

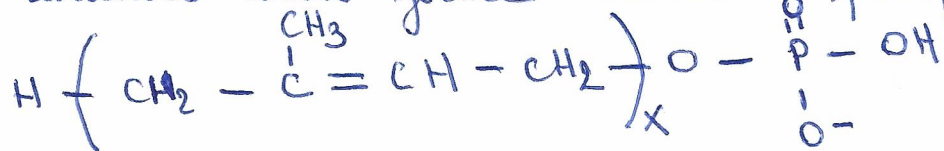
Les polysaccharides microbiens.

La production d'exopolysaccharides est possible chez de nombreux champignons et bactéries ainsi que certaines algues. La variété des structures polysaccharidiques a permis un élargissement de la gamme des applications industrielles des biopolymères. Les EPS microbiens à usage industriel sont produits, de façon générale, par fermentation en aérobie par le système discontinu ("batch culture"). Ces microorganismes sont capables de libérer dans le milieu de culture des polysaccharides considérés alors comme exocellulaires : cette sécrétion s'accompagne généralement d'une augmentation de viscosité du milieu.

L'exemple du xanthane, dextrane, schizophyllane, illustre cette possibilité de valorisation de biopolymères originaux.

On retrouve plusieurs caractères fondamentaux de la biosynthèse des exopolysaccharides chez tous les microorganismes. La pénétration du substrat est l'un des premiers facteurs limitant la production des polysaccharides. Le substrat est généralement phosphorylé, soit par un mécanisme de translocation de groupe, soit par une hexokinase qui utilise un nucléotide-5-phosphate. Cette biosynthèse nécessite la participation d'un transporteur lipidique qui véhiculerait une ou plusieurs unités de répétition disaccharidique vers le lieu de production des exopolysaccharides. Il est tout à fait établi que chez les bactéries

ces transporteurs lipidiques sont essentiellement constitués par un squelette d'alcools isopréniques tels que les dolichols sous forme libres ou phosphatés :



La valeur de x peut varier de 11 à 22 entre les systèmes bactériens et les mammifères.

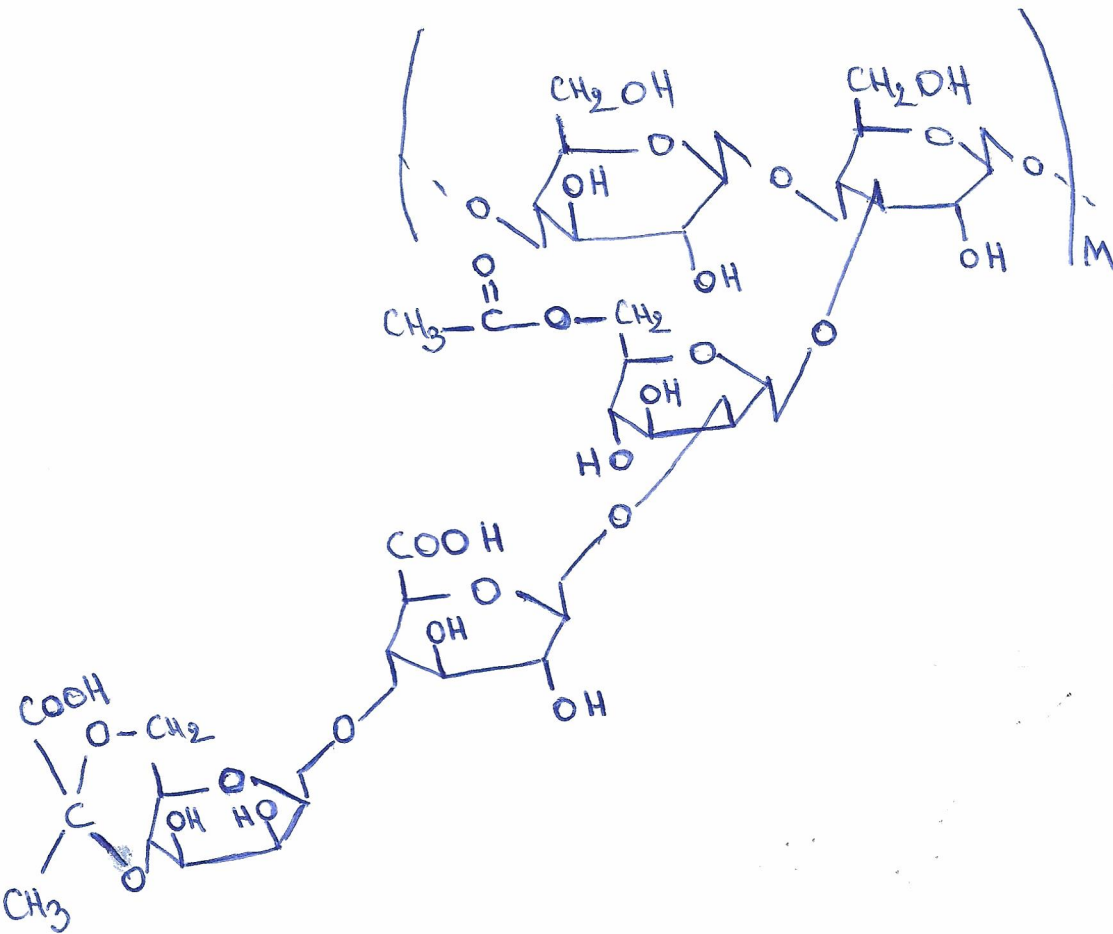
Les mécanismes exacts qui interviennent dans l'élongation de la chaîne et dans la libération des exopolysaccharides sont très peu connus.

