



UNIVERSITE DE LIMOGES



Faculté des Sciences et Techniques de Limoges

Ecole Doctorale Sciences – Technologie -Santé

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

**Discipline : Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles**

*présentée par*

**Charlotte MOINE**

**EXTRACTION, CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET  
VALORISATION D'UNE FAMILLE D'HÉMICELLULOSES DU BOIS.  
Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes.**

Directeurs de Thèse : M. Vincent GLOAGUEN, Maître de Conférences

M. Pierre KRAUSZ, Professeur

Soutenue le 14 février 2005, devant la commission d'examen

**Rapporteurs :** M. H. MORVAN Professeur, Université d'Artois  
M. J.F. THIBAUT Directeur de Recherche, INRA de Nantes

**Examineurs :** M. A. PIZZI Professeur, Université de Nancy  
M. P. KRAUSZ Professeur, Université de Limoges  
M. V. GLOAGUEN Maître de Conférences, Université de Limoges

**Invité :** M. J. CHRISTEN Directeur de l'Incubateur du Limousin







# Remerciements

---

*Avant de commencer la présentation de ce travail, j'ai le plaisir de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin à son aboutissement.*

*Je remercie le directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles Monsieur Pierre Krausz, pour m'y avoir accueilli. Je vous suis très reconnaissante d'avoir obtenu pour moi un poste d'ATER, expérience enrichissante et qui m'a permis d'achever plus sereinement ma thèse. Je vous remercie également pour votre exigence scientifique et votre rigueur qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce travail.*

*Merci à Vincent Gloaguen d'avoir encadré ce travail depuis mes premiers pas en DEA. Je te remercie vivement d'avoir élaboré un sujet aussi riche et passionnant, de m'avoir fait confiance pour le faire évoluer dans divers domaines, qui auront tous été très enrichissants pour ma formation ; merci d'avoir su me recadrer parfois. J'ai profité au cours de ces trois années de tes réflexions toujours très pertinentes, de ton esprit critique et ta rigueur en matière de rédaction. Ton optimisme constant opposé à mon scepticisme, ont grandement contribué à ma formation, ou plutôt à ma « déformation » et je t'en remercie. J'ai également eu beaucoup de plaisir à aborder avec toi un sujet nouveau au LCSN, l'analyse des polysaccharides.*

*J'adresse également tous mes remerciements aux lecteurs attentifs de ce manuscrit, Monsieur Jean-François Thibault, Directeur de Recherche à l'INRA de Nantes et Monsieur Henri Morvan, Professeur à l'Université d'Artois, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail, et à Monsieur Antonio Pizzi, Professeur à l'Université de Nancy, qui a présidé ce jury.*

*Je tiens à remercier chaleureusement Rachida Zerrouki pour le soutien permanent qu'elle m'a accordé au cours de ces trois ans. Je vous remercie d'avoir accepté de m'initier à la synthèse glucidique, d'avoir encadré cette partie de ma thèse, de m'avoir fait profiter de vos compétences et de m'avoir inculqué la rigueur nécessaire à ce travail. Merci également pour les corrections attentives de mes écrits, pour tous les conseils précieux et l'aide que vous m'avez apporté dans le domaine de l'enseignement. Merci Rachida pour votre écoute et votre disponibilité, merci de m'avoir donné un peu plus confiance en moi. Merci pour tout, Madame le Professeur...*

*Je voudrais remercier également Monsieur Michel Guilloton de l'intérêt et du temps qu'il a accordé à ce travail. Soyez assuré de toute ma reconnaissance pour avoir éclairé mes idées concernant la modélisation moléculaire. Merci également pour tout le temps que vous avez consacré à la correction de mes articles.*

*Je remercie Vincent Sol de m'avoir suivi et encadré dans ma première expérience d'enseignement. Merci Vincent pour ta disponibilité et ta gentillesse, et ton soutien aussi bien scientifique qu'amical.*

*Merci encore à Monsieur Robert Granet pour m'avoir fait partager ses compétences et ses conseils avisés. Merci d'avoir enrichi ce travail au travers des discussions que nous avons eu pendant ces trois ans.*

*J'adresse tous mes remerciements à François Louvet, professeur à l'École de Céramique de Limoges, pour avoir encadré une partie de mon travail, et m'avoir fait bénéficier de toute son aide et de ses connaissances en matière d'analyse de données. Merci pour le temps qu'il m'a généreusement consacré.*

*Merci à Karim Mazeau, directeur de recherche au CERMAV de Grenoble, pour m'avoir accueillie à Grenoble et m'avoir initié à la modélisation moléculaire des sucres.*

*Je voudrais remercier également Monsieur Pierre Guenot, responsable du CRMPO de Rennes, qui a réalisé les spectres de masse. Merci pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour ses conseils.*

*Je remercie Sylvie Foucaud, et Etienne Laborde qui a réalisé les analyses thermiques des plastiques.*

*Je suis très reconnaissante à Monsieur Philippe Bressolier de m'avoir permis d'effectuer quelques essais en CPG-SM, et à Monsieur Bernard Verneuil pour son aide et ses conseils en spectrométrie de masse. Mes remerciements également à Yves Champavier pour la réalisation des spectres RMN.*

*J'adresse tous mes remerciements aux organisateurs du concours Campus Entrepreneur, et particulièrement à Monsieur Gonzague Laurent, chargé de mission à la MRCTE Limousin, et à Monsieur Jacques Christen, ainsi qu'à Benoît Genestie, Sophie Lautrette, Géraldine Laverdan et Gaël Ruiz pour avoir partagé ce projet.*

*Merci à tous les nouveaux biologistes du LCSN, Michel Carlué, Sabine Lhernould, Guy Costa, et plus particulièrement un grand merci à Daniëlle Lejolly, pour m'avoir fait partager son expérience, pour son aide et ses précieux conseils.*

*Je tiens enfin à remercier Karine Cleries, Michelle Constantin et Valérie Magliulo, les étudiants de maîtrise qui ont participé à ce travail, Angélique Lascaux et Emilie Letou-Bonneval, Nathalie Lachaud et Alexandre Pouch, ainsi que tous les doctorants du LCSN pour leur bonne humeur, pour leur soutien et leur aide. Un merci tout particulier à Fabienne, Véronique, Amel et Rachida, qui ont partagé avec moi les moments les plus difficiles, mais aussi les meilleurs.*

*Je voudrais dire merci à des personnes qui, bien avant mon passage en thèse, m'ont encouragé tout au long de mes études, et sans qui ce travail n'aurais sûrement jamais vu le jour, Monsieur Cessac, Madame Redon, Madame Lafflaquière et Monsieur Chouin, Monsieur De Lumley.*

*Je remercie mes parents et ma sœur pour leur soutien, pour avoir partagé mes enthousiasmes et mes déceptions. Leur contribution, certes discrète, n'en a pas été pour le moins essentielle. Enfin merci Vincent, pour avoir partagé tous ces moments à mes côtés, pour avoir été une précieuse source réconfort et d'encouragement.*

# Résumé





---

## **Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois - Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes.**

---

Cette étude s'inscrit dans le contexte général de valorisation des co-produits de la filière bois. Elle s'intéresse à l'analyse structurale des xylanes extraits des sciures de châtaignier ainsi qu'à leur transformation en films plastiques. Après extraction et purification, la structure de ces polysaccharides a été caractérisée par RMN et spectrométrie de masse. Dans une deuxième partie, les xylanes ont été modifiés par acylation par un acide gras. La mise en place d'un plan d'expériences a permis d'identifier les paramètres les plus influents de la réaction, et d'obtenir un modèle mathématique de celle-ci, dans un domaine expérimental défini. Ce modèle permet de sélectionner les conditions opératoires qui conduisent à l'obtention de plastiques de degrés de substitution déterminés. Enfin, une étude par modélisation moléculaire nous renseigne sur l'organisation tridimensionnelle des xylanes à l'état natif et substitué contribuant ainsi à expliquer leurs propriétés physiques.

---

## **Isolation, structural analysis and valorization of hemicelluloses of wood – Novel xylan based thermoplastics.**

---

In a general context of valorization of wood industry by-products this study deals with a structural analysis of xylans isolated from chestnut sawdusts and their derivatization in order to obtain plastic films. These polysaccharides were extracted, purified and their characterization was achieved by NMR and mass spectrometry. In a second approach, we studied acylation of xylans by fatty acids. The building of an experimental design allowed to define the most influential parameters. A model of reaction established in a confined experimental domain was used to optimize the reaction. Molecular modeling has been performed on native and derivatized xylans, leading to a description of three-dimensional features of these polymers and a prediction of their physical properties.

---

**Mots-clés :** xylanes, hémicelluloses, extraction, valorisation, plastiques, acylation, acide 4-*O*-méthylglucuronique, analyse en composantes principales, plan d'expériences, modélisation moléculaire.

---

---

**Keywords :** xylans, hemicelluloses, extraction, valorization, plastics, acylation, 4-*O*-methylglucuronic acid, principal components analysis, experimental design, molecular modeling.

---



# Table des matières



# Table des matières

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Travaux antérieurs.....</b>	<b>5</b>
<b>I.1. Structure de la paroi cellulaire végétale.....</b>	<b>5</b>
I.1.1. Les principaux constituants de la paroi végétale .....	8
<i>I.1.1.a. La cellulose .....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.1.b. Les hémicelluloses.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.1.c. Les pectines .....</i>	<i>10</i>
<i>I.1.1.d. Les lignines .....</i>	<i>10</i>
<i>I.1.1.e. Autres constituants .....</i>	<i>12</i>
I.1.2. Modèles pariétaux .....	12
<b>I.2. Les xylanes au sein de la paroi .....</b>	<b>18</b>
I.2.1. Le squelette de xylane .....	18
I.2.2. Les branchements.....	18
I.2.3. Diversité des xylanes .....	21
I.2.4. Propriétés physico-chimiques des xylanes.....	22
<i>I.2.4.a. Masse moléculaire, degré de polymérisation.....</i>	<i>22</i>
<i>I.2.4.b. Solubilité .....</i>	<i>23</i>
I.2.5. Liaisons chimiques entre les xylanes et les autres constituants de la paroi .	24
<i>I.2.5.a. Liaisons non covalentes .....</i>	<i>24</i>
<i>I.2.5.b. Liaisons covalentes .....</i>	<i>24</i>
I.2.6. Les principales sources de xylane .....	27
<b>I.3. Composition chimique du bois .....</b>	<b>28</b>
I.3.1. Principales différences de composition entre feuillus et résineux .....	28
I.3.2. Les xylanes du bois .....	31
<i>I.3.2.a. Le 4-O-méthylglucuronoxylane des bois de feuillus .....</i>	<i>31</i>
<i>I.3.2.b. L'arabino-(4-O-méthylglucurono)xylane des bois de résineux.....</i>	<i>37</i>
<b>I.4. L'extraction des xylanes du bois .....</b>	<b>38</b>
I.4.1. Choix des solvants d'extraction .....	39

I.4.1.a. Solvants organiques .....	39
I.4.1.b. Solutions alcalines aqueuses.....	39
I.4.2. Séparation des fractions polysaccharidiques.....	42
I.4.3. Description des divers traitements .....	43
I.4.3.a. Traitement mécanique.....	43
I.4.3.b. Traitement à la vapeur.....	43
I.4.3.c. Effet de la température.....	44
I.4.3.d. Utilisation des ultrasons .....	44
I.4.3.e. Micro-ondes et extraction .....	44
I.4.3.f. Elimination des extractibles.....	45
I.4.3.g. Déprotéination .....	45
I.4.3.h. Dépectination.....	45
I.4.3.i. Désoxygénation.....	45
I.4.3.j. Traitement par les borohydrures alcalins.....	45
I.4.3.k. Délignification.....	46
I.4.4. Effets de l'extraction sur la structure .....	47
<b>I.5. Techniques de caractérisation des hémicelluloses.....</b>	<b>48</b>
I.5.1. Composition monosaccharidique .....	48
I.5.1.a. méthodes colorimétriques .....	48
I.5.1.b. méthodes chromatographiques .....	50
I.5.2. Analyse structurale.....	57
I.5.2.a. Position des liaisons glycosidiques.....	57
I.5.2.b. Séquence .....	60
I.5.2.c. Séparation des oligosaccharides.....	64
I.5.2.d. Structure des oligosaccharides .....	65
I.5.2.e. Analyse structurale des polysaccharides.....	69
I.5.2.f. Poids moléculaire .....	70
<b>I.6. Valorisations industrielles des xylanes .....</b>	<b>71</b>
I.6.1. Hydrolyse des xylanes .....	72
I.6.2. Fonctionnalisation des xylanes .....	73
<b>I.7. Une nouvelle voie de valorisation chimique des xylanes – Plastiques d'origine végétale. ....</b>	<b>75</b>

<b>Chapitre II : Extraction et Analyse structurale des xylanes de feuillus .....</b>	<b>79</b>
--	-----------

<b>II.1. Extraction et composition chimique des xylandes issus de différentes espèces forestières .....</b>	<b>79</b>
II.1.1. Protocole d'extraction standard .....	79
II.1.2. Etude quantitative et qualitative des résidus et fractions extraits .....	81
<b>II.2. Analyse de composition – Optimisation des conditions d'analyse</b>	<b>86</b>
II.2.1. Etude et optimisation de l'étape de méthanolyse .....	86
II.2.2. Synthèse et caractérisation de l'acide 4- <i>O</i> -méthylglucuronique .....	88
II.2.2.a. Protection sélective des positions 2,3 et 6 du méthylglucose.....	89
II.2.2.b. Méthylation du méthyl-2,3,6- <i>O</i> -tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside.....	91
II.2.2.c. Déprotection du méthyl-4- <i>O</i> -méthyl-2,3,6- <i>O</i> -tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside....	92
II.2.2.d. Oxydation sélective du méthyl-4- <i>O</i> -méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside .....	93
II.2.2.e. Caractérisation de l'acide méthyl-4- <i>O</i> -méthylglucuronique .....	95
<b>II.3. Xylandes de châtaignier.....</b>	<b>99</b>
II.3.1. Optimisation du protocole d'extraction .....	99
II.3.2. Bilan d'extraction et analyse des xylandes extraits .....	101
II.3.3. Suivi de l'extraction par spectroscopie infrarouge .....	103
II.3.4. Polydispersité des polysaccharides extraits .....	106
<b>II.4. Analyse structurale d'un 4-<i>O</i>-méthylglucuronoxylane .....</b>	<b>108</b>
II.4.1. Obtention d'oligosaccharides par différents protocoles d'hydrolyse .....	108
II.4.1.a. Hydrolyse enzymatique.....	108
II.4.1.b. Hydrolyse acide .....	111
II.4.1.c. Autohydrolyse .....	112
II.4.2. Séparation et caractérisation des xylo-oligosaccharides obtenus par hydrolyse acide.....	114
II.4.3. Etude du xylane natif .....	118
II.4.3.a. Analyse par RMN.....	118
<b>II.5. Conclusion.....</b>	<b>122</b>

