



Chapitre 01: Rappel sur les polysaccharides

Résumé:

Outre l'étude des complexes formés par les glucides ou les lipides, ce module consacre une partie importante aux polysaccharides: galactomannanes, hémicelluloses, exopolysaccharides microbiens.

On sait que les propriétés de ces macromolécules sont directement liées à leurs structures. C'est en cela que nous avons entrepris d'étudier d'abord la détermination de la structure primaire et le comportement en solution des polysaccharides.

Chapitre 1 : Rappel sur les polysaccharides

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

- A - Les polysaccharides, exclusivement constitués d'oses
- B - Les glycoprotéines et peptidoglycanes.
- C - Les glycolipides et lipopolysaccharides.
- D - Les acides téichoïques.
- E - Les acides nucléiques.

1 - Les polysaccharides (A) :

Les polysaccharides sont des polymères contenant périodiquement des unités de répétition oligosaccharidiques liées entre elles par des liaisons de types O-glycosidiques.

11 - Méthodes de détermination de la structure primaire des polysaccharides.

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

111 - Analyse qualitative et quantitative.

111.1 - Composition en oses.

L'analyse globale du polysaccharide met en jeu des méthodes d'hydrolyse totale. Cette hydrolyse peut être réalisée à l'aide de différents acides minéraux ou organiques : acide sulfurique, chlorhydrique, trifluoroacétique, formique ou par méthanolyse. Les techniques, suivies en général de chromatographie en phase gazeuse (CPG) après transformation des oses en dérivés volatils (acétates d'alдитols), permettent de déterminer la nature et la quantité de chaque monosaccharide neutre constitutif de l'unité répétitive.

De plus, des colonnes de chromatographie échangeuse d'anions haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC - PAD) ont été récemment développées pour la séparation et l'analyse quantitative des monosaccharides neutres et acides.

111.2 - Analyse des substituants.

De nombreux résidus non glucidiques peuvent se greffer sur les polysaccharides. L'identification et l'analyse chimique de ces substituants sont dépendantes de leur libération totale. Ainsi l'acide pyruvique est facilement libéré par hydrolyse acide et peut être spécifiquement identifié par l'utilisation de la pyruvate - lactate déshydrogénase. Les groupements O-acyles (généralement O-acétyles) sont labiles en milieu basique, le résidu acide libéré étant dosé par titrimétrie ou CPG.

Les groupements O-sulfates et O-phosphates sont aussi analysés après libération par hydrolyse acide. Beaucoup de ces composés ainsi libérés sont maintenant identifiés et dosés par chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC).

Citons enfin les méthodes spectroscopiques (résonance magnétique nucléaire (RMN), infra-rouge (IR) qui sont couramment employées, permettant d'identifier et de doser ces substituants sur le polysaccharide natif (voir cours de biochimie appliquée, Mater 1).

112 - Analyse structurale.

1121 - La méthylation.

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

- Soude et diméthylsulfate pour la méthode de Harworth.
- Iodure de méthyle et oxyde d'argent selon Pundie et Irvine.
- Diméthylformamide (DMF) et diméthylsulfoxyde (DMSO), oxyde d'argent et iodure de méthyle pour Kuhn et Wallenfels.
- Sodium méthyl sulfinyl carbanion et iodure de méthyle pour Hakomori.

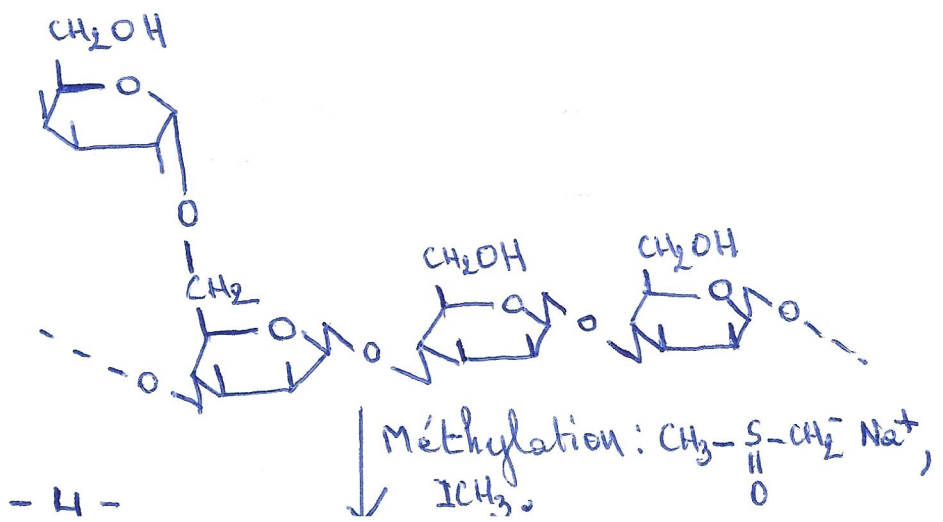
- Potassium méthylsulfinylcarbanion et ICH_3 (Dawill).
- Lithium méthylsulfinylcarbanion et ICH_3 (Paz Parente).