Certains aspects de la biosynthèse de polysaccharides sont beaucoup influencés par les conditions physiologiques. La composition et la structure, et par suite les propriétés physiques de l'exopolysaccharide peuvent être modifiées par altération des conditions physiologiques.

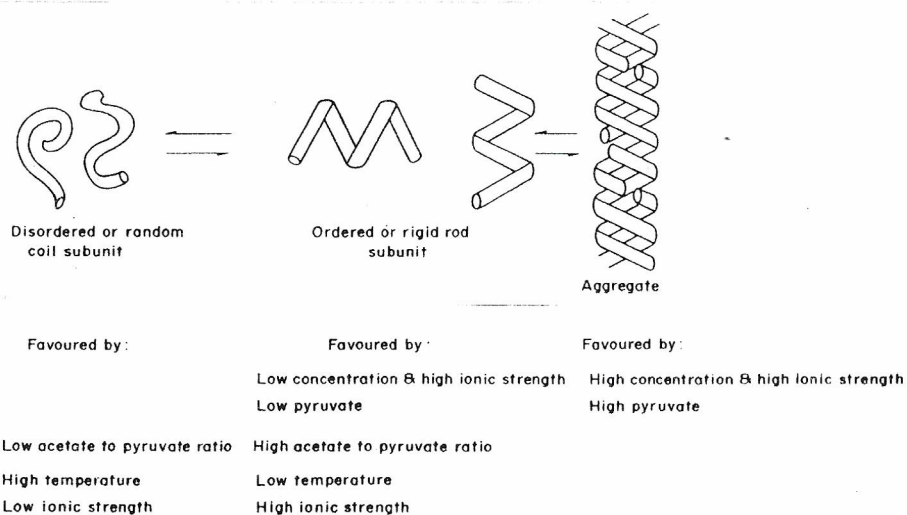
1- Le xanthane

Le xanthane est un polysaccharide extracellulaire produit par la bactérie *Xanthomonas campestris*. Il est commercialisé sous le nom de gomme xanthane. L'unité répétitive est un

pentasaccharide constitué de D-glucose, D-mannose, acide D-glucuronique, groupement pyruvyl, groupement O-acétyl. Sa structure est la suivante :



Le poids moléculaire est généralement compris entre $2 \cdot 10^6$ et $15 \cdot 10^6$ daltons. Le xanthane est le premier polysaccharide bactérien commercialisé en tant qu'épaississant présentant des propriétés rhéologiques originales. Il adopte en milieu aqueux, deux types de conformation selon la température et la force ionique: une conformation en pelote à température élevée ou si la teneur en sel est plus faible et une conformation hélicoïdale à faible température ou en présence de sel :

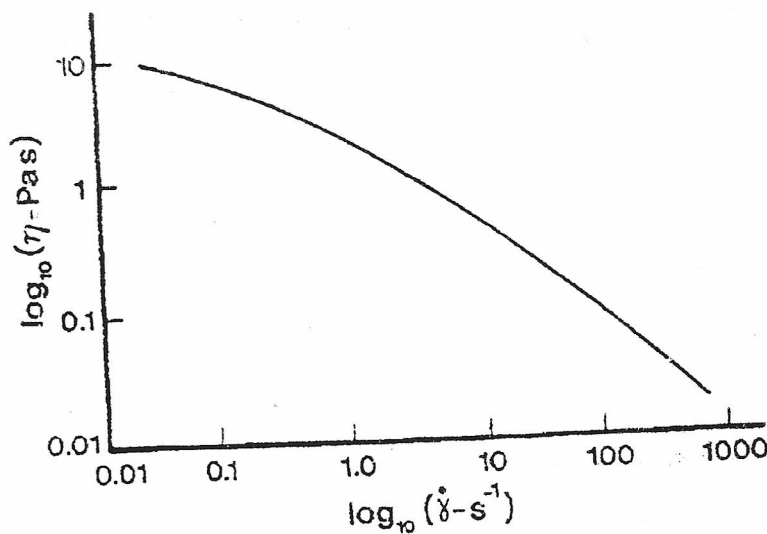


- Formes conformationnelles du xanthane en solutions.

Dans la pratique, la conformation ordonnée est le plus souvent observée, ce qui confère à la gomme xanthane une structure nettement plus rigide que celle des galactomannanes. Cette grande rigidité de la molécule de xanthane en comparaison des autres polysides à conformation en pelote lui confère des propriétés rhéologiques particulières.

11 - Propriétés d'écoulement.