## **Chapitre III : Valorisation des xylandes .....**

### **III.1. Obtention de films plastiques par réaction d'acylation d'hémicelluloses.....**

III.1.1. Thermoplastiques obtenus par greffage de chaînes grasses sur la cellulose .....	125
--	-----

III.1.2. Réaction d'acylation des hémicelluloses – Essais préliminaires.....	129
III.1.2.a. Dissolution des hémicelluloses.....	130
III.1.2.b. Acylation des hémicelluloses – Purification des esters formés .....	131
III.1.2.c. Caractérisation des esters hémicellulosiques.....	131
III.1.2.d. Résultats .....	134
<b>III.2. Optimisation de la réaction d'acylation des xylanes.....</b>	<b>136</b>
III.2.1. Dissolution du xylane dans le système de solvant DMA / LiCl.....	136
III.2.2. Définition du domaine expérimental .....	136
III.2.3. Etude préliminaire .....	137
III.2.3.a. Influence de la durée de la réaction .....	137
III.2.3.b. Influence de la température de réaction.....	138
III.2.3.c. Influence de la quantité de chlorure d'acide laurique.....	138
III.2.4. Analyse en Composantes Principales (ACP) .....	141
III.2.4.a. Principe .....	142
III.2.4.b. Méthode.....	143
III.2.5. Plan en carré gréco-latin.....	148
III.2.5.a. Principe .....	148
III.2.5.b. Nouvelle définition du domaine expérimental .....	148
III.2.5.c. Construction du plan d'expériences .....	149
III.2.5.d. Analyse des résultats .....	151
III.2.6. Modélisation – Etude des surfaces de réponse .....	156
III.2.6.a. Méthodologie.....	156
III.2.6.b. Analyse mathématique des résultats.....	159
III.2.6.c. Analyse graphique du modèle.....	162
<b>III.3. Evaluation des propriétés mécaniques et thermiques des esters de xylanes .....</b>	<b>168</b>
III.3.1. Tests mécaniques.....	168
III.3.2. Analyse thermique.....	172
III.3.2.a. Résistance thermique.....	172
III.3.2.b. Etude des transitions thermiques.....	173
III.3.2.c. Spectrométrie mécanique.....	174
<b>III.4. Modélisation moléculaire du xylane natif et du xylane substitué .....</b>	<b>176</b>
III.4.1. Quelques généralités sur la modélisation moléculaire des polymères ....	176
III.4.2. Analyse conformationnelle des motifs disaccharidiques .....	177
III.4.3. Construction de chaînes de xylane – Etude de l'état cristallin.....	181



III.4.4. Etudes des matériaux en phase amorphe .....	183
<b>III.5. Conclusion .....</b>	<b>187</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>189</b>
<b>Chapitre IV : Partie expérimentale .....</b>	<b>193</b>
<b>IV.1. Matériel et procédures analytiques.....</b>	<b>193</b>
IV.1.1. Réactifs et solvants.....	193
IV.1.2. Analyses .....	194
IV.1.2.a. Spectroscopie infra-rouge .....	194
IV.1.2.b. Spectroscopie RMN .....	194
IV.1.2.c. Pouvoirs rotatoires .....	194
IV.1.2.d. Spectroscopie UltraViolet-Visible .....	194
IV.1.2.e. Spectrométrie de masse MALDI .....	194
IV.1.2.f. Spectrométrie de masse Haute Résolution.....	195
IV.1.2.g. Analyse en CPG/SM .....	195
IV.1.3. Chromatographie.....	195
IV.1.3.a. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	195
IV.1.3.b. Chromatographie préparative sur plaques de silice.....	196
IV.1.3.c. Chromatographie préparative sur colonne.....	196
<b>IV.2. Protocoles d'extraction des xylanes .....</b>	<b>197</b>
IV.2.1. Matériel biologique .....	197
IV.2.2. Protocole d'extraction standard des hémicelluloses pour différentes espèces forestières .....	197
IV.2.2.a. Extraction à l'éthanol.....	197
IV.2.2.b. Extraction des pectines.....	197
IV.2.2.c. Délignification .....	198
IV.2.2.d. Extraction des hémicelluloses.....	198
IV.2.3. Extraction des xylanes à partir de sciures de châtaignier.....	198
IV.2.3.a. Extraction à l'éthanol.....	199
IV.2.3.b. Extraction des pectines.....	199
IV.2.3.c. Délignification .....	199
IV.2.3.d. Extraction des xylanes.....	199
<b>IV.3. Composition monosaccharidique .....</b>	<b>200</b>

IV.3.1. Détermination de la composition monosaccharidique par CPG .....	200
IV.3.1.a. Préparation des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés.....	200
IV.3.1.b. Analyse des dérivés TMS en CPG.....	201
IV.3.2. Dosages des sucres par colorimétrie .....	201
IV.3.2.a. Dosage des oses neutres (Dubois, 1956).....	201
IV.3.2.b. Dosage des acides uroniques (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973).....	202
IV.3.2.c. Dosages des sucres réducteurs (Lever, 1972).....	202
<b>IV.4. Méthodes d'analyses des oligosaccharides et polysaccharides..</b>	<b>203</b>
IV.4.1. Répartition en masses des polysaccharides .....	203
IV.4.2. Hydrolyse des xylanes.....	203
IV.4.2.a. Hydrolyse enzymatique.....	203
IV.4.2.b. Hydrolyse acide .....	204
IV.4.2.c. Autohydrolyse .....	204
IV.4.3. Purification des oligosaccharides .....	204
<b>IV.5. Synthèse de l'acide 4-O-méthylglucuronique.....</b>	<b>205</b>
IV.5.1. Synthèses et caractérisation des produits .....	205
IV.5.1.a. méthyl-2,3,6-tri-O-benzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (1a).....	205
IV.5.1.b. méthyl-4-O-méthyl-2,3,6-O-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (2).....	207
IV.5.1.c. méthyl-4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (3).....	208
IV.5.1.d. Sel de sodium de l'acide méthyl-4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosiduronique (4)	209
<b>IV.6. Synthèse des esters d'hémicelluloses.....</b>	<b>210</b>
IV.6.1. Matériel biologique .....	210
IV.6.2. Solubilisation des hémicelluloses dans le système de solvant DMA/LiCl	210
IV.6.2.a. 1 <sup>ère</sup> méthode .....	210
IV.6.2.b. 2 <sup>ème</sup> méthode .....	210
IV.6.3. Préparation des esters laurique .....	210
IV.6.4. Mise en forme des films plastiques.....	211
IV.6.5. Caractérisation des esters .....	211
IV.6.5.a. Spectroscopie infra-rouge .....	211
IV.6.5.b. Degré de substitution.....	211
<b>IV.7. Analyse des données .....</b>	<b>212</b>
IV.7.1. Analyse en Composantes Principales (ACP) .....	212
IV.7.1.a. Centrage et réduction des données brutes.....	212
IV.7.1.b. Matrice des corrélations.....	212

IV.7.1.c. Valeurs propres et vecteurs propres associées à la matrice des corrélations ....	213
IV.7.1.d. Calcul des composantes principales.....	214
IV.7.2. Méthode de régression .....	215
IV.7.2.a. Relation de codage des facteurs .....	215
IV.7.2.b. Représentation matricielle du système d'équations.....	215
IV.7.2.c. Régression.....	216
IV.7.2.d. Calcul du coefficient de détermination.....	216
<b>IV.8. Tests mécaniques .....</b>	<b>217</b>
IV.8.1. Analyse thermogravimétrique .....	217
IV.8.2. Analyse thermique différentielle.....	217
IV.8.3. Analyse thermomécanique dynamique (DMTA).....	217
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>219</b>
<b>Chapitre V : Conduite du projet de recherche (nouveau chapitre de la thèse) .....</b>	<b>233</b>
<b>V.1. Présentation du sujet de thèse – Contexte.....</b>	<b>233</b>
V.1.1. Contexte :.....	233
V.1.2. Objectifs :.....	234
<b>V.2. Gestion et évolution du projet.....</b>	<b>235</b>
V.2.1. Les différentes étapes.....	235
V.2.2. Communications.....	236
V.2.3. Enseignement et formations : .....	237
<b>V.3. Mon projet professionnel .....</b>	<b>238</b>



# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Composition chimique du bois de feuillus (Timell, 1967).....	28
Tableau 2 : Composition chimique du bois de résineux (Timell, 1967) .....	28
Tableau 3 : Oligosaccharides acides obtenus par hydrolyse acide du bois de bouleau à partir de 20g (Shimizu et Samuelson, 1973).....	36
Tableau 4 : Oligosaccharides acides obtenus par hydrolyse enzymatique à partir de 20g de bois de bouleau (Shimizu et coll., 1976 ; Ishihara et coll., 1978). .....	36
Tableau 5 : Méthodes de dérivation des monosaccharides. ....	54
Tableau 6 : Composition monosaccharidique des extraits et résidus d'extraction, isolés à partir de sciures de châtaignier.....	83
Tableau 7 : Composition monosaccharidique des extraits et résidus d'extraction, isolés à partir de sciures de chêne. ....	83
Tableau 8 : Composition monosaccharidique des extraits et résidus d'extraction, isolés à partir de sciures d'épicéa.....	84
Tableau 9 : Composition monosaccharidique des extraits et résidus d'extraction, isolés à partir de sciures de Douglas. ....	84
Tableau 10 : Bilan quantitatif de l'extraction.....	85
Tableau 11 : Influence du temps d'hydrolyse et du pH de la solution utilisée sur le dosage des sucres d'un xylane (composition monosaccharidique exprimée en % molaire). ....	87
Tableau 12 : Résultats obtenus pour la réaction de benzylation du méthylglucose. ....	91
Tableau 13 : Compositions monosaccharidiques des résidus d'extractions (définis figure 56 p 124). ....	101
Tableau 14 : Rendements et compositions monosaccharidiques des différents extraits .....	102
Tableau 15 : Rapports molaire (Xyl/4-O-MeGlcA) de quelques glucuronoxylanes extraits de différentes essences forsières.....	103
Tableau 16 : Bandes d'absorption caractéristiques des glucuronoxylanes (Marchessault et Liang, 1962 ; Gupta et coll., 1987 ; Bartolomé et Rupérez, 1995 ; Kacurakova et coll., 1999). ....	104
Tableau 17 : Oligosaccharides identifiés par spectrométrie de masse MALDI dans les fractions acide et neutre obtenues par hydrolyse acide du xylane.....	112
Tableau 18 : Déplacements chimiques des protons des xylo-oligosaccharides des fractions X2, X3 et XG3 (D <sub>2</sub> O). ....	116
Tableau 19 : Déplacements chimiques des carbones des xylo-oligosaccharides des fractions X2, X3 et XG3 (D <sub>2</sub> O).....	117
Tableau 20 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques du xylane (D <sub>2</sub> O). ....	120
Tableau 21 : Rapports molaires Xylose / acide 4-O-méthylglucuronique des différentes fractions extraites déterminés par RMN <sup>1</sup> H.....	121
Tableau 22 : Caractéristiques des hémicelluloses estérifiées. ....	134
Tableau 23 : Tableau de données. ....	141
Tableau 24 : Coefficients de corrélations.....	144
Tableau 25 : Définition des facteurs et des modalités. ....	149
Tableau 26 : Matrice d'expériences et plan d'expérimentation. ....	150

Tableau 27 : Résultats d'essais, réalisés en présence d'un équivalent de DMAP. ....	152
Tableau 28 : Résultats d'essais, réalisés sans DMAP. ....	152
Tableau 29 : Détermination des erreurs expérimentales sur les valeurs de DS et GP, .....	152
Tableau 30 : Utilisation de la grille de dépouillement pour le DS. ....	153
Tableau 31 : Traitements de validation pour la première série d'essais (DMAP). ....	155
Tableau 32 : Traitements de validation pour la seconde série d'essais (sans DMAP). ....	156
Tableau 33 : Plan d'expérimentation et résultats d'essais (en présence de DMAP). ....	158
Tableau 34 : Plan d'expérimentation et résultats d'essais (sans DMAP). ....	158
Tableau 35 : Coefficients associés aux différents modèles. ....	160
Tableau 36 : Comparaison entre les réponses mesurées et les réponses calculées à partir du modèle (en présence de DMAP). ....	161
Tableau 37 : Comparaison entre les réponses mesurées et calculées à partir du modèle (sans DMAP). ....	161
Tableau 38 : Propriétés mécaniques des matériaux. ....	170
Tableau 39 : Caractéristiques mécaniques de différents films de polymères (d'après <a href="http://www.goodfellow.com">http://www.goodfellow.com</a> ). ....	171
Tableau 40 : Propriétés thermiques des matériaux. ....	173
Tableau 41 : Valeurs des angles de torsion et énergies relatives des conformations d'énergie minimale des disaccharides. ....	180
Tableau 42 : Paramètres structuraux et énergétiques des hélices les plus stables. ....	181
Tableau 43 : Densités d'énergie cohésive (CED) et paramètres de solubilité ( $\delta$ ) du xylane et du xylane substitué. ....	186
Tableau 44 : Coefficients de corrélation. ....	212
Tableau 45 : Valeurs propres et vecteurs propres de la matrice de corrélation. ....	213
Tableau 46 : Coefficients de corrélation entre les $CP_k$ et les variables initiales. ....	213
Tableau 47 : Composantes principales. ....	214