Le procédé d'Hakomori et ceux au méthylsulfinylcarbanion sont les plus utilisés pour les polysaccharides car ils fournissent, en un seul cycle de réaction, une alkylation quantitative du polymère. Ceci est très important en particulier lorsqu'un polysaccharide renferme dans sa structure des acides uroniques. En effet ces acides subissent une estérification de leurs fonctions carboxyles. Les esters étant très sensibles à des réactions de β -élimination, il faut donc achever l'alkylation en une seule étape si l'on veut éviter la dégradation des acides uroniques en milieu basique.

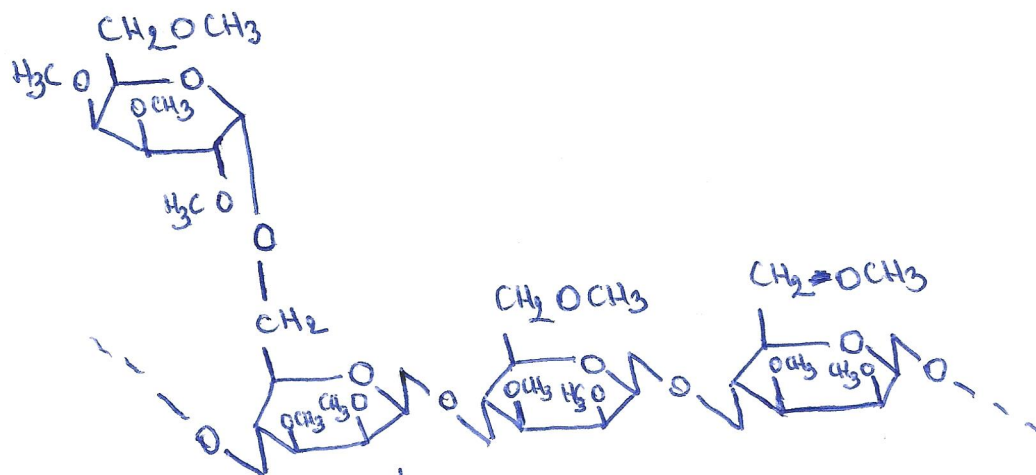
Il est à noter que les substituants O-acyles sont libérés durant la méthylation alors que les liaisons acétaliques des résidus pyraniques restent stables.

1121.1 - Exemple de méthylation :

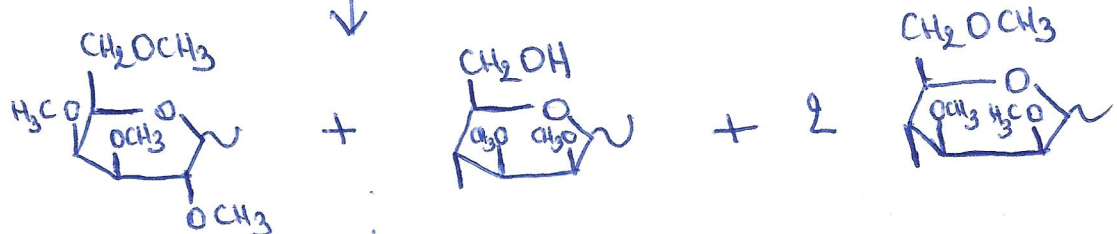
Nous traitons à titre d'exemple, la méthylation par la méthode d'Hakomori du galactomannane produit par *Gleditsia triacanthos* :



