
PROPRIÉTÉS ANTI INFLAMMATOIRES DU POLY- SACCHARIDE CAPSULAIRE PRODUIT PAR LA CYANOBACTÉRIE THERMOPHILE *MASTIGOCLADUS LAMINOSUS*^{*}

Vincent GLOAGUEN¹, Pierre KRAUSZ

Résumé

Les cyanobactéries constituent un groupe important de micro organismes producteurs de molécules biologiquement actives qui présentent un intérêt thérapeutique. Elles forment des tapis qui sont utilisés empiriquement pour leurs propriétés pharmacodynamiques par les médecins des stations thermales. C'est le cas à Nérès-les-Bains (chaîne thermale d'Auvergne, France) où *Mastigocladus laminosus*, une cyanobactérie thermophile, est utilisée mélangée à de l'argile afin de soigner la polyarthrite rhumatoïde et les douleurs rhumatismales traumatiques. Ces tapis de cyanobactéries produisent un polysaccharide exocellulaire dont la structure a été caractérisée chimiquement. Un effet anti-inflammatoire important et dépendant des doses administrées a été observé suite à l'application locale de ce polysaccharide sur l'oreille de souris présentant un œdème provoqué par de l'huile de croton. L'application d'un hydrolysate partiel du polymère, composé uniquement d'oligosaccharides, a réduit l'œdème de façon similaire au polymère, indiquant que l'activité anti-inflammatoire est associée à la fraction polysaccharidique.

Mots clefs : *Mastigocladus laminosus*, propriétés anti inflammatoires, polysaccharides exocellulaires, oligosaccharides.

Abstract

Anti-inflammatory properties of the capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*

Cyanobacteria constitute a large group of microorganisms that produce biologically active molecules of therapeutic interest. They form abundant mats that are empirically used for their pharmacodynamic properties by spa physicians. This is the case at Nérès-les-Bains (chaîne thermale d'Auvergne, France) where *Mastigocladus laminosus*, a thermophilic cyanobacterium, is being use, mixing with clay, to relieve rheumatoid arthritis and traumatic rheumatism pains. These cyanobacterial mats produce an exocellular polysaccharide whose structure has been chemically characterized. A very significant and dose-dependent anti-inflammatory effect was observed when this polysaccharide was topically applied on mice ear skin with croton-oil induced œdema. The application of a partial hydrolysate of the polymer, consisting only of oligosaccharides, reduced the œdema in a similar way as the polymer, indicating that the anti-inflammatory activity is associated with the polysaccharidic fraction.

Key words : *Mastigocladus laminosus*, anti-inflammatory properties, exocellular polysaccharides, oligosaccharides.

^{*} 3^{ème} Symposium international sur les boues thermales en Europe – Dax – 26/27 novembre 2004

¹. Laboratoire de chimie des Substances naturelles (UPRES-EA 1069) Université de Limoges, faculté des Science et techniques, 123 rue A Thomas, 87060 Limoges.

Plantes et bactéries : une source diversifiée de polysaccharides

Mille milliards de tonnes de matière vivante se créent chaque année à la surface de la terre; une biomasse constituée en majeure partie de molécules ou de macromolécules glucidiques : lignocellulose surtout, mais aussi amidon, saccharose et autres hémicelluloses. En dépit de cette domination, on a longtemps considéré les sucres et leurs dérivés comme des molécules d'importance biologique secondaire, les cantonnant à un rôle de structure (la cellulose par exemple) ou de stockage de l'énergie (amidon ou saccharose). La découverte de l'intérêt des molécules glucidiques dans la détermination des groupes sanguins ou des glycoconjugués dans le phénomène de la cancérisation n'ont pas modifié non plus cette perception. Il a fallu attendre l'intrusion de la biologie moléculaire et du génie génétique pour montrer le rôle fonctionnel de la fraction glucidique. Forts de ces nouvelles connaissances, les chercheurs ré-évaluent actuellement l'importance des glucides et envisagent pour eux de nombreuses applications notamment dans le secteur biomédical. C'est le cas des polysaccharides déjà très largement utilisés comme matière première dans les industries papetière et agro-alimentaire. Extraits majoritairement des végétaux, ces polymères hydrosolubles établissent des interactions spécifiques avec l'eau et peuvent épaissir, stabiliser ou gélifier une solution, même à faible concentration. L'intérêt des polysaccharides ne se limite pas à leurs propriétés rhéologiques : le rôle biologique de certains d'entre eux les désigne comme des molécules à activité pharmaceutique ou cosmétique. Les vertus stimulantes des sucres sont utilisées depuis fort longtemps par la pharmacopée traditionnelle notamment pour leurs activités tonifiantes, anti-tumorales, anti-inflammatoires, baumes antiseptiques [1,11]. Moins évidente est la caractérisation de la structure de ces polymères, leur purification et plus encore l'établissement de relations structure/activité.