# Liste des figures

---

Figure 1 : aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique d'après Sjöström et Westermark (1999). M : lamelle moyenne ; P : paroi primaire ; S1, S2, S3 : paroi secondaire. ....	7
Figure 2 : vue perspective d'une paroi ligneuse, d'après Rolland (1980). ....	7
Figure 3 : Liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires dans la cellulose. ....	9
Figure 4 : Structure des monolignols et des acides hydroxycinnamiques précurseurs. ....	11
Figure 5 : Composés chimiques de la paroi des cellules de bois (exprimés en % massique) et leur distribution d'après Popa (1996). LM : Lamelle Moyenne ; P-I : Paroi primaire ; P-II : Paroi secondaire. ....	13
Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation de la paroi primaire pour les dicotylédones selon Carpita et Gibeaut (1993). ....	15
Figure 7 : Structure de la paroi secondaire (Bidlack et coll., 1992) ....	17
Figure 8 : Exemples de structures de xylanes d'origine végétale, a) arabinoxylane fortement substitué, b) arabinoxylane faiblement substitué, c) 4- <i>O</i> -méthylglucuronoxylane, d) arabino-4- <i>O</i> -méthylglucuronoxylane, e) hétéroxylane (Ebringerova et Heinze, 2000). ....	19
Figure 9 : Répartition des xylanes sur l'arbre phylogénétique du règne végétal d'après Ebringerova et Heinze (2000) ; X : homoxylanes ; Xm : xylanes mixtes ; AX : arabinoxylanes, AGX : arabinoglucuronoxylanes ; GX : glucuronoxylanes ; HX : hétéroxylanes ; → : évolution. ....	22
Figure 10 : Liaison de type ester entre la lignine et un xylane (Takahashi et Koshijima, 1988). ....	25
Figure 11 : Liaison de type éther entre la lignine et un xylane (Watanabe et coll., 1989) ....	25
Figure 12 : Possibilités de liaisons covalentes entre les xylanes et les lignines dans la paroi végétale (d'après Iiyama et coll., 1994). ....	26
Figure 13 : Modèle de structure de lignine de hêtre (Nimz, 1974). ....	29
Figure 14 : Structures hémicellulosiques du bois, a) <i>O</i> -acétyl-4- <i>O</i> -méthylglucuronoxylane (feuillus), b) arabino-4- <i>O</i> -méthylglucuronoxylane (résineux), c) glucomannane (feuillus), d) <i>O</i> -acétylgalactoglucomannane (résineux). ....	30
Figure 15 : modèle structural général du 4- <i>O</i> -méthylglucuronoxylane (GX) de bois de peuplier (d'après Teleman, 2000). ....	32
Figure 16 : Analyse de composition des xylanes par méthylation ; (1) DMSO, NaH ou <i>ter</i> -butylate de potassium, puis MeI ; (2) hydrolyse par le TFA. ....	33
Figure 17 : Dégradation de Smith d'un xylane ; (1) $\text{IO}_4^-$ ; (2) $\text{NaBH}_4$ ; (3) $\text{H}^+$ . ....	34
Figure 18 : <i>O</i> -acétyl-4- <i>O</i> -méthylglucuronoxylane présent dans le bois de peuplier Zinbo et Timell, (1965). ....	34
Figure 19 : Motif terminal des xylanes de feuillus (Shimizu, 1991) ....	36
Figure 20 : Structure partielle d'un arabino-(4- <i>O</i> -méthylglucurono)xylane des bois de résineux (Shimizu, 1991). ....	37
Figure 21 : Séparation des constituants du bois (Baeza et Freer, 2001) ....	39
Figure 22 : Dégradation des unités d'acide uronique en milieu basique (Lai, 2001). ....	41
Figure 23 : Dépolymérisation (peeling) des xylanes en milieu alcalin (adapté de Lai, 2001). ....	41
Figure 24 : Extraction et séparation de xylanes par extractions successives par le DMSO et des solutions alcalines. Les pourcentages font référence à la pureté des xylanes dans les fractions obtenues, et les valeurs entourées indiquent le pourcentage d'extraction de xylanes (adapté de Vuorinen et Alén, 1999). ....	42
Figure 25 : dérivés furfuriques obtenus par déshydratation des pentoses, des hexoses, et des acides uroniques. ...	49

Figure 26 : Exemples de chromogènes utilisés pour les dosages colorimétriques .....	49
Figure 27 : Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide, d'après Timell et <i>coll.</i> , 1965.....	51
Figure 28 : stabilisation du cation formé lors de l'hydrolyse des xylanes.....	52
Figure 29 : Préparation des dérivés TMS ; a) méthanolyse ; b) triméthylsilylation.....	53
Figure 30 : Equilibre mutarotationnel du glucose en solution. ....	55
Figure 31 : Chromatogramme témoin des dérivés TMS des oses neutres et acides uroniques (York et <i>coll.</i> , 1986) .....	57
Figure 32 : analyse structurale des polysaccharides. Préparation des alditols partiellement méthylés partiellement acétylés.....	59
Figure 33 : Hydrolyse enzymatique de GX (d'après Bonnin et <i>coll.</i> , 1997), a : 1,4 $\beta$ D xylane-4-xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8 ; b : 1,4 $\beta$ D xylane-4-xylohydrolase, E.C. 3.2.1.37 ; c : xylane $\alpha$ D 1,2 glucuronohydrolase, E.C. 3.2.1.31 ; d : acétyl-estérase (E.C. 3.2.1.6). ....	61
Figure 34 : Principe de l'analyse d'un polysaccharide à partir de l'étude des oligosaccharides libérés après hydrolyse partielle du polysaccharide (Vuorinen et Alèn, 1999).....	62
Figure 35 : Mécanisme de l'hydrolyse acide des glucopyranosides (Timell, 1964). ....	63
Figure 36 : Catalyse intramoléculaire de l'hydrolyse acide de la liaison glycosidique précédant l'acide uronique dans la chaîne polysaccharidique par le groupement carboxylique (Ciancia et Cerezo, 1993).....	64
Figure 37 : Représentation des corrélations $^3J_{H,C}$ (en rouge) proton-carbone observées à partir du proton H1 dans un spectre HMBC . La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison glycosidique. ....	66
Figure 38 : Principe de la technique MALDI.....	68
Figure 39 : Hydrolyse des xylanes et exemples d'applications industrielles (d'après Popa, 1996).....	73
Figure 40 : Dérivés chimiques des xylanes (d'après Ebringerova et Hromadkova, 1999).....	74
Figure 41 : Structures d'esters de cellulose commercialisés en tant que thermoplastiques. ....	77
Figure 42 : Protocole d'extraction sélective et séquentielle des polysaccharides pariétaux adapté de Bailey (1966) et Carpita (1984). ....	80
Figure 43 : Traitement des différents extraits. ....	81
Figure 44 : Préparation de l'acide 4- <i>O</i> -méthylglucuronique à partir de l'acide aldobiuronique.....	88
Figure 45 : Stratégie de synthèse de l'acide 4- <i>O</i> -méthylglucuronique.....	89
Figure 46 : Benzoylation sélective du méthylglucose.....	90
Figure 47 : Méthylation du méthyl-2,3,6- <i>O</i> -tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside .....	92
Figure 48 : Débenzoylation du méthyl-4- <i>O</i> -méthyl-2,3,6- <i>O</i> -tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside.....	92
Figure 49 : Exemples de radicaux nitroxyles organiques.....	93
Figure 50 : Formation de l'hypobromite par réaction d'oxydo-réduction.....	94
Figure 51 : Mécanisme d'oxydation des alcools primaires. ....	94
Figure 52 : Oxydation sélective du méthyl-4- <i>O</i> -méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside.....	95
Figure 53 : Spectre de masse (EI) de l'acide méthyl 4- <i>O</i> -méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosiduronique. ....	96
Figure 54 : Représentation des principales fragmentations observées sur le spectre de masse (EI) de l'acide méthyl-4- <i>O</i> -méthylglucuronique (X = COOTMSi). ....	97
Figure 55 : Chromatogramme du produit <b>4</b> après méthanolyse et triméthylsilylation (voir les conditions en partie expérimentale).....	98
Figure 56 : Protocoles d'extraction des xylanes à partir de sciures de châtaignier ; protocole I : imprégnation, extraction ; protocole II : extraction directe ; protocole III : délignification, imprégnation, extraction ; protocole IV : délignification, extraction. ....	100
Figure 57 : Spectres IR des extraits Ia (protocole sans délignification) et IIIa (protocole avec délignification). 104	



Figure 58 : Spectres IR des résidus après différentes étapes d'extraction.....	105
Figure 59 : profils obtenus par chromatographie d'exclusion stérique ; a) Extraits obtenus par les protocoles I et II sans délignification ; b) Extraits obtenus par les protocoles III et IV avec délignification. ....	107
Figure 60 : Suivi de l'élution par CCM des xylo-oligosaccharides issus de l'hydrolyse enzymatique du xylane ; témoin : acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose (de bas en haut), éluant : Butanol/acide acétique/eau 2:1:1, révélation à l'orcinol sulfurique.....	110
Figure 61 : Spectre de masse MALDI des xylo-oligosaccharides issus de l'hydrolyse enzymatique du xylane ; X = xylose ; <sup>4</sup> GA = acide 4-O-méthylglucuronique.....	110
Figure 62 : Suivi de l'élution par CCM des xylo-oligosaccharides issus de l'hydrolyse acide du xylane ; témoin : acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose (de bas en haut), éluant : Butanol/acide acétique/eau 2:1:1, révélation à l'orcinol sulfurique. ....	111
Figure 63 : Séparation de la fraction oligosaccharidique neutre sur colonne de Biogel P4, éluee par une solution de NaCl 50 mM ; témoin : acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose (de bas en haut), éluant : Butanol/acide acétique/eau 2:1:1, révélation à l'orcinol sulfurique. ....	113
Figure 64 : Séparation de la fraction oligosaccharidique acide sur colonne de Biogel P4, éluee par une solution de NaCl 50 mM ; témoin : acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose (de bas en haut), éluant : Butanol/acide acétique/eau 2:1:1, révélation à l'orcinol sulfurique. ....	113
Figure 65 : Spectre de masse MALDI des xylo-oligosaccharides issus de l'autohydrolyse du xylane ; X <sub>n</sub> G = oligosaccharides acides (xylose/acide 4-O-méthylglucuronique) de type [M+Na] <sup>+</sup> et [M-H+2Na] <sup>+</sup> .....	113
Figure 66 : Oligosaccharides purifiés issus de l'hydrolyse acide du xylane ; X <sub>n</sub> G = oligosaccharides acides ; X <sub>n</sub> = oligosaccharides neutres ; T = oligosaccharides témoins (acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose). ...	114
Figure 67 : Structures du xylobiose (X <sub>2</sub> ) et du xylotriose (X <sub>3</sub> ). ....	115
Figure 68 : Structure de l'acide 2'-O-(4-O-méthyl-α-D-glucurono)xylobiose (X <sub>2</sub> G). ....	115
Figure 69 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du 4-O-méthylglucuronoxylane commercial dans D <sub>2</sub> O, mettant en évidence les signaux attribués aux protons des xyloses internes non substitués, des xyloses substitués par l'acide 4-O-méthylglucuronique, et des unités d'acide 4-O-méthylglucuronique.....	119
Figure 70 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du 4-O-méthylglucuronoxylane commercial dans D <sub>2</sub> O ; seules les attributions correspondant aux carbones des unités de xylose non substituées sont indiquées. ....	119
Figure 71 : Modèle structural du xylane de châtaignier.....	122
Figure 72 : Interactions entre la cellulose et le système de solvant DMA / LiCl (Tosh et coll., 2000).....	126
Figure 73 : Synthèses d'esters cellulosiques à chaînes grasses (Edgar et coll., 2001). ....	127
Figure 74 : Estérification d'un xylane par le chlorure d'acide laurique. ....	129
Figure 75 : Rôle du DMAP dans le mécanisme de la réaction d'estérification.....	129
Figure 76 : Structures caractéristiques a) d'un glucuronoxylane de feuillus (Teleman et coll., 2002), b) d'un hétéroxylane de son de maïs (adapté de Saulnier et coll., 1995) ; c) d'un mannane extrait de levure (adapté de Vinogradov et coll., 1998). ....	130
Figure 77 : Photographie d'un film de xylane estérifié par l'acide laurique. ....	131
Figure 78 : Spectres IR d'un xylane natif et d'un xylane après acylation par l'acide laurique. ....	132
Figure 79 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du xylane estérifié mettant en évidence la présence des chaînes grasses. ....	133
Figure 80 : Influence de la variation de la durée de réaction sur le gain de poids (GP) et le degré de substitution (DS).....	137
Figure 81 : Influence de la variation de la température de réaction sur le gain de poids (GP) et le degré de substitution (DS). ....	138
Figure 82 : Influence de la variation de la température de réaction sur le gain de poids (GP) et le degré de substitution (DS) ; a) en présence de DMAP, b) sans DMAP.....	139
Figure 83 : Projection des variables dans les plans factoriels (1,2) et (1,3). ....	145
Figure 84 : Projection des variables dans le plan factoriel (2,3). ....	146

Figure 85 : Projection des individus dans le plan factoriel (1,2) et (1,3). .....	146
Figure 86 : Disposition des essais définis à partir d'un carré latin dans le domaine expérimental. ....	150
Figure 87 : Illustration de la stratégie consistant à ne faire varier qu'une variable à la fois. ....	151
Figure 88 : Tracé des effets moyens des facteurs pour le DS moyen.....	154
Figure 89 : Tracé des effets moyens des facteurs pour le GP moyen.....	154
Figure 90 : adéquation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées des réponses ( <b>en présence de DMAP</b> ). .....	162
Figure 91 : adéquation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées des réponses ( <b>sans DMAP</b> ).....	162
Figure 92 : Surfaces de réponse représentant le DS et le gain de poids en fonction de la température et du temps de réaction, la quantité de RCOCl restant fixée à 2 équivalents. ....	164
Figure 93 : Courbes d'isoreponses représentant le DS et le gain de poids en fonction de la température et du temps de réaction, la quantité de RCOCl restant fixée à 2 équivalents.....	164
Figure 94 : Surfaces de réponse représentant le DS en fonction de la quantité de RCOCl et de la température de la réaction pour un temps de réaction de 15 min, a) en présence de DMAP, b) sans DMAP. ....	165
Figure 95 : Surfaces de réponse représentant le GP (sans DMAP) en fixant le temps, puis la température. ....	166
Figure 96 : Isocontours représentant le DS (sans DMAP) en fonction de la quantité de RCOCl et du temps. ...	167
Figure 97 : Courbe contrainte / déformation pour l'ester de xylane de DS = 1,86.....	169
Figure 98 : Thermogramme mettant en évidence la dégradation du matériau, et la perte de masse associée (plastique de DS = 1,3). ....	173
Figure 99 : Spectre mécanique d'un ester de xylane de DS = 1,86 (à 1Hz).....	175
Figure 100 : Schéma du xylobiose avec ses angles de torsion. ....	178
Figure 101 : Cartes d'énergie conformationnelle relaxées du xylobiose (à gauche) et du xylobiose substitué (à droite). Les différents contours correspondent à des énergies comprises entre 1 et 10 kcal.mol <sup>-1</sup> et sont séparés par 1 kcal.mol <sup>-1</sup> (en énergie relative). ....	179
Figure 102 : Représentation des trois conformations les plus stables du xylobiose (à gauche) et du xylobiose 2,3- substitué (à droite).....	180
Figure 103 : Hélices 2 <sub>1</sub> et 3 <sub>1</sub> du xylane natif et du xylane substitué. ....	182
Figure 104 : Représentation des conditions aux limites périodiques. ....	183
Figure 105 : Représentation schématique de la convention d'image minimale. L'interaction entre deux atomes A et B, présents au sein de la cellule principale, ne sera pas prise en compte si la distance entre ces deux atomes est supérieure à la distance entre A et B', B' étant l'image de B dans une autre cellule. ....	184
Figure 106 : Cellules modélisant les solides amorphes du xylane natif (à gauche) et du xylane substitué par les chaînes grasses (à droite). ....	185
Figure 107 : Décroissance des valeurs propres. ....	213