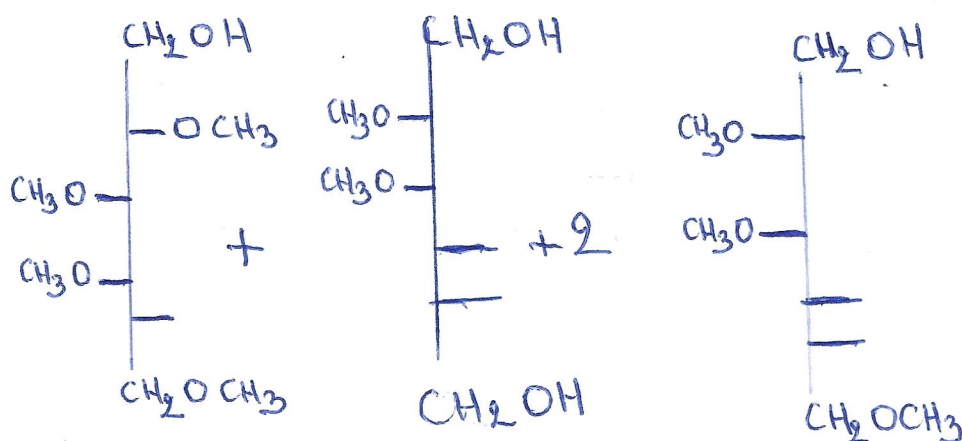
Cette méthylation est suivie par l'enregistrement du spectre infrarouge du polysaccharide perméthylé (voir plus loin)

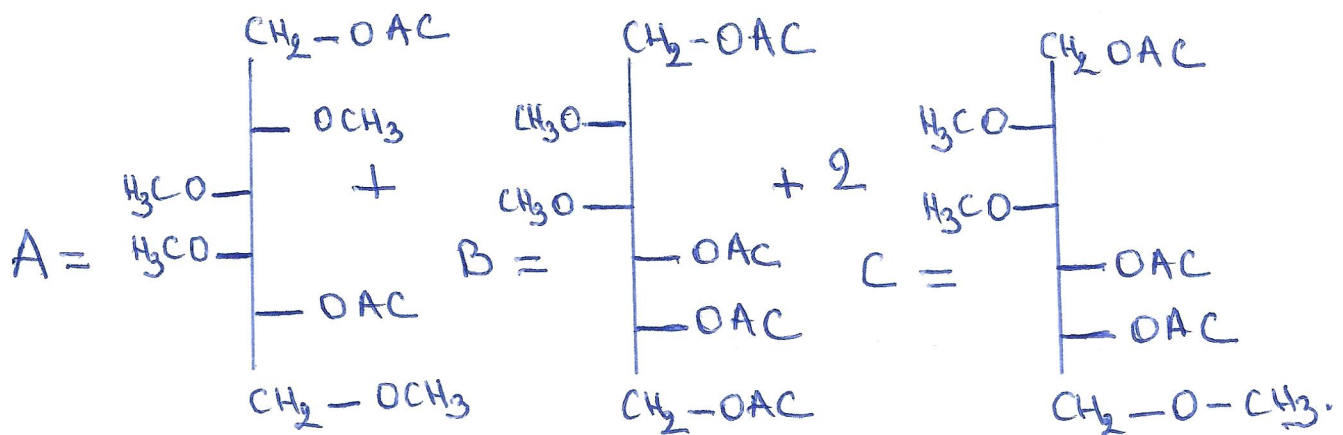
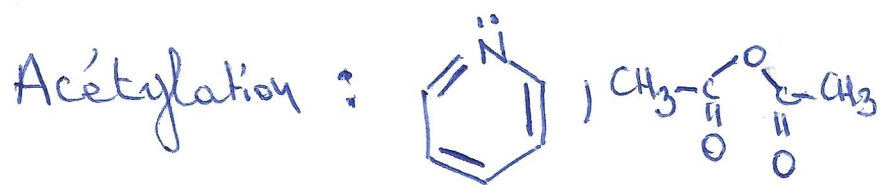


H^+ , H_2O : Hydrolyse acide totale.



Réduction : $NaBH_4$





$A =$ Le 1,5 di-O-acétyl
2,3,4,6 tétra-O-méthyl
hexitol.

$B =$ Le 1,4, 5,6 tétra-O-acétyl
2,3 di-O-méthyl - hexitol.

$C =$ Le 1,4,5 tri -O-acétyl
2,3,6 tri-O-méthyl - hexitol.



La figure 1 illustre le spectre infra-rouge du galactomannane natif de *Cleditsia triacanthos*. Une perméthylation normale du polysaccharide suppose l'élimination de la bande à $3397,05 \text{ cm}^{-1}$. Cette bande est due à une vibration de valence ou d'élongation ("stretching vibration") des hydroxyles libres du polymère.

