1998). Rheological evaluation of Gelrite in situ gels for ophthalmic use. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 6, 113-9.

Carlin G., Wik K.O., Arfors K.E., Saldeen T. and Tangen O. (1976). Influences on the formation and structure of fibrin. *Thromb. Res.*, 9, 623-36.

Casu B., Grazioli G., Razi N., Guerrini M., Naggi A., Torri G., Oreste P., Tursi F., Zoppetti G. and Lindahl U. (1994). Heparin-like compounds prepared by chemical modification of capsular polysaccharide from *E. coli* K5. *Carbohydr. Res.*, 263, 271-84.

Cheung P. (1996). The hypercholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr. Res.*, 16, 1721-1725.

Chevolot L., Foucault A., Chaubet F., Kervarec N., Sinquin C., Fisher A.M. and Boisson-Vidal C. (1999). Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.*, 319, 154-65.

Chevolot L., Mulloy B., Ratiskol J., Foucault A. and Collic-Jouault S. (2001). A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr. Res.*, 330, 529-35.

Choay J., Petitou M., Lormeau J.C., Sinay P., Casu B. and Gatti G. (1983). Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 492-9.

Christie W. W. (1989). The preparation of derivatives of fatty acids. In : Gas chromatography and lipids: a practical guide, Christie W. W. (Eds), The oily press. pp. 64-84

Colliec Jouault S., Chevolut L., Helley D., Ratiskol J., Bros A., Sinquin C., Roger O. and Fischer A.M. (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1528, 141-51.

Corpe W.A. (1970). An acid polysaccharide produced by a primary film-forming marine bacterium. *Dev. Ind. Microbiol.*, 11, 402-412.

Costerton J.W., Irvin R.T. and Cheng K.J. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 35, 299-324.

Crescenzi V. (1995). Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnol. Prog.*, 11, 251-9.

Dace R., McBride E., Brooks K., Gander J., Buszko M. and Doctor V.M. (1997). Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides. *Thromb. Res.*, 87, 113-21.

De Baets S. and Vandamme E. (2001). Extracellular *Tremella* polysaccharide: structure, properties and applications. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1361-1366.

DeBelder A.N. (1993) Industrial gums Polysaccharides and their derivatives. Whistler R. and BeMiller J. (Eds), Third edition ACADEMIC PRESS, 399-426.

Deming J.W. (1998). Deep ocean environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 283-7.

De Philippis R. and Vincenzini M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, 151-175.

De Vuyst L., De Vin F., Vanielingem F. and Degeest B. (2001). Recent developments in biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic bacteria. *Int. Dairy. J.*, 11, 687-707.

Dubreucq G., Domon B. and Fournet B. (1996). Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr. Res.*, 290, 175-81.

Feller G., Narinx E., Arpigny J.L., Zekhnini Z., Swings J. and Gerday C. (1994). Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 477-479.

Filisetti-Cozzi T.M. and Carpita N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.*, 197, 157-62.

Fransen C.T., Haseley S., Huisman M. H., Schols H., Voragen A., Kamerling J., and Vliegthart. (2000). Studies of the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. *Carbohydr Res.* 328, 539-547.

- Giedrojć J., Klimiuk M., Radziwon P., Kloczko J., Bielawiec-M and Breddin-HK. (1999). Comparative study on the in vitro and in vivo activities of heparinoids derivative investigated on the animal model. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 34, 340-345.
- Guezennec J., Pignet P., Lijour Y., Gentric E., Ratiskol J. and Collic-Jouault S. (1998). Sulfation and depolymerization of a bacterial exopolysaccharide of hydrothermal origin. *Carbohydr. Polym.* 37, 19-24.
- Lijour Y., Gentric E., Deslandes E. Guezennec J. (1994). Estimation of the Sulfate Content of Hydrothermal Vent Bacterial Polysaccharides by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Anal. Biochem.* 220, (2), 244-248.
- Hakomori S. (1964). A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem. (Tokyo)*, 55, 205-208.
- Jaques L.B., Ballieux R.E., Dietrich C.P. and Kavanagh L.W. (1968). A microelectrophoresis method for heparin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 46, 351-60.
- Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F. and Clamp J.R. (1975). Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem. J.*, 151, 491-5.
- Kato C. and Nogi Y. (2001). Correlation between phylogenetic structure and function: examples from deep-sea *Shewanella*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35, 223-230.
- Khanal D.R., Okamoto Y., Miyatake K., Shinobu T., Shigemasa Y., Tokura S. and Minami S. (2001). Protective effects of phosphated chitin (P-chitin) in a mice model of acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Carbohydr. Polym.*, 99-106.
- Kim D., Yang B., Jeong S., Park J., Cho S., Das S., Yun J. and Song C. (2001). Production of a hypoglycaemic, extracellular polysaccharide from submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnol. Lett.*, 23, 513-517.
- Kovensky J., Duchaussoy P., Bono F., Salmivirta M., Sizun P., Herbert J.M., Petitou M. and Sinay P. (1999). A synthetic heparan sulfate pentasaccharide, exclusively containing L-iduronic acid, displays higher affinity for FGF-2 than its D-glucuronic acid-containing isomers. *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 1567-80.
- Kvernheim A.L. (1987). Methylation analysis of polysaccharides with butyllithium in dimethyl sulfoxide. *Acta. Chemica. Scandinavia.*, B41, 150-152.
- Leclerc H., Gaillard J.L. and Simonet M. (1995) Morphologie-Structure In : Microbiologie générale, la bactérie et la monde bactérien. Dion (Eds) pp 47-104.
- Lee M.K. and Lander A.D. (1991). Analysis of affinity and structural selectivity in the binding of proteins to glycosaminoglycans: Development of a sensitive electrophoretic approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2768-2772.