# Liste des abréviations

---

4-*O*-MeGlcA : acide 4-*O*-méthylglucuronique  
AGX : arabinoglucuronoxylane  
Ara : arabinose  
AX : arabinoxylane  
BSTFA : N,O-Bis-Triméthylsilyltrifluoroacétamide  
CA : acétate de cellulose  
CAB : ester mixte acétate butyrate  
CAP : ester mixte acétate propionate  
CPG : chromatographie en phase gaz  
CPG-SM : analyse par couplage CPG- spectroscopie de masse  
DMA : N,N- diméthylacétamide  
DMAP : 4-diméthylaminopyridine  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DO : densité optique  
DP : degré de polymérisation  
DS : degré de substitution  
EDTA : éthylène diamine tétraacétate  
*f* : furanose  
Fuc : fucose  
Gal : galactose  
GalA : acide galacturonique  
GAX : glucurono(arabino)xylane  
Glc : glucose  
GlcA : acide glucuronique  
GX : glucuronoxylane  
HX : hétéroxylane  
IR : infrarouge  
Man : mannose  
*p* : pyranose  
Rha : rhamnose  
RMN <sup>1</sup>H : résonance magnétique nucléaire du proton  
TEMPO : 2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-oxyle  
*T<sub>f</sub>* : température de fusion  
TFA : acide trifluoroacétique  
*T<sub>g</sub>* : température de transition vitreuse  
TMCS : chlorure de triméthylsilane

TMS : triméthylsilylation

wis-AX : water-insoluble arabinoxylan

ws-AX : water-soluble arabinoxylan

X : homoxylyanes

Xm : homoxylyanes mixtes

Xyl : xylose

# Introduction générale



# Introduction générale

---

Bâtie sur l'exploitation des ressources fossiles faciles à extraire peu coûteuses et apparemment inépuisables, notre civilisation industrielle n'est plus en mesure de répondre aujourd'hui à l'ampleur de nos besoins sans cesse croissants, en matière d'énergie, de matériaux, de transports, etc... Le pétrole constitue la première source d'énergie et nous en consommons actuellement quatre milliards de tonnes par an. La raréfaction des ressources pétrolières amène à exploiter des gisements de plus en plus profonds, avec des conditions d'extraction plus lourdes et plus coûteuses. Le baril de pétrole a dépassé les 50 dollars au cours de cette année. C'est une des raisons pour lesquelles, après avoir connu l'ère du jetable puis du recyclable, notre société se tourne à peu à peu vers le renouvelable.

Orienter l'industrie vers l'utilisation des matières premières végétales renouvelables constitue un enjeu majeur. Les ressources renouvelables offrent de nouvelles stratégies énergétiques, apportent des solutions originales face aux risques écologiques en permettant de diminuer l'effet de serre et la pollution. Elles laissent envisager de nouveaux débouchés pour la filière agricole en développant les biocarburants par exemple, qui constituent de nouvelles voies d'utilisation non-alimentaire de la production agricole. En ce qui concerne la chimie des substances renouvelables, certains secteurs tels que les solvants, les lubrifiants, les tensio-actifs et les biopolymères ont déjà fait l'objet de nombreux travaux. Ainsi, l'« alternative végétale » s'intègre petit à petit dans les réflexions, visant à une harmonie entre l'homme, l'économie et l'environnement.

Cependant l'activité agricole, et plus particulièrement la filière bois, génère des quantités considérables de déchets ou produits connexes. Ces sous-produits, tels que les écorces et les sciures notamment, proviennent de la transformation du bois. Il semble qu'à l'heure actuelle, moins de 10% de ces coproduits soient valorisés, notamment dans le secteur de l'énergie en tant que combustible ou dans le secteur du bois-matériau pour la production de plaquettes, de pâte à papier, de compost, de panneaux de particules...

C'est dans ce contexte que depuis quelques années, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles s'intéresse à de nouvelles pistes de valorisation de la biomasse

forestière. Une idée originale consiste à modifier chimiquement la fraction polysaccharidique qu'elle renferme, cellulose et hémicelluloses, pour obtenir des matériaux thermoplastiques. La production de plastiques biodégradables à partir de matériaux d'origine naturelle constituerait une alternative intéressante aux plastiques dérivés de l'industrie pétrochimique.

Plusieurs matières plastiques biodégradables ont déjà connu un développement industriel :

- i) La plupart des matières plastiques biodégradables commerciales sont basées sur des associations de polymères d'origine végétale et fossile, formant ainsi des matériaux composites. On associe ainsi un polymère traditionnel d'origine pétrochimique, tel que le polyéthylène avec un composé naturel biodégradable comme l'amidon.
- ii) Une deuxième catégorie concerne les matériaux obtenus par synthèse chimique, tels que le polycaprolactone (PCL) ou les alcools polyvinyliques (PVA). Certains de ces polymères synthétiques sont produits par polymérisation à partir de monomères naturels ou identiques aux naturels, le plus connu étant l'acide polylactique (PLA) provenant de la polymérisation de molécules d'acide lactique.
- iii) Les polymères d'origine bactérienne sont issus de processus de fermentation par les bactéries. C'est le cas des PHA (polyhydroxyalcanoates), élaborés par fermentation des sucres du maïs. La synthèse de ces polymères peut également être réalisée dans la plante grâce à une modification génétique, on parle alors de polymères bio-synthétiques.

Bien que leurs performances soient souvent plus limitées que celles des polymères traditionnels, les polymères biodégradables commencent à pénétrer avec succès certains marchés de niche, voire de masse, tels que l'emballage ménager et la restauration (assiettes et couverts jetables, barquettes d'emballage, films alimentaires,...), les films de paillage agricole et autres produits pour l'agriculture, l'horticulture, les produits de calage sous forme de chips destinés à l'absorption des chocs, les sacs poubelles,...



Dans le cadre de ses sujets liés à la valorisation non-alimentaire de la biomasse agricole (son de maïs, paille) ou forestière (sciures, écorces), le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles développe des stratégies de modification de la fraction polysaccharidique qu'elle renferme. Différents travaux mettent en évidence que la cellulose du bois peut être transformée avec succès en matériau plastique hydrophobe avec une biodégradabilité significative. Si la fraction cellulosique trouve déjà un grand nombre d'applications y compris à une échelle industrielle, les hémicelluloses sont quant à elles peu exploitées et ce, malgré leur grande richesse structurale. L'objectif de notre travail est donc de proposer un procédé de transformation des xylanes de bois, dans le but d'obtenir une nouvelle famille de matériaux plastiques. Une telle application nécessite au préalable la définition de la nature chimique puis de la structure des hémicelluloses en question. En prenant appui sur les travaux préliminaires effectués au laboratoire sur la cellulose, nous avons alors envisagé la transformation des xylanes par voie chimique. Une telle approche requiert une parfaite compréhension des mécanismes chimiques et des conditions opératoires qui régissent le procédé de transformation. Elle peut être définie et validée au travers de la mise en œuvre de la méthodologie du plan d'expériences. Enfin, l'étude de l'architecture tridimensionnelle des molécules transformées doit expliquer le comportement plastique mesuré lors de l'étude des propriétés mécaniques et thermiques.



# Chapitre I

## Travaux antérieurs



# Chapitre I : Travaux antérieurs

La cellulose et les hémicelluloses sont les polysaccharides majeurs de la paroi des cellules du bois. Si la cellulose est connue depuis longtemps tant du point de vue structural que pour ses voies de valorisation, les hémicelluloses ont quant à elles des structures plus complexes et restent à l'heure actuelle peu exploitées. L'hémicellulose que nous cherchons à extraire et valoriser dans ce travail est un 4-*O*-méthylglucuronoxylane. Localisé dans la paroi des cellules végétales, il participe à son organisation architecturale. C'est pourquoi il est nécessaire de définir la structure morphologique et la composition chimique de la paroi végétale de manière générale.

## I.1. Structure de la paroi cellulaire végétale

La paroi des cellules végétales est considérée aujourd'hui comme un organite à part entière, de structure complexe variant en fonction des espèces, de l'âge et des tissus. Elle est composée de polymères dont la structure et *a fortiori* les voies de biosynthèse sont parmi les plus complexes connues dans la nature. De par sa position, la paroi fait le lien entre le milieu extérieur et le plasmalemme. C'est une structure rigide microfibrillaire enrobée d'une matrice hydrosoluble et gélifiante. Différents niveaux d'organisation vont lui conférer son aspect dynamique et rigide. En effet, elle doit être « *modelable* » au rythme de la croissance chez les cellules jeunes, tout en restant « *ferme* » afin d'assurer son rôle de barrière protectrice et permettre la cohésion des cellules. Elle doit s'opposer aux chocs osmotiques, à la dessiccation, aux rayons ultraviolets tout en permettant les échanges intercellulaires et le passage des substances nécessaires au métabolisme cellulaire. Ces exigences à la fois antagonistes et complémentaires, sont à l'origine de la complexité de la paroi cellulaire végétale.

Du point de vue anatomique (figure 1 et 2), certaines caractéristiques permettent de définir un modèle général de la paroi cellulaire végétale, se décomposant en trois zones distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule :

- *La lamelle moyenne*, partie commune située entre deux cellules voisines dont le rôle est d'assurer la cohésion entre les cellules. Son épaisseur varie de 0,2 à 1  $\mu\text{m}$ . Cette paroi, dépourvue de cellulose, est riche en pectines.

- *La paroi primaire*, plus mince (0,1-0,2  $\mu\text{m}$ ), constitue la seule enveloppe fibrillaire des cellules en croissance et montre donc une grande plasticité. Elle présente une structure biphasique, où les microfibrilles de cellulose sont dispersées dans une matrice amorphe fortement hydratée composée de substances pectiques, d'hémicelluloses et de protéines.

- *La paroi secondaire*, très épaisse (1 à 5  $\mu\text{m}$ ) est ajoutée à la paroi primaire lorsque la cellule a cessé de croître. Elle est constituée d'un réseau fibrillaire de cellulose cristalline et d'hémicelluloses. En fonction de l'orientation des fibrilles de cellulose, trois régions distinctes sont définies (S1, S2 et S3). Ces fibrilles de cellulose ont une orientation déterminée qui change rythmiquement et varie d'une strate à l'autre.

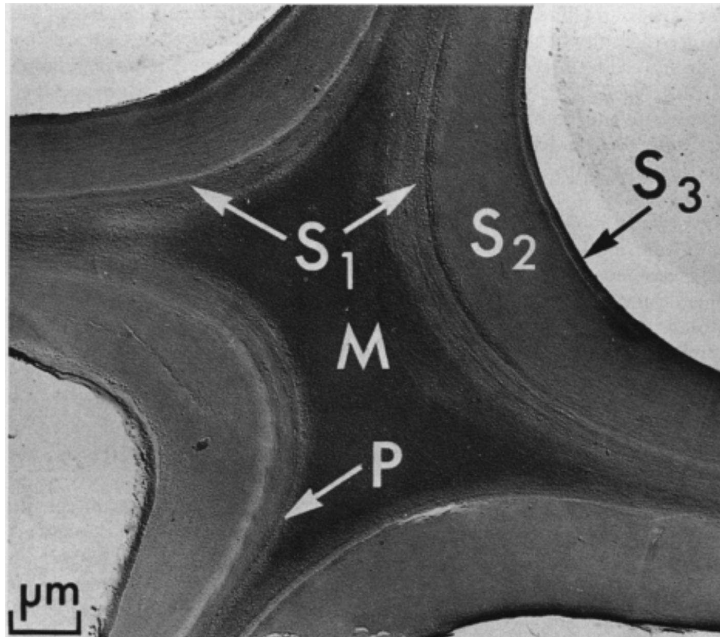


Figure 1 : aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique d'après Sjöström et Westermark (1999). M : lamelle moyenne ; P : paroi primaire ; S1, S2, S3 : paroi secondaire.

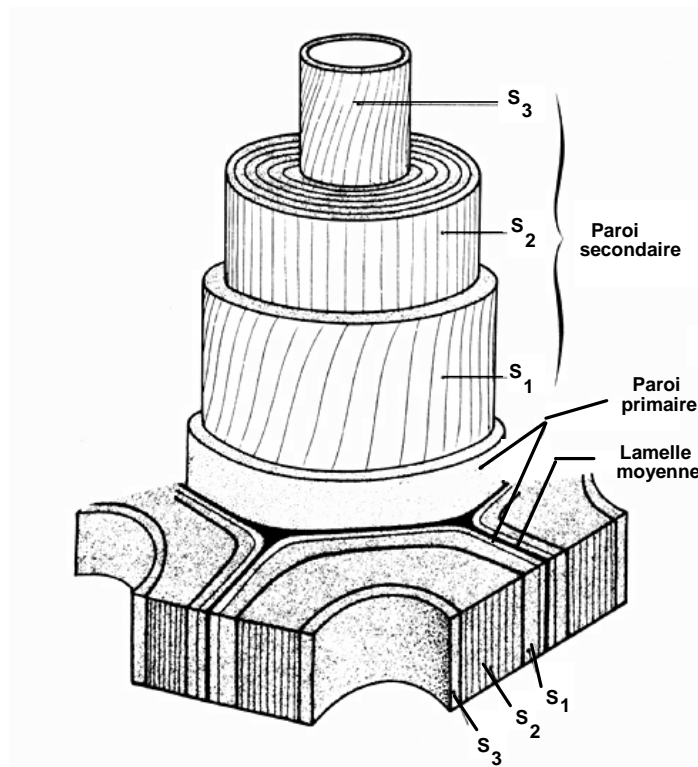


Figure 2 : vue perspective d'une paroi ligneuse, d'après Rolland (1980).

En fin de croissance cellulaire, l'ensemble de la paroi (notamment au niveau des tissus conducteurs tels que les vaisseaux du xylème ou des tissus de soutien tel que le sclérenchyme) va s'imprégner d'un polyphénol, la lignine, la faisant ainsi évoluer d'une structure plastique et élastique à une structure rigide non déformable.

### **I.1.1. Les principaux constituants de la paroi végétale**

La paroi est principalement composée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine, et dans une moindre proportion de pectines et de protéines.