L'hydrolyse totale du polysaccharide perméthylé libère les monomères dont seules les positions qui étaient impliquées dans les liaisons glycosidiques ne sont pas éthérisées (méthylées). Les oses partiellement méthylés peuvent être analysés par couplage CPG - spectrométrie de masse sous forme acétate d'alditol. En effet, ces dérivés donnent une fragmentation claire des molécules permettant un positionnement aisé des groupements méthyles et acétyles.

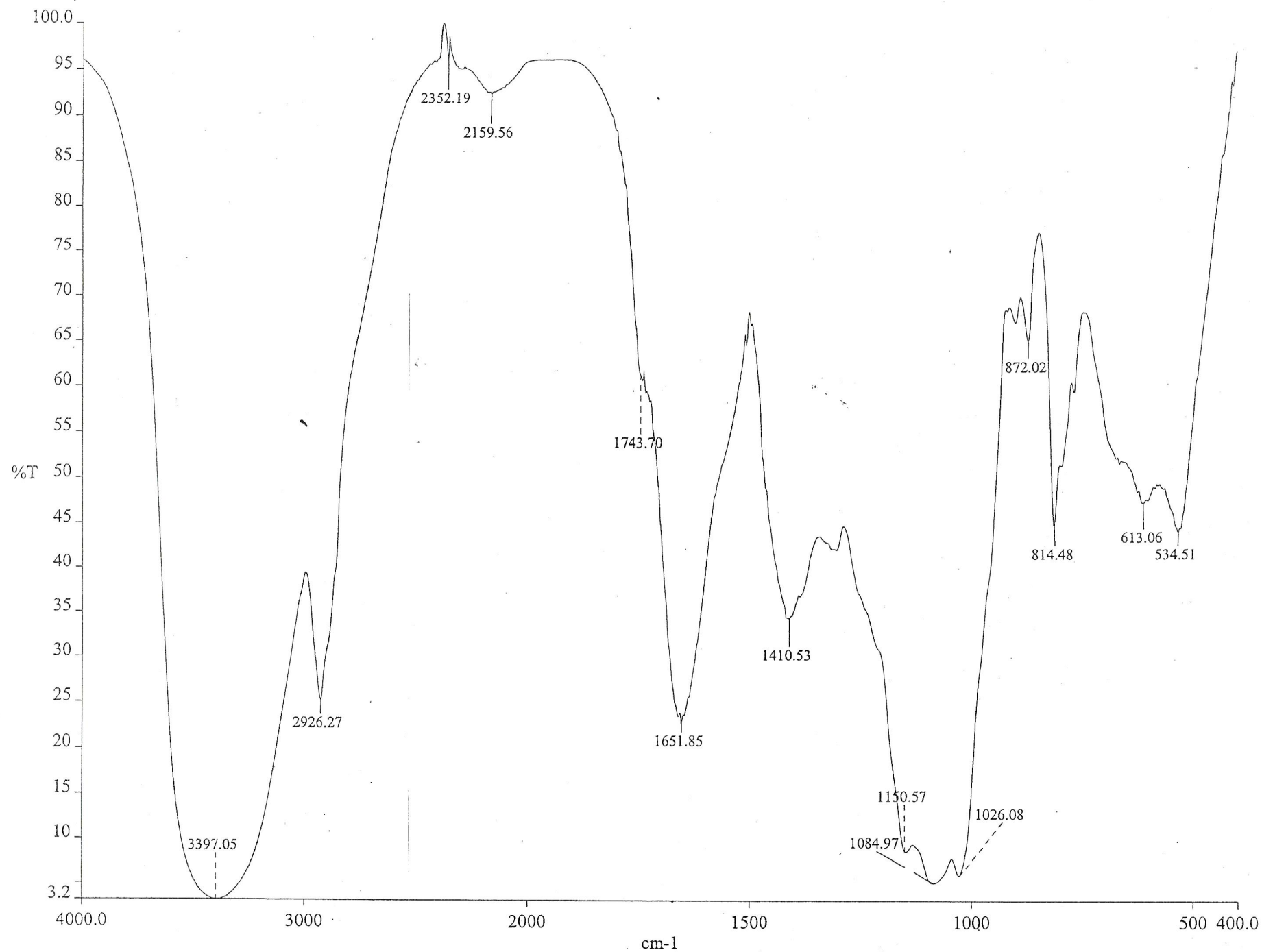
La figure 2 rapporte le chromatogramme en phase gazeuse des éthers méthyliques méthyl-glycosylés et acétylés du galactomannane de *Cratichneum*. Les temps de rétention et les rapports molaires des composés ABC sont les suivants :

A = Le 1,5 di-O-acétyl 2,3,4,6-O-méthyl-hexitol ; temps de rétention = 8,146 min ,
nombre de moles ≈ 1 mole : (0,01253).