Les polysaccharides exocellulaires de cyanobactéries... des modèles complexes

La production de polysaccharides à partir d'algues et de bactéries suscite depuis de nombreuses années des recherches actives. Les propriétés physico-chimiques de ces polymères ainsi que leurs larges domaines d'application en font des produits recherchés par de nombreuses industries [9]. Essentiellement de nature poly-anionique, ces polysaccharides pariétaux auraient des rôles biologiques spécifiques variés qui sont en mesure d'expliquer leurs structures originales.

Si les applications industrielles des agars, des alginates ou des carraghénanes sont nombreuses (additifs en agro-alimentaire et cosmétique ; modificateurs de texture : gélifiant, épaississants, stabilisateurs des émulsions ; excipients pharmaceutiques ; support de culture pour vitroplants ou bactéries ; gels d'électrophorèse ...), les polysaccharides exocellulaires de cyanobactéries ne sont à l'heure actuelle que très peu valorisés à une échelle industrielle. La complexité structurale de ces polymères et les fluctuations saisonnières tant qualitatives que quantitatives de leur production en sont

sans doute les causes principales [10]. Néanmoins, en raison de leurs propriétés chimiques et biologiques variées et parfois originales, il semble que les industriels soient prêts à développer de nouvelles applications à partir d'eux. Le cas des polymères exocellulaires très faciles à recueillir en culture ou en post-culture est particulièrement attrayant, et il est sans doute opportun de s'engager dans des études à caractère prospectif dans ce domaine.

Tout comme de nombreux micro-organismes, les cyanobactéries produisent des exopolymères. Ces derniers sont majoritairement de nature polysaccharidique. Étant donné le rôle probable de ces polysaccharides exocellulaires ou exopolysaccharides (EPS) dans les relations entre les microorganismes et le milieu, on peut supposer qu'il existe une grande diversité naturelle de ces EPS chez les cyanobactéries. Ces polymères se différencient par la nature variée des monosaccharides, des substitutions non hydrocarbonées et des types de liaisons qui les constituent, contribuant à leur conférer une gamme étendue de propriétés physico-chimiques [9]. La localisation de ces polymères à la surface cellulaire en font d'excellents agents d'adaptation à des niches écologiques variées. Comparativement à la masse de travaux qu'ils ont suscité chez les procaryotes hétérotrophes et les algues, les polysaccharides extracellulaires de cyanobactéries ont fait l'objet de peu d'études. Ces polymères sont disposés tangentiellement à la membrane externe, ou au contraire forment des structures radiales. Jusqu'à présent, aucune relation entre l'appartenance à une section taxonomique et le type de disposition des EPS n'a pu être établie. Notre étude, réalisée sur près de 30 souches, montre que les EPS comprennent jusqu'à 9 unités monosaccharidiques différentes, à 5 ou 6 carbones. Ils sont acides ou neutres [3], et se présentent sous deux formes, les polysaccharides capsulaires (CPS), et les polysaccharides libres dans le milieu qui forment une phase visqueuse appelée "slime". Sous la forme de capsule, les polysaccharides sont et restent intimement associés à la surface cellulaire. Ils peuvent même être liés de façon covalente à la membrane externe. En revanche, sous la forme de slime, ils sont initialement, soit très faiblement associés à la surface, soit libres dans le milieu.

Les polysaccharides, une relation structure - activité à découvrir. Cas de la cyanobactérie *Mastigocladus laminosus*

De façon globale, l'activité biologique des polysaccharides est souvent corrélée à leur acidité bien que cette dernière caractéristique ne soit pas un déterminant absolu. En revanche, une plus grande complexité de leur structure (taux de branchement et ramification, degré de polymérisation) semble influencer positivement sur leur capacité à déclencher une activité biologique. Par ailleurs, il convient, dans une seconde approche, d'identifier les motifs glucidiques responsables de ces activités. C'est là que le bât blesse : les polysaccharides extraits de végétaux ont des caractéristiques variables, incompatibles avec la qualité et la pureté nécessaires aux applications

biomédicales. Les espèces sources sont, en effet, soumises à des aléas climatiques et écologiques qui jouent de manière significative sur la quantité et la qualité des polysaccharides qu'elles produisent. D'où l'idée de recourir d'une part à la culture contrôlée des végétaux et/ou, d'autre part d'ajuster les propriétés d'un polysaccharide en ayant recours au fractionnement par chromatographie d'échanges d'ions ou d'exclusion stérique ou à la modification chimique et/ou enzymatique.