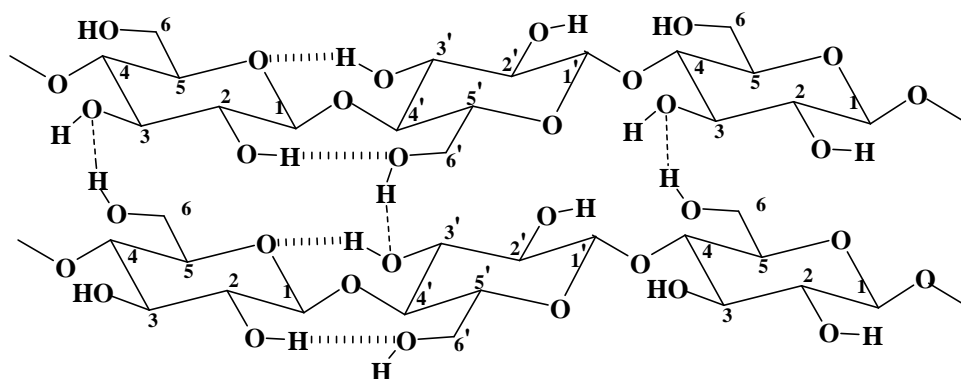
#### ***I.1.1.a. La cellulose***

Directement issue de la photosynthèse, la cellulose est la molécule organique la plus abondante sur Terre ainsi que le matériau le plus important de la paroi des cellules végétales. La quantité de cellulose biosynthétisée par les plantes terrestres est estimée à 100 milliards de tonnes par an, constituant à elle seule 50% de la masse végétale (Robert et Roland, 1998). La molécule de cellulose est un homopolymère linéaire formé par un enchaînement d'unités cellobiose, motif composé de deux D-glucopyranose en conformation  ${}^1C_4$  liés par une liaison glucosidique  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Le degré de polymérisation (DP) qui représente le nombre d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose est compris entre quelques centaines et plusieurs milliers selon sa provenance et sa situation au sein de la paroi cellulaire. La disposition des hydroxyle libres des glucose permet l'établissement de liaisons hydrogène intra-chaînes, stabilisant la molécule dans son orientation linéaire ce qui lui confère une certaine rigidité, et de liaisons inter-chaînes qui relient plusieurs molécules de cellulose et les maintiennent disposées parallèlement (figure 3). Ainsi, l'association de nombreuses molécules de cellulose permet la formation de micro-fibrilles, qui elles-mêmes s'assemblent en fibres et favorisent l'établissement d'un état solide ordonné, cristallin. La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance aux attaques chimiques et enzymatiques, sa grande résistance mécanique à la traction, ainsi que son caractère non-soluble dans l'eau. La fraction cellulosique est considérée comme étant le résidu insoluble après l'extraction des autres polysaccharides de la paroi par des agents chélateurs et des bases minérales.

La cellulose est peu soluble dans les solvants organiques usuels du fait de son fort degré de cristallinité. Elle peut cependant être solubilisée dans divers systèmes comme les



complexes métal/amine (solutions d'hydroxyde de cuprammonium ou cupriéthylènediamine, les oxydes d'amines tertiaires cycliques (N-méthylmorpholine-N-oxyde ou MMNO, Johnson, 1969) ; plus récemment, la cellulose a été solubilisée dans le système chlorure de lithium /



N,N-diméthylacétamide (McCormick, 1981).

Figure 3 : Liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires dans la cellulose.

### ***1.1.1.b. Les hémicelluloses***

Les hémicelluloses représentent, après la cellulose, le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Contrairement à la cellulose, elles ne peuvent pas être décrites de façon succincte du fait de leur importante diversité. De plus leur structure dépend de leur origine variétale, du tissu ou du type cellulaire, de l'âge des cellules et de leur localisation dans la paroi végétale. Elles diffèrent de la cellulose de par l'hétérogénéité de leur composition monosaccharidique. En général elles sont constituées de chaînes moléculaires plus courtes avec un degré de polymérisation souvent inférieur à 200. A l'origine, les hémicelluloses désignent des polysaccharides pariétaux alcalinosolubles ; cependant certains polysaccharides, tels que les arabinanes et les arabinogalactanes sont extraits par l'eau. Donc, par extension, les hémicelluloses regroupent tous les polysaccharides qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques, présents dans les parois cellulaires végétales.

A la linéarité et à la monotonie de constitution de la cellulose, s'opposent les multiples façons selon lesquelles s'associent les unités glucidiques dans les hémicelluloses. Elles sont formées d'une chaîne de monosaccharides liés par des liaisons glycosidiques résultant de la condensation d'un hydroxyle hémiacétalique d'un ose avec un hydroxyle alcoolique d'un autre. Cet enchaînement peut être constitué d'un seul type de monomère

(homopolysaccharide) ou de plusieurs types différents (hétéropolysaccharide). Par hydrolyse acide ou enzymatique, les hémicelluloses libèrent des hexoses (glucose, mannose, galactose), des pentoses (xylose, arabinose), des désoxyhexoses (fucose et rhamnose) et des acides uroniques (acide glucuronique et son dérivé 4-*O*-méthyle, acide galacturonique). Les liaisons qui unissent ces motifs sont elles-mêmes variées. Les hémicelluloses sont constituées par un axe osidique principal, le suffixe *-ane* désignant la nature de cet axe ; par exemple, les xyloglucanes sont construits à partir d'une chaîne de glucose, substitué par des unités xylose. Cette chaîne principale peut être ramifiée par des chaînes latérales, qui empêchent le rapprochement des chaînes et donc l'arrangement cristallin.

#### ***1.1.1.c. Les pectines***

Ce sont les constituants essentiels de la lamelle moyenne à la base du « ciment » qui réunit les cellules entre elles. La structure principale des pectines est formée de chaînes faiblement polymérisées d'acides galacturoniques liés en  $\alpha$ -(1→4), appelé acide polygalacturonique, sur lesquelles s'insèrent des résidus de L-rhamnose. Chaque unité rhamnose introduit dans la chaîne un coude et confère donc à l'ensemble une configuration en zig-zag. Des chaînes latérales de natures diverses, arabinanes, galactanes et arabinogalactanes sont aussi greffées sur le squelette rhamnogalacturonique, d'où la grande diversité de ces polymères. Les fonctions acides sont souvent estérifiées par des groupements méthyles ou salifiées par des ions monovalents ou divalents tels que  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ .

La solubilité des substances pectiques dépend de leur masse moléculaire, de la présence de chaînes latérales, mais aussi et surtout du degré de méthylestérification et de la distribution de ces groupements méthyles. Les pectines sont classées suivant leur mode d'extraction, soit à l'eau chaude pour les pectines hautement méthylestérifiées, par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d'ammonium) pour les pectines faiblement méthylestérifiées et à l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique).

#### ***1.1.1.d. Les lignines***

Les lignines sont des polyphénols, macromolécules tridimensionnelles hydrophobes de haut poids moléculaire. Leur structure résulte de la copolymérisation de trois monomères aromatiques de type phénylpropène : l'alcool coumarylique, l'alcool

coniférylique et l'alcool sinapylique, que l'on désigne sous le terme général de monolignols (figure 4) ; leurs précurseurs, les acides hydroxycinnamiques (ou alcools phénylpropénoïques), sont produits au niveau du réticulum endoplasmique des cellules en voie de lignification, à partir de la phénylalanine, désaminée en cinnamate, hydroxylée, méthylée et réduite en alcool au niveau de la fonction carboxyle. Au niveau de la paroi cellulaire, les monolignols sont oxydés en radicaux libres sous l'influence d'enzymes (laccases et peroxydases) ; ces radicaux polymérisent, plus ou moins au hasard et sans intervention enzymatique, ce qui explique la variabilité importante dans la structure des lignines. Cette polymérisation *in situ* s'accompagne de la formation de liaisons covalentes avec les glycanes de la paroi. A la fin du développement cellulaire la lignine incruste ainsi la cellulose et les hémicelluloses, ce qui assure la rigidité de la paroi, mais pose des problèmes lors de l'extraction des hémicelluloses.

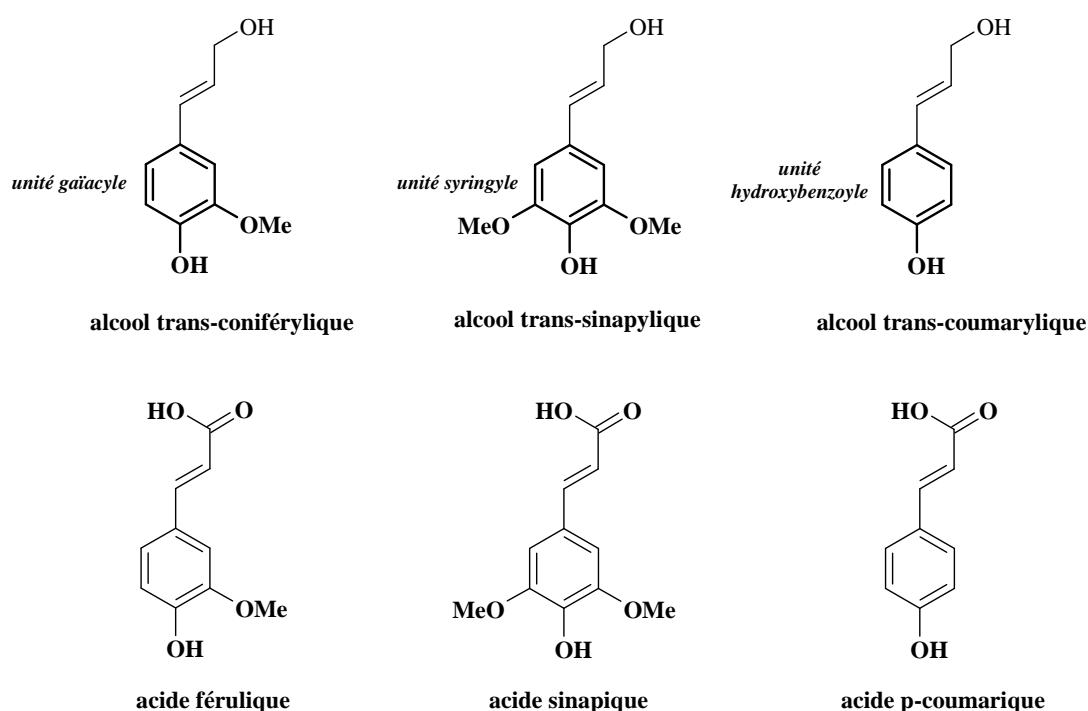


Figure 4 : Structure des monolignols et des acides hydroxycinnamiques précurseurs.

La proportion des trois monomères et les liaisons intramoléculeaires sont très variables, dépendantes de l'origine botanique, du tissu et de la localisation dans la paroi.

Les lignines sont difficilement dégradées, très résistantes à de nombreux agents chimiques et biochimiques ; seules certaines bactéries et champignons, comme les Polyphores, sont capables d'assurer la lignolyse. Elles sont très réactives, parce qu'elles contiennent entre autres des fonctions phénoliques et hydroxyles, et sont insolubles dans les solvants du fait qu'elles constituent un réseau infini. Pour caractériser les lignines, des méthodes de dégradation douces ont été mises au point, qui permettent de dépolymériser le réseau tridimensionnel du polymère sans dégrader ni les noyaux aromatiques, ni la chaîne propane. Cependant, du fait des opérations d'extraction, les lignines isolées (lignines d'extraction) sont différentes des lignines in situ (protolignines). Le terme de « klason lignine » est parfois employé et correspond au résidu après avoir débarrassé la paroi des extractibles hydrophiles et lipophiles, et des polysaccharides par de l'acide sulfurique fort.

#### ***1.1.1.e. Autres constituants***

Les substrats lignocellulosiques renferment également des lipides, des protéines ainsi que des substances de faible poids moléculaire, tels que les extraits et minéraux, spécifiques à chaque essence. La paroi contient généralement entre 3 et 6% de protéines, souvent sous forme de glycoprotéines, dont les extensines. Les autres sont des enzymes telles que la peroxydase ou diverses glycosidases.

Les extraits correspondent à l'ensemble des constituants du bois et de l'écorce qui peuvent être extraits par l'eau ou certains solvants organiques. Les substances hydrosolubles, extractibles par l'eau ou les solvants organiques polaires sont essentiellement les composés aromatiques et phénoliques comme les tanins, les flavonoïdes, ainsi que des petites molécules tel que des sucres circulants. Les graisses, les cires et les terpènes constituent les principales substances extractibles par les solvants apolaires.

#### **I.1.2. Modèles pariétaux**

Il existe une relation directe entre la conformation d'un polysaccharide et sa fonction à l'intérieur de la paroi. En effet, ces polymères jouent le rôle de matériaux de construction dans la consolidation de la paroi végétale. Ainsi la cellulose constitue l'armature de la paroi de par sa conformation rigide, alors que les hémicelluloses, matériau tampon, assurent une certaine flexibilité qui permet la croissance de la cellule ; enfin la lignine cimente l'édifice. Ces

différentes macromolécules forment un réseau tridimensionnel dont la cohésion est assurée aussi bien par des liaisons de faible énergie, comme les liaisons de Van der Waals et des liaisons hydrogène, que par des liaisons ioniques et covalentes.

La proportion des trois grandes catégories de molécules (cellulose, hémicelluloses et lignine) est fonction de la localisation dans la paroi cellulaire végétale (figure 5).

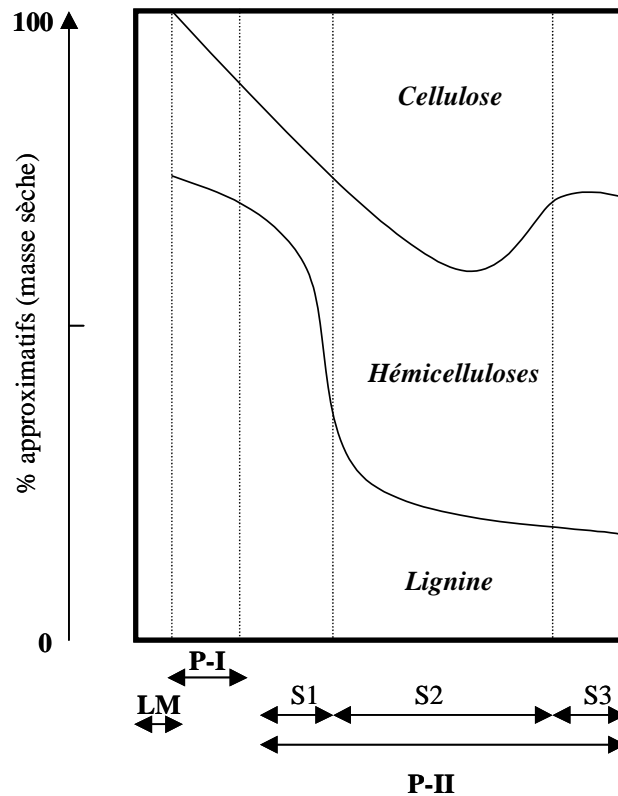


Figure 5 : Composés chimiques de la paroi des cellules de bois (exprimés en % massique) et leur distribution d'après Popa (1996). LM : Lamelle Moyenne ; P-I : Paroi primaire ; P-II : Paroi secondaire.