B = Le 1,4,5,6 tétra-O-acétyl 2,3 di-O-méthyl-hexitol , temps de rétention = 16,130 min ,
nombre de moles ≈ 1 mole : (0,01444).

C = Le 1,4,5 tri-O-acétyl 2,3,6 tri-O-méthyl-hexitol , temps de rétention = 11,508 min ,
nombre de moles ≈ 2 moles : (0,02349).

Ce résultat montre que ce polysaccharide est constitué d'une chaîne principale de D-mannopyranosyl



c:\pel_data\spectra\wsp1_av_pur.003

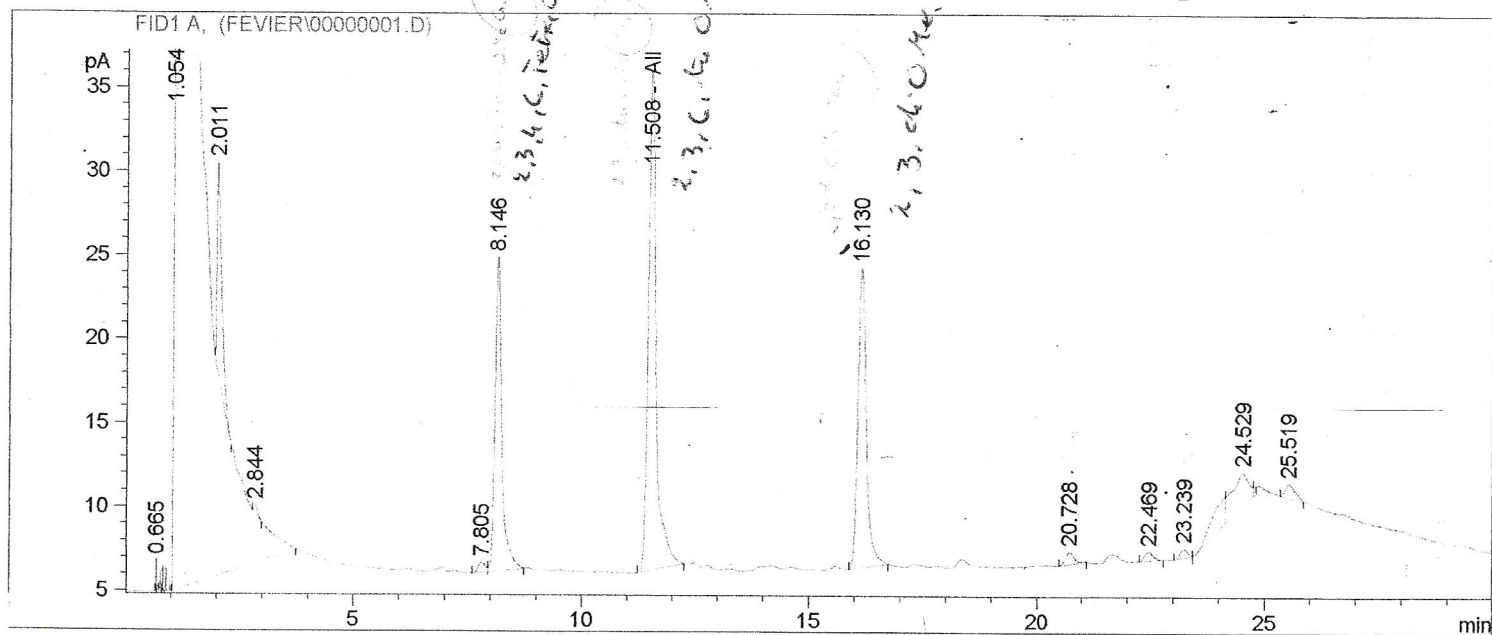
Fig. 1 - Spectre infrarouge du galactomannane (*G. triacanthos*)

produit méthylé

*Fig. 2 - Chromatogramme en phase gazeuse des éthers
méthylliques du galactomannane de G. triacanthus*