La figure ci-dessous illustre le comportement d'une solution de gomme xanthane (concentration 0,5%) :



On note une forte dépendance de la viscosité apparente avec la vitesse de cisaillement. Le comportement rhéofluidifiant de cette solution est nettement plus marqué que celui des polysides qui sont plus flexibles et adoptent une conformation en pelote. L'infléchissement de la courbe à faible vitesse de cisaillement, pour atteindre η_0 , n'est observé qu'à des vitesses de cisaillement très faibles qui n'ont pu être atteintes.

On constate donc que les solutions de gomme xanthane présentent des viscosités très élevées à faible vitesse de cisaillement et très faibles à vitesse élevée. Ces propriétés particulières seront d'un grand intérêt pratique, notamment lorsqu'une viscosité élevée est recherchée en l'absence de cisaillement alors que le produit liquide doit pouvoir s'écouler aisément dès l'application d'un cisaillement même faible. La gomme xanthane sera ainsi très utilisée pour la stabilisation de suspensions versables.

12 - Le comportement viscoélastique.

Il existe une très grande différence de mobilité chez les macromolécules, par exemple, les galactomannanes sont relativement flexibles du fait de leur conformation en pelote alors que la gomme xanthane est extrêmement rigide du fait de sa conformation hélicoïdale. Ce phénomène peut être étudié à l'aide d'un rhéomètre qui permet de suivre les variations des paramètres G' et G'' en fonction de la fréquence pour les deux macromolécules.

La différence essentielle réside dans la détermination du temps caractéristique t_c pour chaque macromolécule. (Voir surtout; Doublier J.-L., Cuvelier G., 1996. Gums and Hydrocolloids: Functional aspects, in Eliasson A.C. ed., Carbohydrates in Food, Marcel Dekker, Inc., New York, 283-318).

13 - Formation de gel

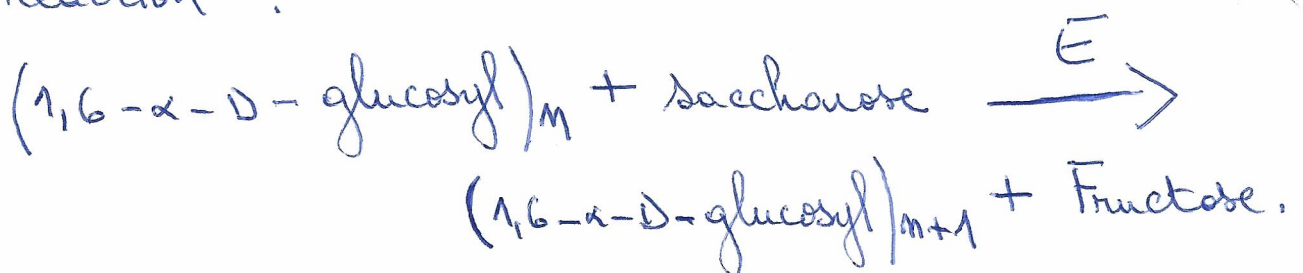
Une variété de mélanges xanthane/galactomannane sont utilisés pour modifier la texture des aliments.

Le xanthane forme des gels thermoréversibles lorsqu'il est mélangé avec le galactomannane de la caroube (*Ceratonia siliqua*; Mannose : Galactose - 3,5) ou celui de la gomme tara (*Caesalpinia spinosa*; Mannose : Galactose - 2,7 - 3,0). La fermeté du gel dépend des rapports xanthane/galactomannane. Ces gels sont intéressants parce que sous ces conditions, le xanthane seul ne peut pas former de gel et c'est aussi le cas de ces deux galactomannanes.

Il faut noter que la gomme guar (*Cyamopsis tetragonolobus*; Mannose : Galactose - 1,55) ne peut pas former de gel lorsqu'elle est associée au xanthane.

2 - Le dextrane .

La plupart des EPS microbiens sont les produits du catabolisme intracellulaire de conversion du substrat en intermédiaires puis en polymère. Les dextranes n'obéissent pas à ce processus. Le substrat ne pénètre pas dans la cellule microbienne et il est converti à l'extérieur en α -D-glucane branché : le dextrane. Seul le saccharose est utilisé comme substrat pour cette réaction :