Même s'il est impossible de décrire de manière unique la composition et la constitution d'une paroi cellulaire, quelques généralités peuvent être énoncées. Plusieurs hypothèses concernant l'agencement de ces différentes macromolécules au sein de la paroi ont été avancées, susceptibles d'expliquer les propriétés physiques des parois telles que la résistance et l'extensibilité.

En ce qui concerne les parois primaires, Albersheim et *coll.* (1973) ont montré qu'elles présentent une grande similitude dans leur composition polysaccharidique, même lorsqu'elles proviennent de différentes variétés botaniques. Les travaux de Carpita et Gibeaut (1993) ont

conduit à l'élaboration d'un modèle de la paroi primaire des dicotylédones (figure 6). Ce modèle tient compte des contraintes physiques liées à l'extension de la paroi. Trois domaines indépendants, mais qui interagissent entre eux, y sont présents : le premier est le domaine de base formé par le réseau cellulose-hémicelluloses et qui représente environ 50% en masse de la paroi ; il est entouré par une matrice de polysaccharides pectiques qui constitue le deuxième domaine (environ 30% en masse), les connexions qui existent entre les polysaccharides des deux domaines pouvant ne pas être de nature covalente. Enfin, le troisième domaine indépendant est composé des protéines de structure au sein duquel l'extensine pourrait former des ponts intermoléculaires avec d'autres protéines sans obligatoirement se lier aux macromolécules polysaccharidiques.

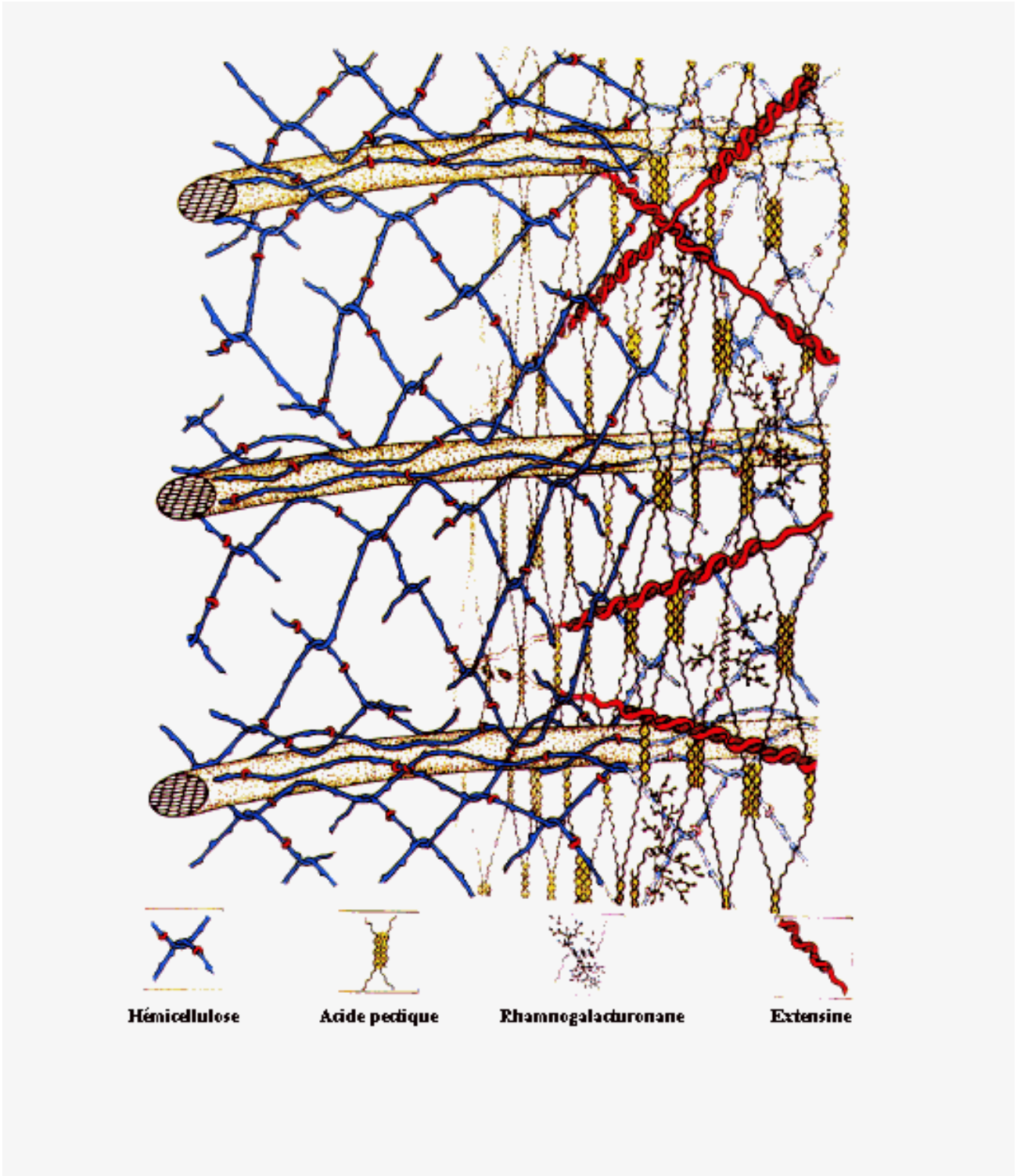


Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation de la paroi primaire pour les dicotylédones selon Carpita et Gibeaut (1993).

Par contre, la composition des parois secondaires diffère considérablement d'un type cellulaire à l'autre, contenant 40 à 80% de cellulose, 10 à 40% d'hémicelluloses et 5 à 25% de lignine. Les polymères de lignine des parois primaires n'ont pas la même composition, ni la même structure que la lignine des parois secondaires. Les lignines des parois primaires sont fortement branchées et associées physiquement de façon plus proche aux polysaccharides que les lignines des parois secondaires linéaires et à structure ouverte (Jung et Deetz, 1993). Une représentation de l'arrangement moléculaire et des liaisons dans la paroi secondaire des graminées (figure 7) est proposée par Bildlack et *coll.* (1992).

La vision la plus juste de la paroi cellulaire végétale doit donc être celle d'un complexe multi-moléculaire formé par un réseau tri-dimensionnel de macromolécules essentiellement polysaccharidiques (cellulose, hémicelluloses et pectines) qui sont intimement associées. La composition chimique et l'organisation de la paroi cellulaire végétale sont à l'origine des protocoles d'extraction spécifiques des macromolécules qu'elle contient.



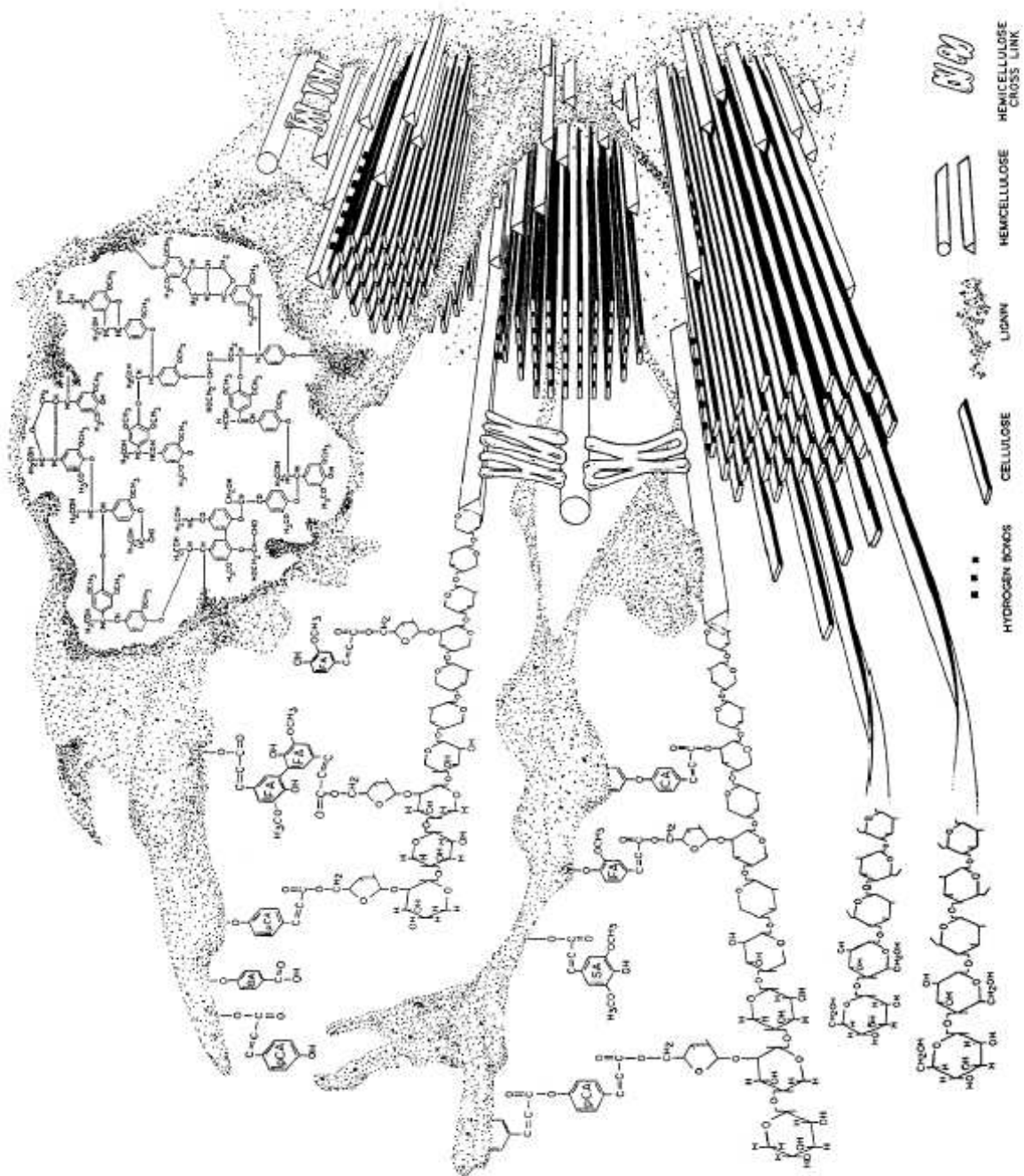


Figure 7 : Structure de la paroi secondaire (Bidlack et coll., 1992)

## I.2. Les xylanes au sein de la paroi

Les xylanes appartiennent à la famille des hémicelluloses du fait de leur extractabilité de la paroi végétale par des solutions alcalines. Ce sont les polysaccharides pariétaux non-cellulosiques les plus abondants.

### I.2.1. Le squelette de xylane

Les xylanes sont formés d'une chaîne principale d'unités D-xylopyranosyl (D-Xylp), de conformation  ${}^4C_1$ , liées en  $\beta$ -(1→4), si on exclue les xylanes algaux liés en  $\beta$ -(1→3). Cette liaison glycosidique de type  $\beta$ -(1→4) confère à la chaîne une conformation relativement étendue. La chaîne décrit une hélice gauche à 3 résidus xylose par tour (Atkins, 1992). Selon Atkins, le pas de l'hélice est de 1,49 nm, ce qui donne une valeur de 0,5 nm pour la longueur d'un monomère de xylose projeté sur l'axe de la molécule. Cette structure a été confirmée par diffraction des rayons X ainsi que par une analyse conformationnelle dans le cas de l'arabinoxylane du grain de riz (Yui et *coll.*, 1995). La conformation en hélice du xylane  $\beta$ -(1→4) est plus flexible que celle de la cellulose ; en effet, cette structure n'est stabilisée que par une seule liaison hydrogène entre l'hydrogène du groupement hydroxyle en position 3 d'un résidu xylose et l'oxygène en position 5 du cycle suivant (Marchessault et Liang, 1962), contre deux liaisons hydrogène dans le cas de la cellulose.

### I.2.2. Les branchements

La plupart des xylanes sont des hétéropolysaccharides, contenant un ou plusieurs sucres substitués sur la chaîne principale de xylose. Lorsque les xylose sont substitués, ils le sont sur leur hydroxyle en position 3 et plus rarement sur l'hydroxyle en position 2. Ces ramifications diffèrent en composition, en taille, en lieu de fixation sur la chaîne principale, selon l'espèce et l'origine variétale. Le degré de substitution de la chaîne principale des xylanes détermine ses propriétés physico-chimiques, telles que sa solubilité et sa capacité à se lier à la cellulose.

Selon la nature et l'agencement des substituants, on définit différents types de xylanes, représentés figure 8.