Injection Date : 2/9/10 2:45:19 PM
Sample Name : galmandilué WSPS, méf. diluée
Acq. Operator : GC Location : -
Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\OSEOLOAC.M
Last changed : 2/9/10 1:34:59 PM by GC
(modified after loading)

oses alditols acetates



Area Percent Report

Sorted By : Retention Time
Calib. Data Modified : 2/3/10 5:11:19 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Area %	Name
1	5.300	1		0.00000	0.00000	Rha
2	5.650	1		0.00000	0.00000	Fuc
3	7.619	1		0.00000	0.00000	Ara
4	9.668	1		0.00000	0.00000	Xyl
5	11.508	1	PB	364.47629	0.02349	All
6	12.469	1		0.00000	0.00000	Man
7	13.357	1		0.00000	0.00000	Gal
8	14.515	1		0.00000	0.00000	Glc
9	15.850	1	I	0.00000	0.00000	Ino

Totals : 364.47629

Uncalibrated Peaks:

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Area %	Name
1	0.665	1	BV	1.20718	7.782e-5	?
2	0.758	1	VB	1.02404	6.601e-5	?
3	0.812	1	BB	1.02480	6.606e-5	?
4	1.054	1	VB S	1.55032e6	99.93567	?
5	2.011	1	BB X	79.76349	0.00514	?
6	2.844	1	BB X	2.45807	0.00016	?
7	7.805	1	PV	6.40453	0.00041	?
8	8.146	1	VB	194.44994	0.01253	?
9	16.130	1	BB	223.94383	0.01444	?
10	20.728	1	PB	8.90197	0.00057	?
11	22.469	1	BB	6.94484	0.00045	?
12	23.239	1	PP	5.67892	0.00037	?
13	24.139	1	VV	33.12383	0.00214	?
14	24.529	1	VV	53.29510	0.00344	?
15	24.783	1	VV	1.70604	0.00011	?
16	25.519	1	PV	13.49779	0.00087	?

Uncalib. totals : 1.55095e6

Results obtained with enhanced integrator!