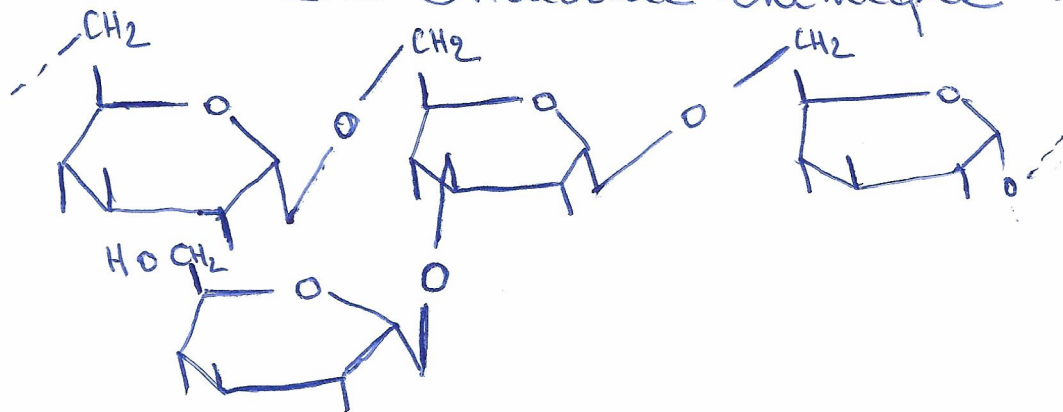


E = Dextran-saccharose (α -1,6-glucan ;
 D-fructose 2-glucosyl transférase, EC 2.4.1.5).
 En présence de maltose (α -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)
 D-glucopyranose), l'enzyme catalyse le transfert
 d'un résidu glucose provenant du saccharose sur
 le disaccharide accepteur (maltose) au détriment
 de la synthèse du polymère. Les produits de la
 réaction sont des oligodextranes possédant un résidu
 maltose à l'extrémité ^{réductrice} ↓, qui constituent eux-
 mêmes de bons accepteurs des réactions de gluco-
 sylation par la dextrane-saccharase.

Le procédé de synthèse par étapes de dextranes
 de masse molaire contrôlée consiste à mettre en
 œuvre des réactions successives d'accepteur avec
 les oligodextranes produits au cours de l'étape
 précédente.

Les dextranes peuvent être synthétisés par de nom-
 breuses espèces bactériennes, par exemple : *Leuconostoc*
mésenteroïdes, *Leuconostoc dextranicum*, *Streptobac-*
terium dextranicum, *Streptococcus mutans* et
 autres.

21- Structure chimique :



Chaque lignée bactérienne synthétise un dextrane unique mais le point commun à toutes ces macromolécules est la prépondérance de liaisons $\alpha(1 \rightarrow 6)$. Quelques-uns sont constitués exclusivement de ce type de liaison alors que d'autres peuvent contenir des liaisons $\alpha(1 \rightarrow 2)$ ou $\alpha(1 \rightarrow 3)$ ou $\alpha(1 \rightarrow 4)$.

22 - Utilisations du dextrane .

Les dextrans sont employés dans les industries chimiques et pharmaceutiques .

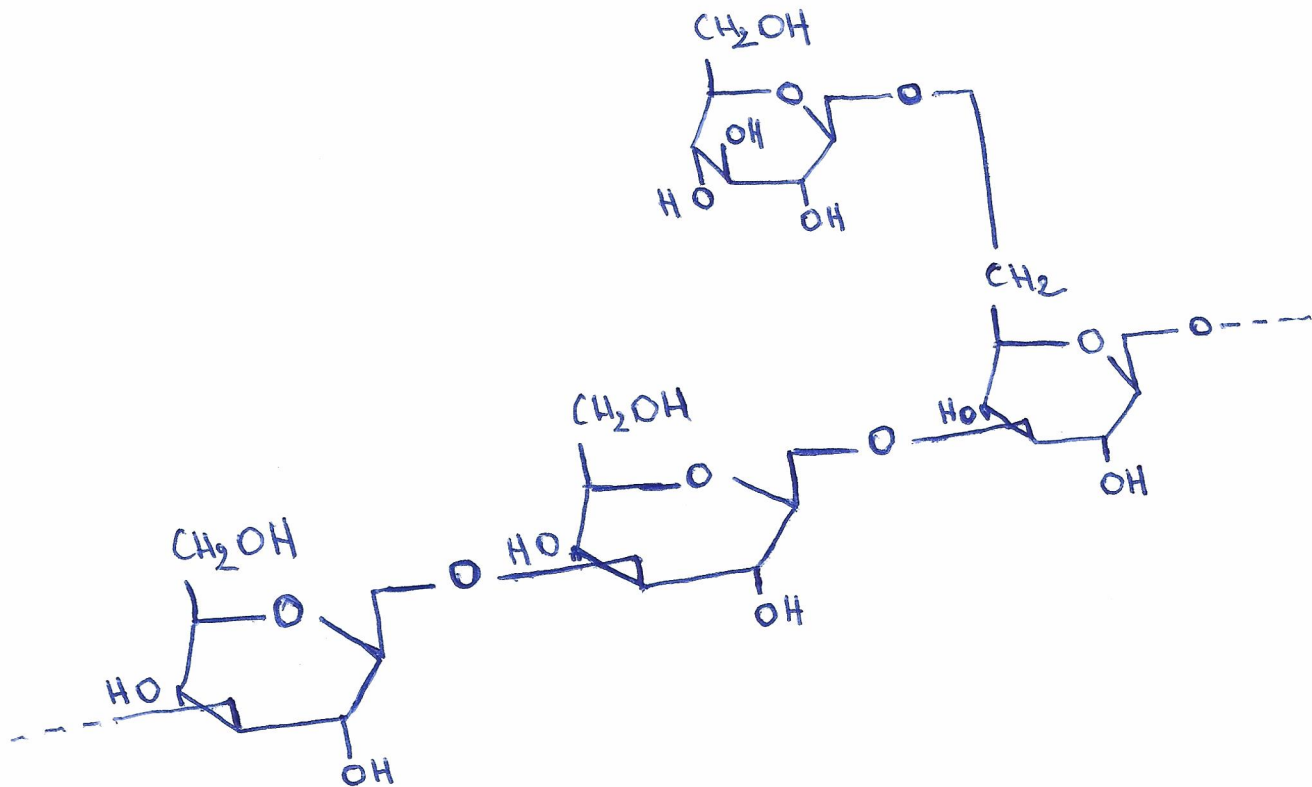
- En maintenant une surface hydrophile sur les plaies , ils assurent l'absorption des liquides exsudés .
- La préparation de dérivés tels que : les dextrans sulfatés possédant des activités anticoagulantes , antiulcérales . Les complexes avec des métaux variés (fer , calcium) pour des utilisations médicales (contre l'anémie , l'hypocalcémie) .