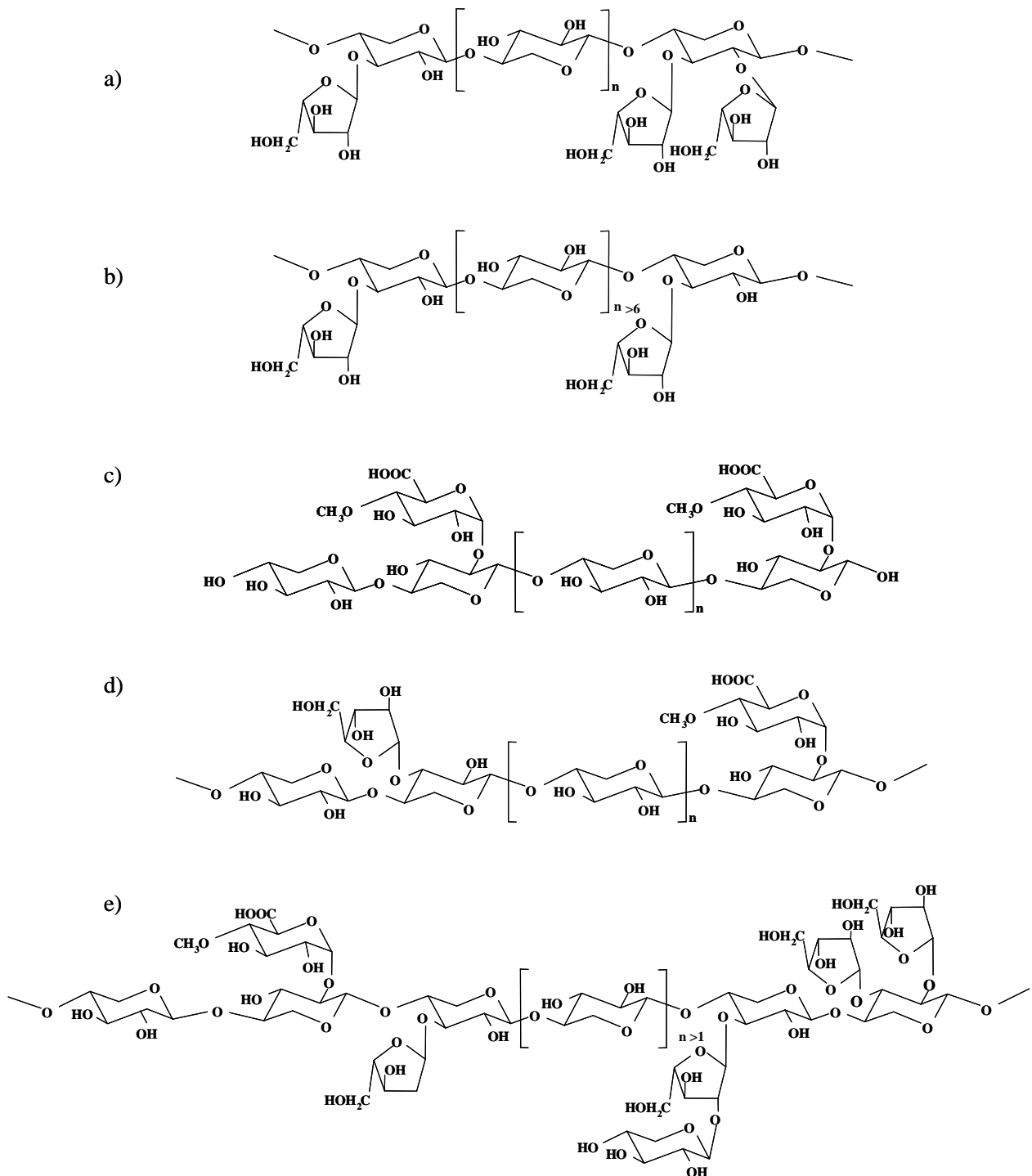


Figure 8 : Exemples de structures de xylanes d'origine végétale, a) arabinoxylane fortement substitué, b) arabinoxylane faiblement substitué, c) 4-*O*-méthylglucuronoxylane, d) arabino-4-*O*-méthylglucuronoxylane, e) hétéroxylane (Ebringerova et Heinze, 2000).

Les xylanes neutres sont peu branchés et contiennent peu ou pas d'acides uroniques. Ces xylanes sont les moins fréquents et ont été isolés dans les téguments de graine de guar (Sajjan et Salimath, 1986).

Les arabinoxyanes (AX) sont substitués sur la position 3 ou sur les positions 2 et 3 par des unités de  $\alpha$ -L-arabinofuranose ( $\alpha$ -L-Araf) ; ils peuvent également contenir en faibles quantités d'autres unités telles que du D-galactose ( $\alpha$ -D-Galp), du L-rhamnose ( $\alpha$ -L-Rhap) et des acides uroniques, l'acide D-glucuronique ( $\alpha$ -D-GlcpA) et son dérivé méthylé (4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA). On distingue les arabinoxyanes fortement branchés (ws-AX, figure 8a), solubles dans l'eau, des arabinoxyanes insolubles dans l'eau (wis-AX, figure 8b), qui sont très faiblement substitués.

Les glucuronoxyanes (GX, figure 8c) sont des hémicelluloses acides. Ils sont substitués par l'acide  $\alpha$ -D-glucopyranosique ( $\alpha$ -D-GlcpA), fréquemment sous forme d'acide 4-O-méthylglucuronique, lié par une liaison  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) sur la chaîne de xylose. Certains de ces xylanes *in situ* sont substitués irrégulièrement par des groupements acétyle en position O-2 et O-3 des xylose, pour environ 70% de ces unités xylose (Baeza et Freer, 2001). Lors de leur extraction par des solutions alcalines, ces O-acétyl-4-O-méthylglucuronoxyanes sont désacétylés.

Les arabinoglucuronoxyanes (AGX, figure 8d) sont substitués par l'arabinose, lié en O-3 des résidus xylose, et l'acide D-glucuronique ( $\alpha$ -D-GlcpA) et/ou son dérivé méthylé, liés en O-2 du xylose. Ce type d'hémicellulose a été isolé à partir de fourrages et de bois de résineux.

D'autres types de xylanes, les hétéroxylanes (HX, figure 8e), sont caractérisés par un taux élevé de ramification et sont composés d'une large gamme de constituants. Les chaînes latérales sont constituées par des monomères de  $\alpha$ -L-arabinofuranose ( $\alpha$ -L-Araf), d'acide  $\alpha$ -D-glucopyranosique ( $\alpha$ -D-GlcpA) parfois méthylé en O-4, d'unités de D-galactose, de D-glucose, de D-xylose, ainsi que de différentes chaînes constituées généralement de D-xylose conjugués avec les monomères déjà cités ; la longueur de ces chaînes ne dépassant pas trois résidus. Les alcools primaires (O-5) des résidus d'arabinose peuvent être estérifiés par des

acides phénoliques, tels que l'acide férulique et l'acide *para*-coumarique, sous leur forme *trans* (Ford et Hartley, 1990).

### **I.2.3. Diversité des xylanes**

L'analyse détaillée de la littérature donne des xylanes, l'image de polysaccharides aux structures chimiques variées. Cette diversité structurale des xylanes est à associer à leurs fonctions chez les plantes et peut ainsi expliquer la répartition de certaines classes de xylanes au sein du règne végétal comme cela est illustré dans l'arbre phylogénétique présenté en figure 9.

La présence de xylanes peut ainsi être mise en évidence jusqu'aux familles botaniques les plus anciennes. Les homoxylanes (X) linéaires de type  $\beta$ -(1→3) se substituent à la cellulose dans la paroi de l'algue verte *Caulerpa* sp., alors que les homoxylanes mixtes (Xm)  $\beta$ -(1→3 et 1→4) sont souvent identifiés dans la paroi des algues rouges de la famille des *Palmariales* et *Nematiales*. La présence d'homoxylanes chez les plantes supérieures est assez rare. Les xylanes des plantes supérieures sont quant à eux du type glucuronoxylane. Dans le bois des dicotylédones, végétaux les plus évolués, seul le 4-*O*-méthylglucuronoxylane (GX) est identifié. Le rapport Xyl / 4-*O*-MeGlcA varie dans ce cas de 4 à 16 pour 1. Les arabino(glucurono)xylanes (AGX) sont caractéristiques des bois de gymnospermes ainsi que des tissus de graminées et de plantes annuelles. Les arabinoxylanes neutres (AX) sont fréquents dans les grains de céréales, quelques xylanes ramifiés (ws-AX) sont présents dans l'endosperme et le péricarpe de ces derniers. Au cours de la dernière décennie, les caractéristiques structurales d'arabinoxylanes neutres (solubles = ws-AX ou insolubles = wis-AX dans l'eau) extraits de grains de céréales tels que le seigle, l'avoine, le froment et l'orge ont été publiées. Ces arabinoxylanes sont caractérisés par un faible contenu en Araf qui sont essentiellement associés à des Xylp monosubstitués. Les grains de riz, de maïs et sorgho contiennent quant à eux à la fois des arabinoxylanes (AX) et des arabino(glucurono)xylanes (AGX). Enfin, les xylanes les plus complexes du point de vue structural, les hétéroxylanes (HX), sont présents chez certaines céréales, et le plus largement étudié a sans doute été l'hétéroxylane du son de maïs (Chanliaud, 1995).

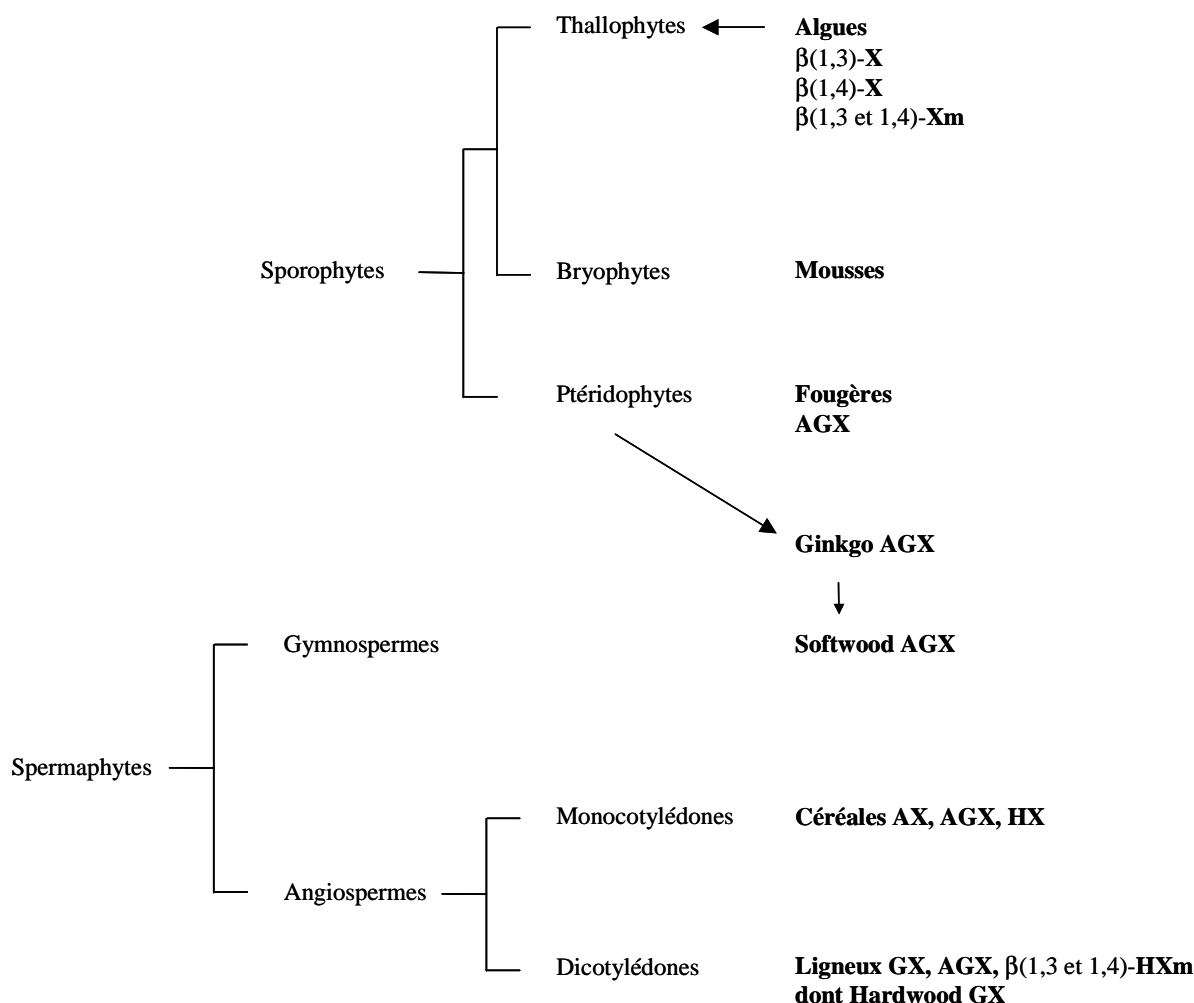


Figure 9 : Répartition des xylanes sur l'arbre phylogénétique du règne végétal d'après Ebringerova et Heinze (2000) ; X : homoxylanes ; Xm : xylanes mixtes ; AX : arabinoxylanes, AGX : arabinoglucuronoxylanes ; GX : glucuronoxylanes ; HX : hétéroxylanes ; → : évolution.

## I.2.4. Propriétés physico-chimiques des xylanes

### I.2.4.a. Masse moléculaire, degré de polymérisation

Les valeurs des masses moléculaires rapportées dans la littérature sont très variables, dépendantes du mode d'extraction ou de la méthode d'analyse utilisée. Les plus utilisées de ces méthodes sont la viscosimétrie, la diffusion de la lumière, l'ultracentrifugation et la chromatographie d'exclusion stérique (perméation de gel). Vinkx et Delcour (1996) ont abordé le problème de l'estimation des masses moléculaires dans une revue consacrée aux arabinoxylanes. Habituellement les valeurs obtenues par ultracentrifugation sont inférieures à

celles déterminées par perméation de gel, et les valeurs les plus élevées sont obtenues par diffusion de la lumière. L'association des chaînes de polymères ainsi que la présence de particules de microgels insolubles semblent être responsables des variations importantes dans la mesure des masses moléculaires.

Finalement, la détermination d'un degré de polymérisation doit être effectuée par plusieurs méthodes physico-chimiques, et seule la convergence des résultats permet d'établir une valeur significative de la masse molaire moyenne des hémicelluloses.

Globalement, le degré de polymérisation ou DP des xylanes est plus faible que celui de la cellulose. Il dépasse rarement 200, mais peut atteindre 2000 pour les hétéroxylanes de rafle de maïs (Chanliaud, 1995).

#### ***1.2.4.b. Solubilité***

Lors de la solubilisation d'un polymère, il y a compétition entre les interactions macromolécule/solvant et les interactions macromolécule/macromolécule. Les molécules linéaires et neutres, comme la cellulose, sont très difficiles à dissoudre, du fait des très fortes interactions intermoléculaires existantes qui définissent des zones très cristallines très peu accessibles à l'eau. La solubilité est également déterminée par le degré de substitution de la chaîne principale des polymères, les branchements facilitant l'éloignement entre les chaînes. La solubilité est enfin favorisée par la présence de substituants chargés comme les acides uroniques, qui augmentent l'hydrophilie du polymère et les répulsions électrostatiques intermoléculaires. Plus les xylanes sont substitués, plus ils sont solubles dans l'eau.

Les xylanes fortement branchés sont donc plus solubles dans l'eau et sont moins étroitement liés à la cellulose, contrairement aux xylanes peu substitués. Ainsi les xylanes endospermiques sont facilement extraits par l'eau comparativement aux xylanes des tissus non endospermiques. Ceci peut être attribué à la présence de quantités importantes d'unités d'acide uroniques.

### **I.2.5. Liaisons chimiques entre les xylanes et les autres constituants de la paroi**

Les divers composants de la paroi – polysaccharides, lignines, acides hydroxycinnamiques, protéines, ions et eau – interagissent entre eux via différents types d'interactions : liaisons ioniques, hydrogène ou covalentes. Il est évident que la nature des liens existants entre les xylanes et les autres constituants de la paroi, leur stabilité et leur intensité, conditionneront le rendement et la qualité de l'extraction de ces polysaccharides. Les différents types d'associations possibles entre les polymères pariétaux ont été décrits par Fry (1986) et Iiyama et *coll.* (1994).