Il n'existe pas à proprement parler de protocole universel d'extraction des polysaccharides et un grand nombre de pratiques repose sur un savoir-faire propre à chaque laboratoire. Néanmoins, quelques-unes de ces pratiques sont couramment reportées dans la littérature [9]. Les polysaccharides sont fréquemment isolés à partir de la biomasse dépigmentée après extraction en solution aqueuse par précipitation éthanolique. Les polysaccharides bruts pourront enfin être prépurifiés par digestion enzymatique de l'amidon avec un cocktail pullulanase - amyloglucosidase. Les polysaccharides anioniques seront, quant à eux, séparés par précipitation sélective en ayant recours à l'utilisation d'amine quaternaire ou de cations divalents.

Compte tenu de la localisation géographique de l'Université de Limoges, nous nous sommes tournés vers les thermes d'Auvergne où se développent, en quantité, des biomasses abondantes essentiellement formées de colonies de cyanobactéries. Parmi les biomasses thermales prospectées, celle qui se développe à Nérès-les-Bains a retenu notre attention. Des colonies de cyanobactéries s'y développent naturellement sur les parois et le fond du bassin de refroidissement, puis se détachent pour former des amas importants visibles à la surface du bassin. Lorsqu'on les observe en détail, ces amas apparaissent denses, extrêmement pigmentés et sécrètent une substance mucilagineuse abondante. Ces colonies sont majoritairement formées par *Mastigocladus laminosus*, une cyanobactérie filamenteuse hétérocystée aux trichomes ramifiés.

En l'absence d'endo-hydrolases spécifiques connues pour le polymère produit, notre stratégie d'analyse structurale a reposé sur l'obtention par voie chimique d'unités oligosaccharidiques plus faciles à analyser. L'hydrolyse acide ménagée conduit à la fragmentation en plusieurs entités oligosaccharidiques. Elle permet la libération de 2 acides aldobiuroniques, d'un tri et d'un pentasaccharide acide [4-6]. Ces deux dernières structures sont constituées d'une liaison uronosidyle originale extrêmement résistante à l'hydrolyse acide. La dégradation lithium, méthode de dégradation spécifique des acides uroniques, conduit, quant à elle, à la libération d'un tetra- et d'un heptasaccharide neutre qui s'associe pour former une structure dodécasaccharidique unique [7]. La formation de l'acide tetrahydro-cyclopentane carboxylique, situé en position terminale réductrice de cet oligosaccharide, résulte probablement de la réduction d'un acide uronique après ouverture et ré-arrangement du cycle. L'ensemble des données rassemblées au cours de cette étude nous permettent de proposer un modèle structural formé d'une unité de répétition pentadécasaccharidique [7].

Nous avons souhaité dans une seconde approche corréler la structure du polysaccharide exocellulaire produit par *Mastigocladus laminosus* aux propriétés biologiques décrites pour cette biomasse. En effet, la biomasse thermale de Nérès-les-Bains, lorsqu'elle est utilisée en pélothérapie, est empiriquement reconnue pour ses vertus anti-inflammatoires. Compte tenu de sa localisation extracellulaire, il n'est pas utopique de penser que les polymères exocellulaires excrétés par cette biomasse soient à l'origine des propriétés biologiques observées. Une étude pharmacochimique réalisée en partenariat avec la faculté de Pharmacie de Liège nous a permis d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de différentes préparations saccharidiques. Des tests réalisés sur des œdèmes provoqués à la surface d'oreilles de souris par application d'un agent inflammatoire démontrent les propriétés anti-inflammatoires du polysaccharide capsulaire de *Mastigocladus laminosus* (tableau 1).

Variation de la masse de l'œdème	
Témoin	$0 \pm 0.9 \%$
Indométhacine	$- 64.6 \pm 1.1 \%$
CPS 100 µg/oreille	$- 34.4 \pm 2.4 \%^{***}$
CPS 200 µg/oreille	$- 40.1 \pm 2.3 \%^{***}$
CPS 400 µg/oreille	$- 50.6 \pm 1.4 \%^{***}$
CPS 800 µg/oreille	$- 55.5 \pm 4.4 \%^{***}$
Oligosaccharides 100 µg/oreille	$- 3.8 \pm 5.2 \%$ NS
Oligosaccharides 200 µg/oreille	$- 39.0 \pm 7.6 \%^{***}$
Oligosaccharides 400 µg/oreille	$- 55.0 \pm 2.0 \%^{***}$
Oligosaccharides 800 µg/oreille	$- 63.2 \pm 5.9 \%^{***}$

Tableau 1 : Caractérisation des propriétés anti-inflammatoires du polysaccharide capsulaire sécrété par la cyanobactérie thermophile *Mastigocladus laminosus*. Mise en évidence de l'activité d'un mélange d'oligosaccharides. Les résultats exprimés sont une moyenne de 6 tests [8]. * = $p < 0,01$**