3 - Le schizophyllane

Le schizophyllane est un β -D-glucane sécrété par un champignon filamenteux , Schizophyllum commune (Basidiomycète) , en culture submergée .

31- Structure chimique.

La structure primaire de l'unité répétitive consiste en une chaîne linéaire de β -D-glucopyranose $(1 \rightarrow 3)\beta$, sur laquelle est fixé toutes les trois unités, un D-glucopyranose $(1 \rightarrow 6)\beta$:



Le schizophyllane a été parmi les β -D-glucanes les mieux étudiés pour son activité immunostimulante. Le schizophyllane montre une forte activité lorsqu'il est injecté par voie i.p. ou i.v. mais une faible activité par voie s.c.

Le schizophyllane inhibe presque totalement le sarcome-180, le sarcome-37 (87% d'inhibition à la dose de 1,25 - 5 mg/Kg, et le sarcome Yoshida chez les rats (74% d'inhibition à la dose

de $0,7 \text{ mg/Kg}$.

Les résultats de viscosité intrinsèque en solution aqueuse et de la chromatographie (filtration sur gel) indiquent que le poids moléculaire (M_w) est de $1,3 \cdot 10^5 \text{ g/mole}$.

Les tests d'activités antitumorales en solution aqueuse suggèrent que ce biopolymère adopte une conformation en triple hélice.

Les polysaccharides capsulaires.

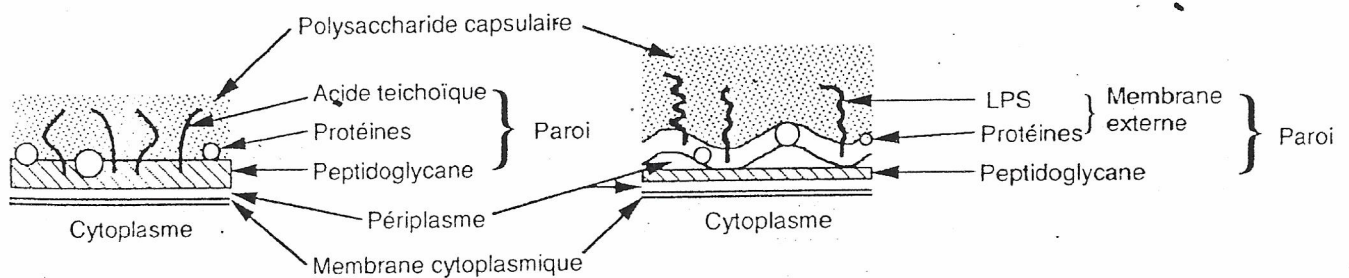
Les bactéries ont été classifiées en deux groupes majeurs : Gram négatif (Gram -) et Gram positif (Gram +) selon que leur paroi cellulaire retenait ou non un colorant. Ces organismes synthétisent des polymères hautement spécifiques qui forment une classe au sein de laquelle les variations structurales sont illimitées.

Les lipopolysaccharides (LPS) sont spécifiques de la paroi des bactéries Gram -.

Tandis que les acides teichoïques le sont de la membrane plasmique et de la paroi des bactéries Gram +.

- Les peptidoglycannes
- Les polysaccharides capsulaires (CPS).

FIGURE 1 - STRUCTURE DE LA PAROI DES BACTÉRIES GRAM POSITIF ET GRAM NÉGATIF



Citons aussi des polysaccharides non spécifiques excrétés par certaines bactéries et utilisés dans certaines industries : les dextrans, xanthanes. (voir cours précédent).

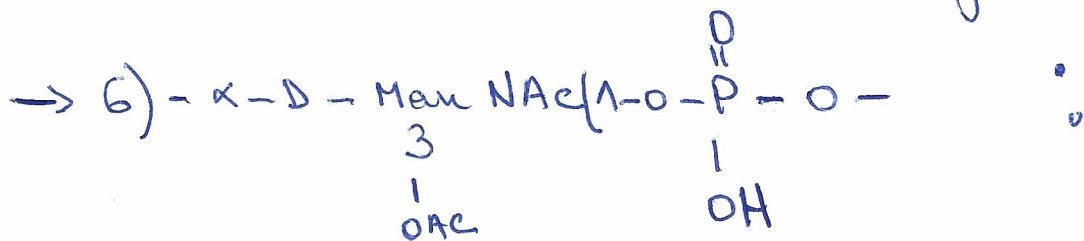
1- Les polysaccharides capsulaires (CPS).