Leibovich S.J. and Danon D. (1980). Promotion of wound repair in mice by application of glucan. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 27, 1-11.

Lloyd L., Kennedy J., Methacanon P., Paterson M. and Knill C. (1998). Carbohydrate polymers as wound management aids. *Carbohydr. Polym.*, 37, 315-322.

Loaec M., Olier R. and Guezennec J. (1997). Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water. Res.*, 31, 1171-1179.

Loaec M., Olier R. and Guezennec J. (1998). Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr. Polym.*, 35, 65-70.

Lowry O.H., Rothenbourg N.J., Farr A.J. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* , 193, 265-275 .

Maruyama A., Taniguchi R., Tanaka H., Ishiwata H. and Higashihara T. (1997). Low-temperature adaptation of deep-sea bacteria isolated from the Japan Trench. *Marine Biology*, 128, 705-711.

Maugeri T., Gugliandolo C., Caccamo D., Panico A., Lama L., Gambacorta A. and Nicolaus B. (2002). A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.*, 24 , 515-519.

Meseguer G., Buri P., Plazonnet B., Rozier A. and Gurny R. (1996). Gamma scintigraphic comparison of eye drops containing pilocarpine in healthy volunteers. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 12, 481-8.

Misaki A., Kishida E., Kakuta M. and Tabata K. (1993), *In: Carbohydrates and carbohydrate polymers*. Ylpani, M. (Eds) ALT Press, Mt Prospect, IL, USA., pp. 116-129.

Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G. and Strecker G. (1986). Glycoproteins. *In: Carbohydrate analysis: a practical approach*. Chaplin M.F. and Kennedy J.K. (Eds), Oxford: IRL Press., pp. 143-204 .

Mopper K., Schultz C., Chevolut L., Germain C., Revuelta R. and Dawson R. (1992). Determination of Sugars in Unconcentrated Seawater and other Natural Waters by Liquid Chromatography and Pulsed Amperometric Detection. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 133-138.

Mulloy B., Gee C., Wheeler S.F., Wait R., Gray E. and Barrowcliffe T.W. (1997). Molecular weight measurements of low molecular weight heparins by gel permeation chromatography. *Thromb. Haemost.*, 77, 668-74.

Nardella A., Chaubet F., Boisson-Vidal C., Blondin C., Durand P. and Jozefonvicz J. (1996). Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.*, 289, 201-8.

Nicolaus B., Panico A., Manca M.C., Lama L., Gambacorta A., Maugeri T., Gugliandolo C. and Caccamo D. (2000). A thermophilic *Bacillus* isolated from an Eolian shallow hydrothermal vent, able to produce exopolysaccharides. *Syst. Appl. Microbiol.*, 23, 426-32.

- Nishino T. and Nagumo T. (1992). Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydr. Res.*, 229, 355-62.
- Ofosu F.A., Modi G.J., Hirsh J., Buchanan M.R. and Blajchman M.A. (1986). Mechanisms for inhibition of the generation of thrombin activity by sulfated polysaccharides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 485, 41-55.
- Parolis H., Parolis L.A., Boan I.F., Rodriguez-Valera F., Widmalm G., Manca M.C., Jansson P.E. and Sutherland I.W. (1996a). The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydr. Res.*, 295, 147-56.
- Parolis L.A., Duus J.O., Parolis H., Meldal M. and Bock K. (1996b). The extracellular polysaccharide of *Pichia* (*Hansenula*) *holstii* NRRL Y- 2448: the structure of the phosphomannan backbone. *Carbohydr. Res.*, 293, 101-17.
- Percival E. and McDowel R. (1967). Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. *Academic: New York*, 157-175.
- Petitou M., Jacquinet P.C., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J. and Sinaÿ P. (1983). *In Glycoconjugates, Proc. 7th Intl. Symp. on Glycoconjugates*, pp. 379-382.
- Petitou M., Duchaussoy P., Driguez P., Hérault J., Lormeau J. and Herbert J.. (1999). New synthetic heparin mimetics able to inhibit thrombin and factor Xa, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 9, 1155-1160.*
- Prieur D. (1997). *Microbiology of deep-sea hydrothermal vents. Tibtech.*, 15, 242-244.
- Raguénès G., Christen R., Guezennec J., Pignet P. and Barbier G. (1997a). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 989-95.
- Raguènes G., Pignet P., Gauthier G., Peres A., Christen R., Rougeaux H., Barbier G. and Guezennec J. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 67-73.
- Raguénès G., Peres A., Ruimy R., Pignet P., Christen R., Loaec M., Rougeaux H., Barbier G. and Guezennec J.G. (1997b). *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J. Appl. Microbiol.*, 82, 422-30.
- Riesenfeld J. and Roden L. (1990). Quantitative analysis of N-sulfated, N-acetylated, and unsubstituted glucosamine amino groups in heparin and related polysaccharides. *Anal. Biochem.*, 188, 383-9.
- Rimington C. (1931). The carbohydrate complex of serum protein II: Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of blood. *Biochem. J.*, 25, 1062-1071.
- Rougeaux H., Guezennec J., Carlson R.W., Kervarec N., Pichon R. and Talaga P.. (1999a). Structural determination of the exopolysaccharide of *Pseudoalteromonas* strain HYD 721 isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.*, 315, 273-285.