L'administration de quantité croissante de polysaccharide (100, 200, 400 et 800 µg/oreille) révèle par ailleurs l'existence d'un effet dose dépendant. L'activité anti-inflammatoire maximale est constatée dans le cas de la dose la plus forte (800 µg/oreille) et conduit à une perte de masse de l'œdème similaire à celle obtenue après dépôt de 250 µg d'indométhacine, un agent anti-inflammatoire présent dans la pharmacopée. Ces résultats sont une preuve directe des vertus thérapeutiques des cyanobactéries thermales de Nérès-les-Bains. Ils viennent élargir le tableau des propriétés biologiques déjà identifiées pour de tels micro-organismes [2]. Si l'activité pharmacodynamique de ces cyanobactéries est associée à la fraction polysaccharidique qu'elles produisent, nos travaux posent plus largement la question du motif structural

responsable de l'expression des propriétés observées. C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité reproduire une expérience identique avec un hydrolysate du CPS formé d'un mélange des principaux oligosaccharides de structure déjà caractérisés. Les résultats recueillis à cette occasion sont une nouvelle fois positifs et apparaissent également dose-dépendant. L'activité anti-inflammatoire maximale est constatée dans le cas de la dose la plus forte (800 µg/oreille) et conduit à une perte de masse de l'œdème de plus de 63 %.

Conclusion

L'ensemble des travaux réalisés dans le domaine de la valorisation biologique du polysaccharide sécrété par *Mastigocladus laminosus* confirme l'extraordinaire complexité structurale de ce polymère dont nous avons démontré qu'il était biologiquement actif. Si nos résultats, fait unique, apportent des preuves expérimentales des vertus observées empiriquement, ils ne précisent malheureusement pas le mode d'action des molécules, cet aspect du travail restant encore à explorer. Les quelques résultats présentés doivent nous conforter dans notre vision de la biomasse... Celle d'une source renouvelable de polysaccharides dont certains sont d'importance biologique. L'approche développée par notre laboratoire repose sur une double démarche à la fois préparative et analytique qui permet à l'expérimentateur de corréler les fonctions biologiques des molécules à leurs structures primaires.

Bibliographie

1. Flandroy L. 1996. Histoire stimulante des sucres. *Biofutur* 1996;159:35-41.
2. Garbacki N, Gloaguen V, Damas J, Hoffmann L, Angenot L. Inhibition of croton oil-induced oedema in mice ear skin by capsular polysaccharides from Cyanobacteria. Naunyn-Schmiedeberg's. *Archives of Pharmacology* 2000;361:460-464.
3. Gloaguen V, Morvan H, Hoffmann L. Released and capsular polysaccharides of *Oscillatoriaceae* (Cyanophyceae, Cyanobacteria). *Arch Hydrobiol Suppl* 1995a;109, *Algol Studies* 78:53-69.
4. Gloaguen V, Wieruszski JM, Strecker G, Hoffmann L, Morvan H. Identification by NMR spectroscopy of oligosaccharides obtained by acidolysis of the capsular polysaccharides of a thermal biomass. *Int J Biol Macromol* 1995b;17:387-393.
5. Gloaguen V, Vebret L, Morvan H, Hoffmann L. 1996. Chemical composition of the capsular polymers of the blue green algal mats of the thermal spring of Nérès-les-Bains. *Arch Hydrobiol Suppl* 1996;117, *Algol Studies* 83:245-255.
6. Gloaguen V, Plancke Y, Strecker G, Vebret L, Hoffmann L, Morvan H. Structural characterization of three aldobiuronic acids derived from the capsular polysaccharide produced by the thermophile cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Int J Biol Macromol* 1997;21:73-79.
7. Gloaguen V, Morvan H, Hoffmann L, Plancke Y, Wieruszski JM, Lipens G, Strecker G. 1999. Capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* : structural study of a dodecasaccharide obtained by lithium degradation. *Eur J Biochem* 1999;266:1-10.

8. Gloaguen V, Garbacki N, Petit D, Morvan H, Hoffmann L. Bioactive capsular polysaccharide from the thermophilic *Mastigocladus laminosus* (Cyanophyceae/Cyanobacteria) : demonstration of anti- inflammatory properties. *Arch. Hydrobiol, Algological Studies* 2003;108(Cyanobacterial research 3):63- 73.
9. Morvan H, Gloaguen V, Vebret L, Joset E, Hoffmann L. Structure- function investigations on capsular polymers as a necessary step for new biotechnological applications : the case of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Plant Physiol Biochem* 1997;35,9:671- 683.
10. Perez S. Les vertus cachées des sucres. *Biofutur* 1997;171,21- 23.
11. Srivastava R, Kulshreshtha D. Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochemistry* 1989;28,11:2877- 28.