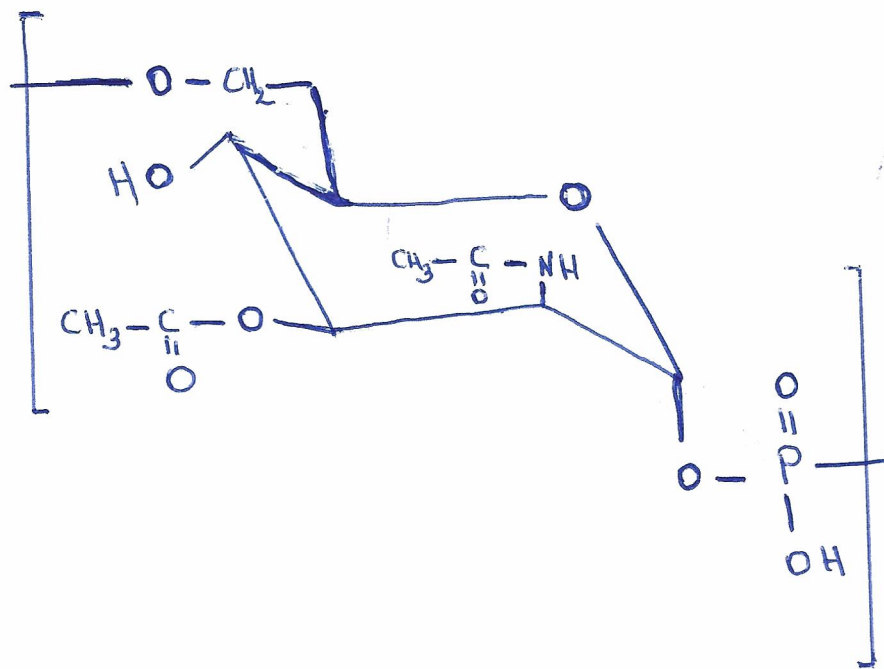
Les polysaccharides capsulaires (CPS) forment une structure bien définie (une auréole) autour des bactéries. Les microorganismes dotés d'une capsule donnent naissance à des colonies d'aspect muqueux. Les CPS peuvent être dotés d'une ancre lipidique comme démontré chez *E. coli*, *Neisseria meningitidis* ou encore des streptocoques du groupe B. Ils se greffent covalamment en couches successives aux chaînes osidiques exposés à la surface membranaire afin de former la capsule. Des polysaccharides pariétaux peuvent entrer dans la composition de cette structure ou encore servir à son maintien autour de la cellule.

11- Structure chimique.

Les polysaccharides capsulaires sont constitués d'un enchaînement d'unités répétitives (voir les exemples) dont le nombre peut varier d'une centaine à plusieurs milliers. L'unité répétitive est constituée généralement de 1 à 7 sucres. Ces oses peuvent porter parfois des substances minérales tels que les phosphates ^{ou} organiques tels que les aminoacides, alcools et acides gras.

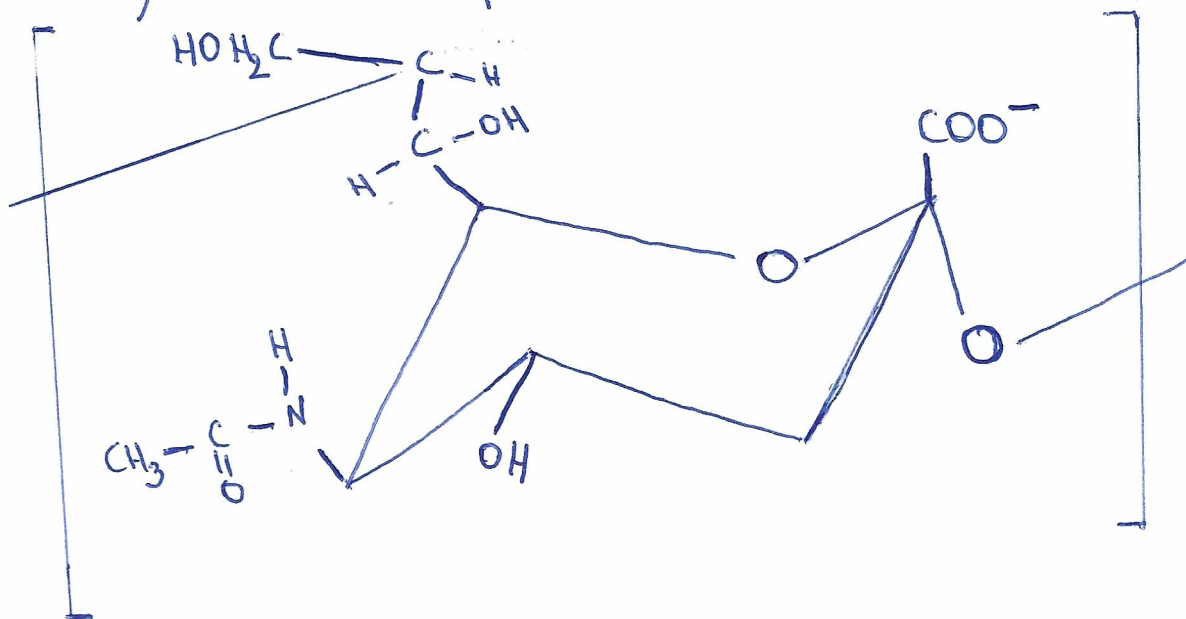
- Exemple 1 : *Neisseria meningitidis* Sérogroupe A





- Exemple 2 : *Neisseria meningitidis* serogroupe B.