- Rougeaux H., Kervarec N., Pichon R. and Guezennec J.. (1999b). Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.*, 322, 40-45.
- Rougeaux H., Pichon R., Kervarec N., Raguenes G.H.C. and Guezennec J.G. (1996). Novel bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr. Polym.*, 31, 237-242.
- Rougeaux H., Talaga P., Carlson R.W. and Guezennec J. (1998). Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* originating from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.*, 312, 53-59.
- Samain E., Milas M., Bozzi L., Dubreucq G. and Rinaudo M. (1997). Simultaneous production of two different gel-forming exopolysaccharides by an *Alteromonas* strain originating from deep sea hydrothermal vents. *Carbohydr. Polym.*, 34, 235-241.
- Schwarzmann S. and Boring J.R. (1971). Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 3(6), 762-767.
- Shaklee P.N. and Conrad H.E. (1984). Hydrazinolysis of heparin and other glycosaminoglycans. *Biochem. J.*, 217, 187-97.
- Smith H.J., Huff B., Powers W. and Caine D. (1967). The reduction-methylation of cyclohexanone derivatives. *J. Org. Chem.*, 32, 2851.
- Sutherland I.W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.*, 8, 143-213.
- Sutherland I.W. (1990). *In* : Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge studies in biotechnology Cambridge University Press.
- Sutherland I.W. (1982). Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.*, 23, 79-150.
- Sutherland I.W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides, *Biotechnology Advances*, 12, 393-448.
- Sutherland I.W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends. Biotechnol.*, 16, 41-6.
- Talmont F., Vincent P., Fontaine T., Guezennec J., Prieur D. and Fournet B. (1991). Structural investigation of an acidic exopolysaccharide from deep-sea hydrothermal vent marine bacteria. *Food Hydrocolloids*, 5, 171-172.
- Tollefsen D.M., Majerus D.W. and Blank M.K. (1982). Heparin cofactor II: purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Biol. Chem.* 257, 2162-2169.

- van Casteren W.H.M., Dijkema C., Schols H.A., Beldman G. and Voragen A.G.J. (1998). Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbohydr. Polym.*, 37, 123-130.
- Vandamme E.J. (1994). The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals. *J. Biotechnol.*, 37, 89-108.
- Vincent P., Pignet P., Talmont F., Bozzi L., Fournet B. and Guezennec J. (1994). Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microb.*, 60, 4134-4141.
- Volpi N. (1994). Dermatan sulfate from beef mucosa: structure, physicochemical and biological properties of fractions prepared by chemical depolymerization and anion-exchange chromatography. *Carbohydr. Res.*, 255, 133-44.
- Waeghe T.J., Darvill A.G., McNeil M. and Albersheim P. (1983). Determination, by methylation analysis, of the glycosyl-linkage composition of microgram quantities of complex carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 123, 281-304.
- Whistler R. and BeMiller J. (1993) Industrial gums Polysaccharides and their derivatives (3rd edn) Whistler, R. and BeMiller, J. (Eds), Academic Press, pp. 427-459,
- Whitfield C. and Valvano M. A. (1993). Structure and attachment of cell-surface polysaccharides In : Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Phys.*, 35, 138-149.
- Weiner R.M. (1997). Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol.*, 15, 390-4.
- York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T. and Albersheim P. (1985). Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall component. *Methods. Enzymol.*, 118, 3-40.
- Zanchetta P. and Guezennec J. (2001). Surface thermodynamics of osteoblasts: relation between hydrophobicity and bone active biomaterials. *Colloids and surface B*, 22, 301-307.
- Zou W., Laferriere C.A. and Jennings H.J. (1998). Oligosaccharide fragments of the type III group B streptococcal polysaccharide derived from *S. pneumoniae* type 14 capsular polysaccharide by a chemoenzymatic method. *Carbohydr. Res.*, 309, 297-301.