1 Warnings or Errors :

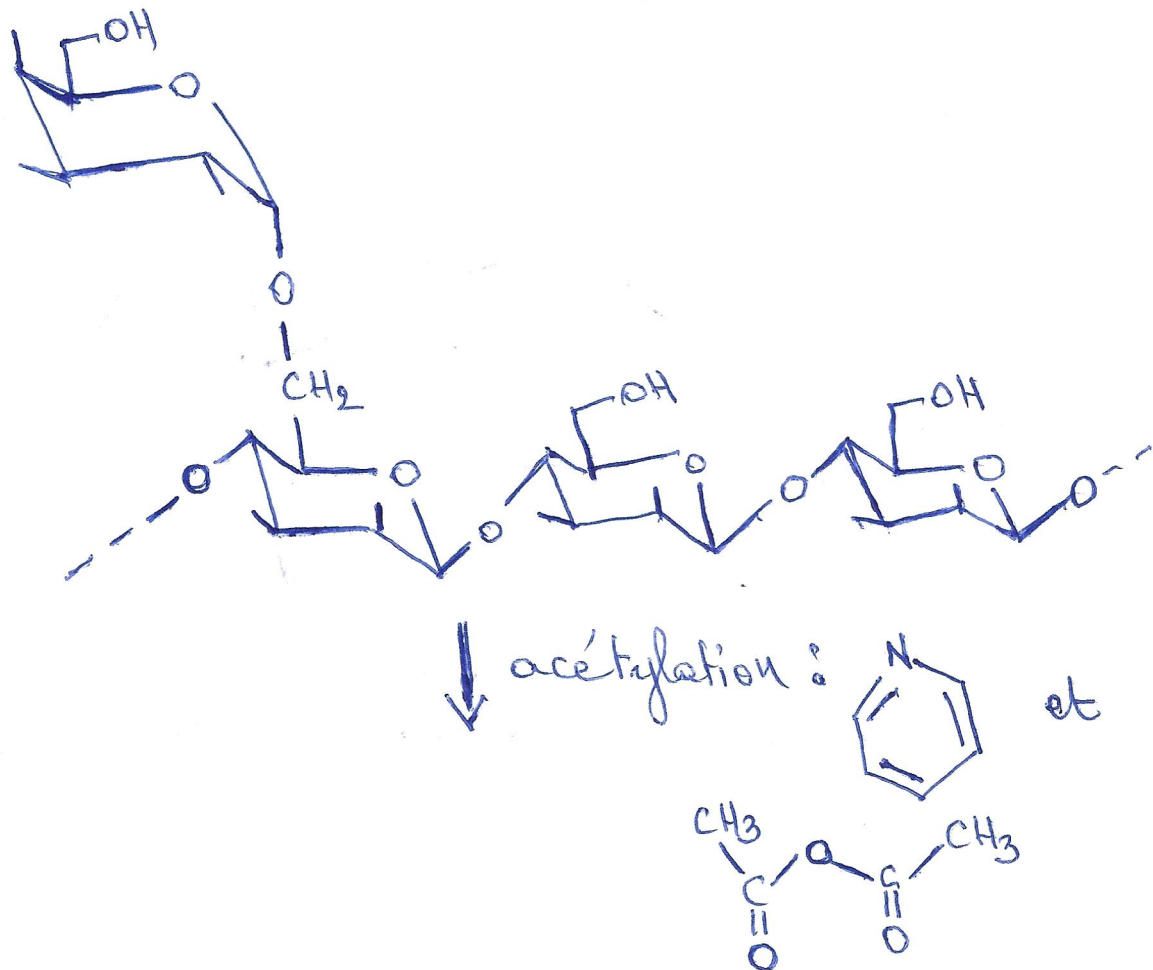
Warning : ISTD compound(s) not found

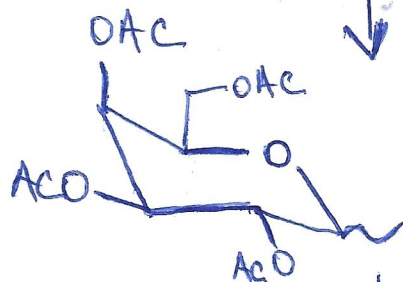
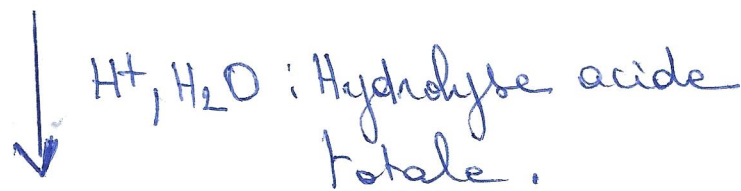
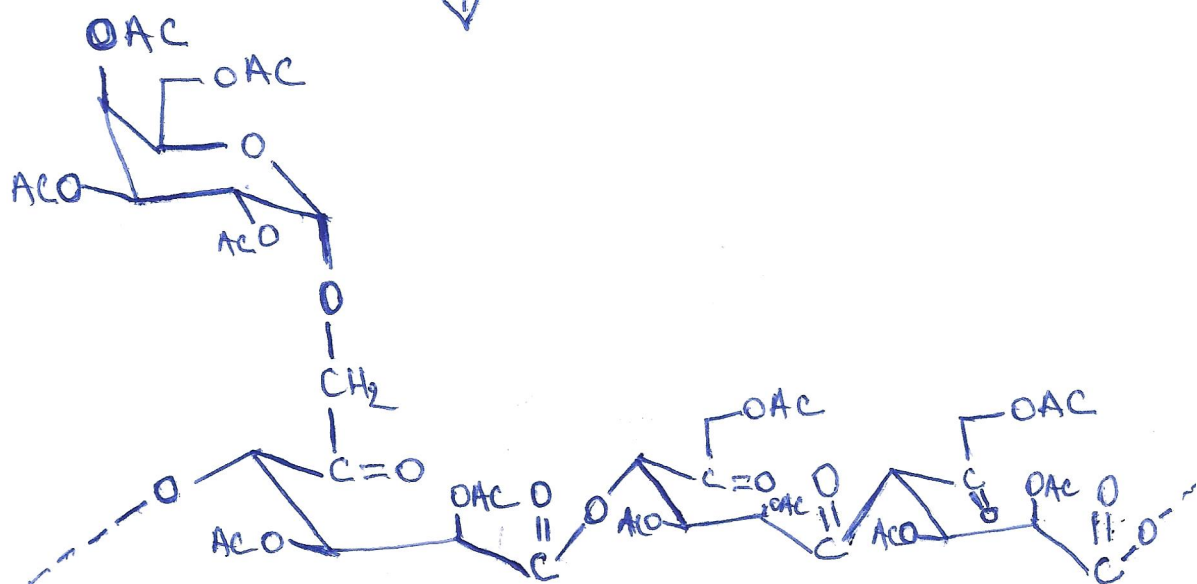
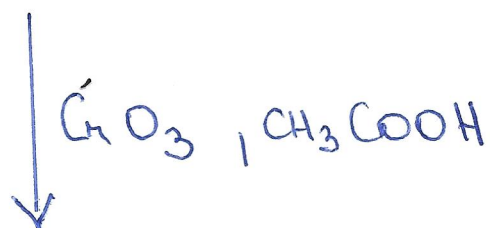
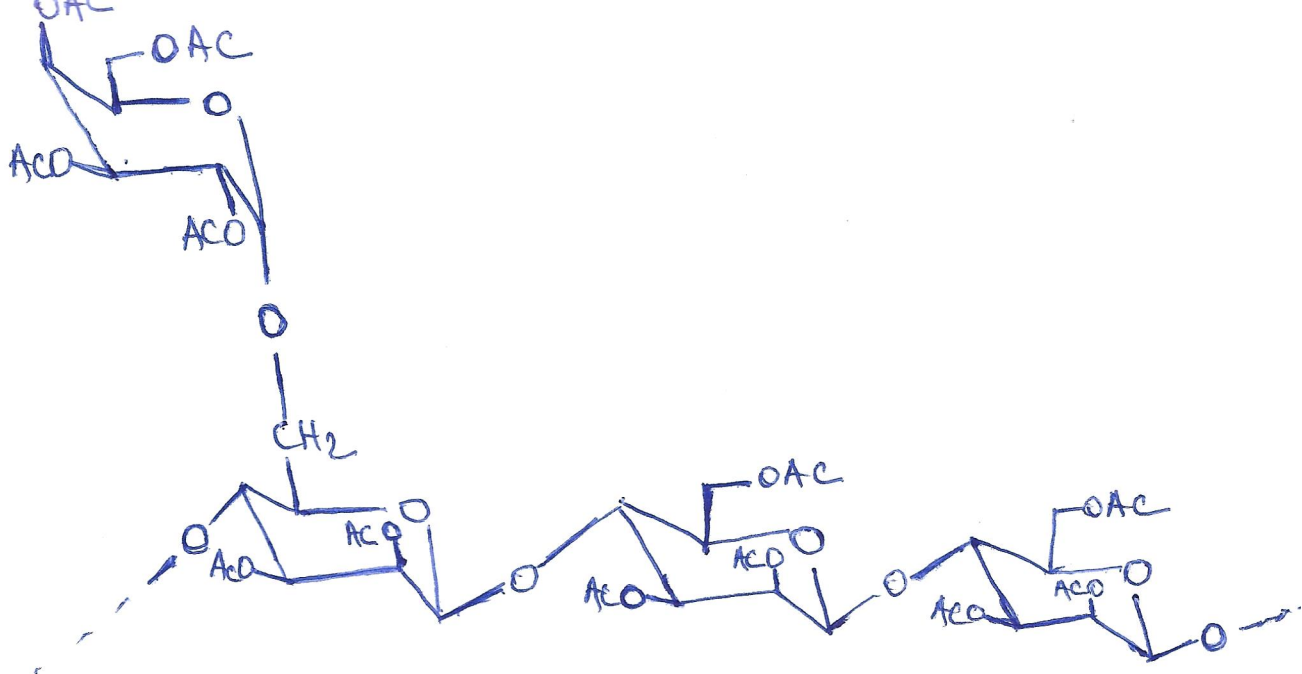
*** End of Report ***