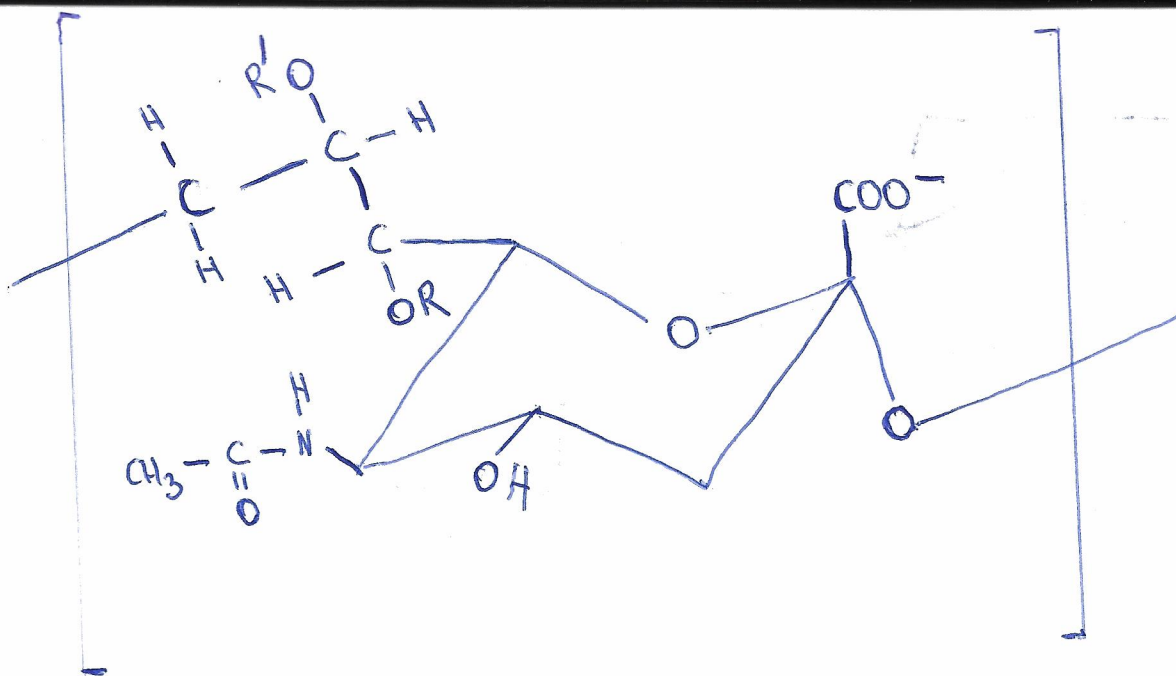
→ 8) α -D-Neu p NAC (2 → :



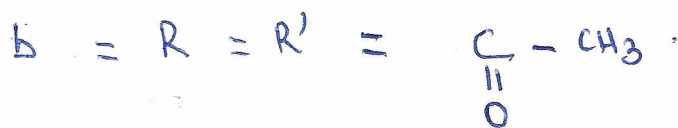
- Exemple 3 : *Neisseria meningitidis* serogroupe C.

→ 9) α -D-Neu p NAC (2 → :

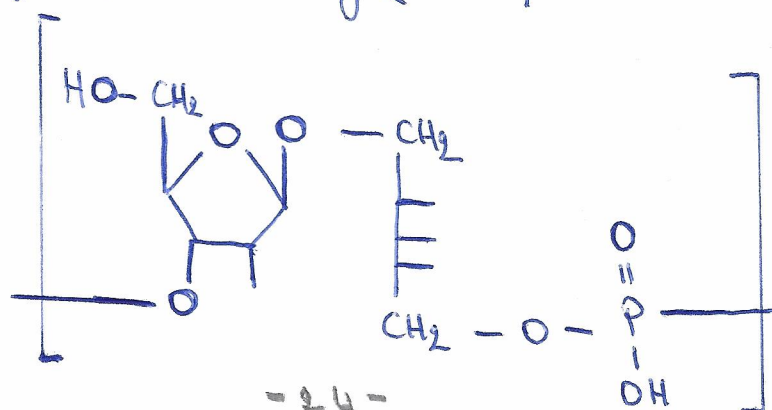
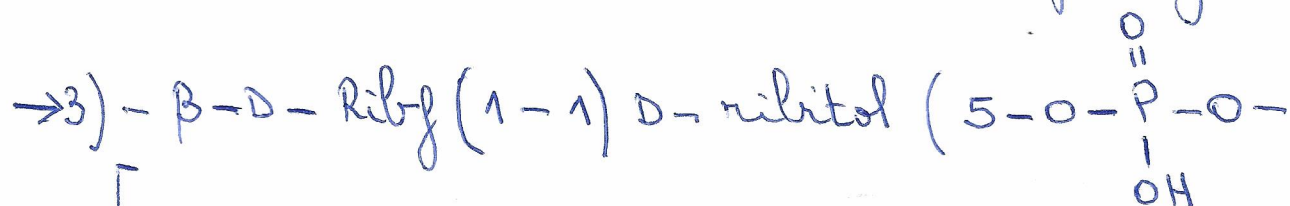
7/8
|
OAc



Dans le polysaccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* de groupe C, l'acide N-acétyl-neuraminique peut porter quatre résidus différents (a, b, c, d) :

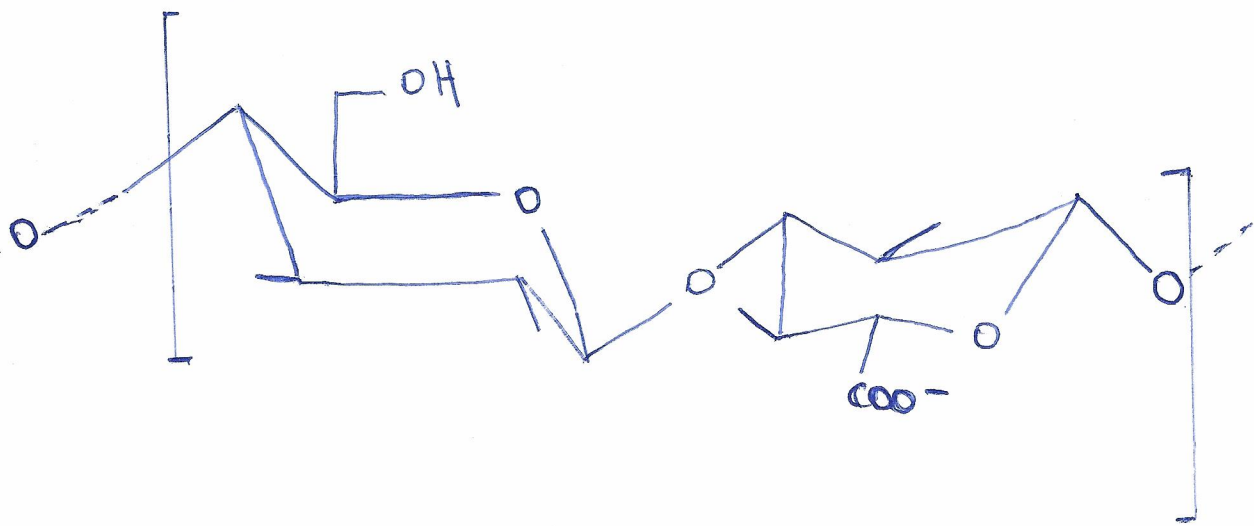


- Exemple 4 : *Haemophilus influenzae* b



Exemple 5 : *Streptococcus pneumoniae* serotype 3.

→ 4) - β -D-Glcp(1→3) β -D-GlcpA(1→



12 - Antigénicité et immunogénicité.

L'antigénicité des polysaccharides capsulaires est liée à l'expression de déterminants antigéniques qui correspondent à une structure particulière, appelée épitope capable de se combiner de façon spécifique à une structure correspondante de la molécule d'anticorps appelée paratope. Le caractère répétitif des épitopes des polysaccharides capsulaires en fait des immunogènes appelés T-indépendants. Cela se traduit par l'absence de réponse immune à ces immunogènes chez le jeune enfant et l'absence de mémoire immunitaire (pas d'effet de rappel, réponse anticorps restreinte à la classe des IgM). Ce problème a été résolu par la réalisation de conjugués : polysaccharide capsulaire - protéine. En effet, le couplage par une liaison covalente du polysaccharide à une protéine transforme le polysaccharide en immunogène dit T-dépendant.

13 - Les vaccins polysaccharidiques.

Les polysaccharides capsulaires sont très bien supportés comme vaccin en raison de leur grande innocuité. Cela s'explique par le fait qu'ils ne sont impliqués dans la virulence que de façon passive, en empêchant le système immunitaire d'éliminer les bactéries, et non pas en exerçant une toxicité directe.

Les polysaccharides capsulaires, seuls ou liés de façon covalente à une protéine constituant, à côté des anatoxines diphtériques et tétaniques, des vaccins bactériens particulièrement efficaces et bien supportés pour la prévention des infections à bactéries capsulées, aussi bien chez le jeune enfant que chez l'adulte. Le seul échec de ces vaccins est représenté par le polysaccharide capsulaire du méningocoque du groupe B.

Il est difficile de mettre au point un vaccin contre le méningocoque de séro-groupe B, dont le polysaccharide est peu immunogène. Cependant, un vaccin ciblant les antigènes de surface non polysaccharidique (4C MenB - Bexsero, Novartis Vaccines and Diagnostics Inc.); par exemple, a été homologué au Canada en 2013,