dont les monomères sont liés (1→4) et branchée toutes les trois unités par un seul résidu D-galactopyranosyl lié (1→6).

11.22 - Oxydation chromique : détermination de l'anométrie des liaisons.

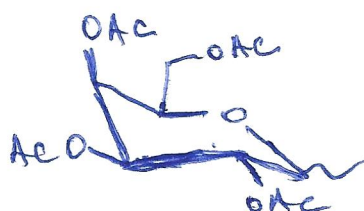
Le trioxyde de chrome (CrO_3) en présence d'acide acétique dilué, avec une grande stéréosélectivité, les glycopyranosides acétylés orientés de façon équatoriale (β) alors que les glycosides acétylés orientés axialement (α) ne réagissent pas. Cette réaction est donc utilisée pour la détermination des anoméries de liaison. Une application de ce procédé au galactomannane de *Cladonia triacanthos* est présentée ci-dessous :





+ produits de dégradation.

analyse par CPG



! Le 2,3,4,6 tétra-O-acétyl Galactose.

A partir de ce résultat, on peut en conclure que le galactomannane, de *Cladobotrya triacanthos*, est constitué d'une chaîne linéaire de D-mannopyranose $(1 \rightarrow 4)\beta$ sur laquelle est fixée toutes les trois unités, un D-galactopyranose $(1 \rightarrow 6)\alpha$.