#### ***I.2.5.a. Liaisons non covalentes***

De nombreuses liaisons hydrogène peuvent se former entre les polysaccharides pariétaux par l'intermédiaire de leurs groupements hydroxyle. La présence de substituants sur les xylanes ainsi que de groupements acétyle les empêche cependant de s'associer en microfibrilles comme la cellulose. Ces liaisons hydrogène peuvent également relier les xylanes avec la cellulose suivant le taux de branchement, ou avec d'autres composés hémicellulosiques (Fry, 1989).

De plus, des liaisons ioniques monovalentes peuvent intervenir entre les groupements carboxylates des acides uroniques des xylanes et les groupements chargés de l'extensine (groupement  $\text{NH}_3^+$  de la lysine et groupement imidazole de l'histidine, Fry, 1988). Des liaisons ioniques divalentes peuvent se mettre en place par l'intermédiaire des ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec les atomes d'oxygène des résidus glycosyles voisins.

#### ***I.2.5.b. Liaisons covalentes***

##### ***i. Liaisons avec la lignine***

La lignine est parfois associée de façon étroite aux polysaccharides pariétaux par l'intermédiaire de liaisons covalentes de types benzyl-ester, benzyl-éther et glycosidique.

Des liaisons ester peuvent exister entre un acide uronique d'un glucuronoxylane avec les groupements hydroxylés des lignines (Lam, 1990). Selon l'origine variétale, un tiers des unités d'acides uroniques peut être lié de cette manière à la lignine (Takahashi et Koshijima, 1988). Ces liaisons sont alcali-labiles (figure 10).



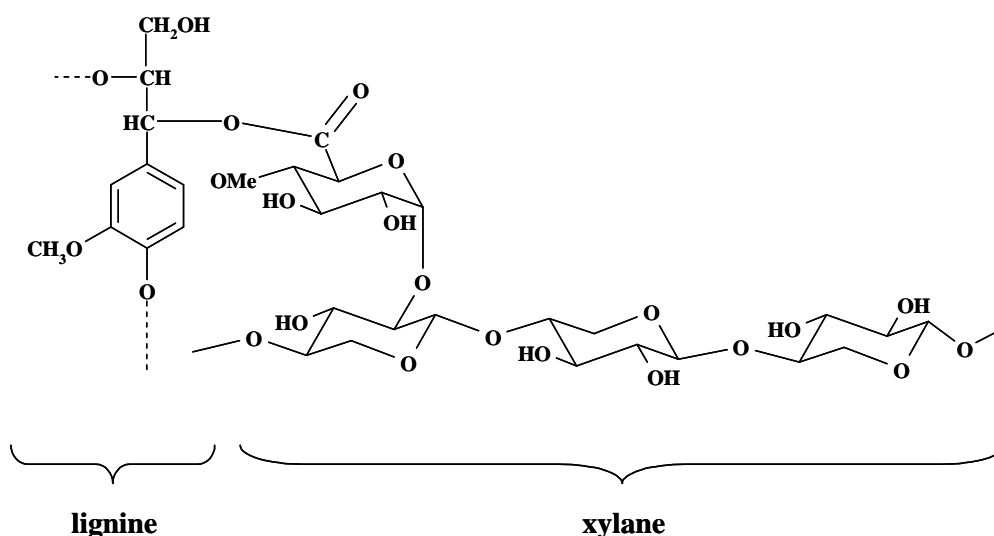


Figure 10 : Liaison de type ester entre la lignine et un xylane (Takahashi et Koshijima, 1988)

Les liaisons éther constituent un pontage direct des xylanes aux lignines (Joseleau, 1992), reliant le carbone 2 ou 3 des unités xylose avec les carbones  $\alpha$  et  $\gamma$  du groupement phénylpropane de la lignine (Watanabe et *coll.*, 1986, Watanabe et *coll.*, 1989). Ce type de liaison est beaucoup plus stable, en milieu basique et acide, que les liaisons ester précédemment décrites (figure 11).

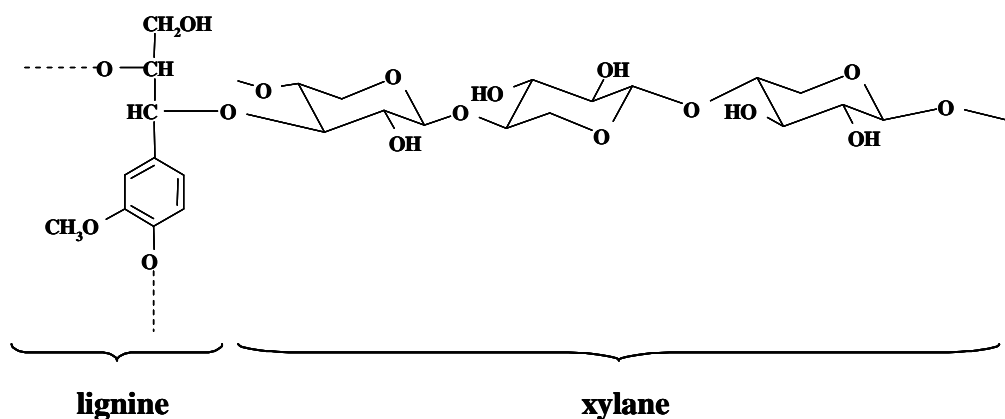


Figure 11 : Liaison de type éther entre la lignine et un xylane (Watanabe et *coll.*, 1989)

Des liaisons phénylglycosides sont également fréquemment rencontrées, formées par réaction des unités réductrices des xylanes avec les groupements hydroxyle phénoliques de la lignine. Ce type de liaison est facilement rompu en milieu acide.

La figure 12 résume les différents types de liaisons ester et éther rencontrées dans les parois lignifiées. Les liaisons ester entre les fonctions carboxyliques des glucuronoxylanes, par exemple, et les hydroxyle des lignines (figure 12a) sont représentées, ainsi que les liaisons éther entre polysaccharides et lignines (figure 12b). Des esters hydroxycinnamiques peuvent être liés directement aux polysaccharides (figure 12c). Un acide férulique bifonctionnel peut former des pontages covalents ester-éther entre les polysaccharides et les lignines (figure 12d) ou par l'intermédiaire de l'acide déhydrodiférulique, former des ponts diester entre polysaccharides (figure 12e) et être éthérifiée à la lignine (figure 12f). L'acide *para*-coumarique n'est pas impliqué dans de tels pontages. Il s'associe aux constituants de la paroi après lignification sous forme de liaisons éther et surtout ester.

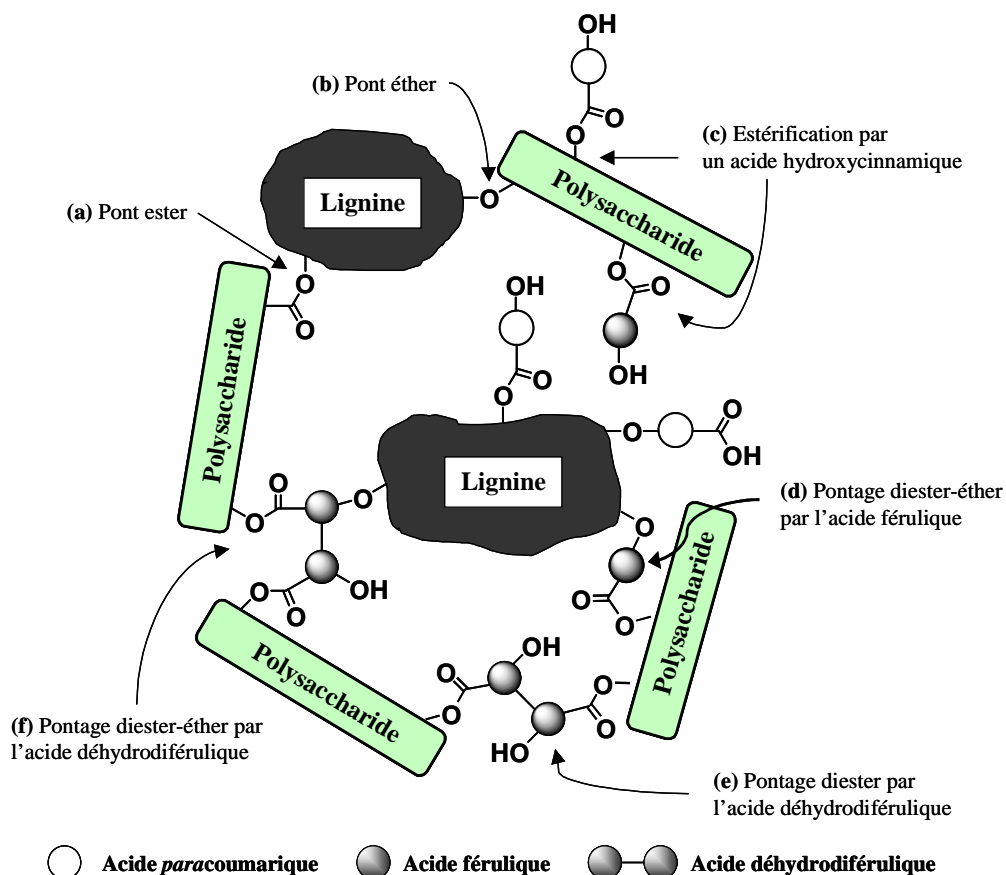


Figure 12 : Possibilités de liaisons covalentes entre les xylanes et les lignines dans la paroi végétale (d'après Iiyama et coll., 1994).

### *ii. Liaisons avec les protéines*

De faibles quantités de protéines ont été identifiées dans les xylanes des plantes annuelles, cependant leur rôle et la nature précise de leurs liaisons avec les xylanes restent incertains. Ainsi un complexe arabinoxylane-protéine a été isolé du son de seigle (Ebringerova, 1994a). Cette association avec les protéines de la paroi serait responsable de l'insolubilité des hétéroxylanes de son de maïs (Saulnier et coll., 1995).

### *iii. Liaisons entre polysaccharides*

Des interconnexions entre xylanes et polysaccharides pectiques ont également été identifiées ; dans certains cas, des complexes ont été extraits dont on ne connaît pas précisément la nature des liaisons qui les constituent, tel qu'un complexe glucuronoxylane-pectine isolé à partir du hêtre (Hromadkova, 1996) ; par contre Kwan et Morvan (1991) ont établi l'existence de liaisons éther entre un xylane et une chaîne d'arabinogalactane de type II. Enfin Coïmbra et coll. (1995) ont démontré l'association glucuronoxylane/xyloglucane dans la pulpe d'olives.

## **I.2.6. Les principales sources de xylane**

Les sources majeures de xylane sont essentiellement localisées dans le bois des dicotylédones et, en excluant les graminées, chez les monocotylédones où les xylanes du type GX et AGX forment entre 25 et 35 % de la biomasse sèche ou encore dans les grains de céréales qui peuvent contenir de 30 à 50% d'AX, de GAX et d'HX. Les sources de xylanes ne manquent donc pas, y compris pour une exploitation et une valorisation à l'échelle industrielle de ces polysaccharides. Les épis de maïs, co-produits de l'industrie de transformation du maïs, sont la source la plus conventionnelle de xylanes. D'autres sources facilement accessibles et abondantes existent. C'est par exemple le cas des xylanes extraits à partir des résidus générés lors de la production d'huile de tournesol ou d'huile d'olive. Les xylanes peuvent également être facilement isolés lors du conditionnement des fibres de lin ou au cours du traitement par explosion à la vapeur de la paille.

Le bois et les co-produits de l'industrie forestière (sciures et écorces) sont aussi très riches en xylanes. En particulier, les bois durs, essentiellement de feuillus, présentent des contenus plus homogènes en xylanes.

### I.3. Composition chimique du bois

Le bois est un matériau complexe et hétérogène, tant dans son anatomie que dans sa composition chimique. On distingue les gymnospermes, connus sous le nom de résineux ou conifères (softwoods), et les angiospermes ou feuillus (hardwoods).

#### I.3.1. Principales différences de composition entre feuillus et résineux

Les tableaux 1 et 2 comparent les compositions chimiques pour 5 espèces de feuillus et 5 espèces de résineux (Timell, 1967). Si le taux de cellulose reste quasiment le même entre feuillus et résineux ( $43 \pm 2\%$ ), on constate des différences concernant la teneur en lignines ; ainsi le bois des conifères est caractérisé par une teneur plus élevée en lignines (entre 25 et 35 %), alors que le taux de lignines des feuillus est compris entre 18 et 25%. Les lignines présentent ainsi une variabilité importante au niveau de leur proportion chez les feuillus et les conifères, mais aussi au niveau de leur composition.

Tableau 1 : Composition chimique du bois de feuillus (Timell, 1967)

Constituants de la paroi	<i>Acer rubrum</i>	<i>Betula papyrifera</i>	<i>Fagus grandifolia</i>	<i>Populus tremuloides</i>	<i>Ulmus americana</i>
Cellulose	45	42	45	48	51
Lignine	24	19	22	21	24
Glucuronoxylane	25	35	26	24	19
Glucomannane	4	3	3	3	4
Pectines, amidon, cendres, etc.	2	1	4	4	2

Valeurs en pourcentage massique par rapport au bois débarrassé des extractibles

Tableau 2 : Composition chimique du bois de résineux (Timell, 1967)

Constituants de la paroi	<i>Abies balsamea</i>	<i>Picea glauca</i>	<i>Pinus strobus</i>	<i>Tsuga canadensis</i>	<i>Thuja occidentalis</i>
Cellulose	42	41	41	41	41
Lignine	29	27	29	33	31
Glucuronoxylane	9	13	9	7	14
Glucomannane	18	18	18	16	12
Pectines, amidon, cendres, etc.	2	1	3	3	2

Valeurs en pourcentage massique par rapport au bois débarrassé des extractibles

D'une manière générale, les lignines de conifères sont de type gâiacyle, résultant de la polymérisation de l'alcool coniférylique. Les lignines de feuillus sont de type gâiacyle et syringile, biosynthétisées à partir des alcools coniférylique et sinapylique. Il faut noter que la composition des lignines est très influencée par l'âge de l'arbre.

Nimz et *coll.* (1974) ont proposé un modèle structural de la lignine du hêtre (figure 13), sur la base de résultats obtenus par hydrolyse ménagée et dégradation par l'acide thioactéique de la lignine. Ce modèle présente 25 unités phénylpropane, dont 14 unités gâiacyle, 10 unités syringile et une unité hydroxybenzoyle, certaines de ces unités pouvant être remplacées par des unités dilignols (entre crochets sur la figure).

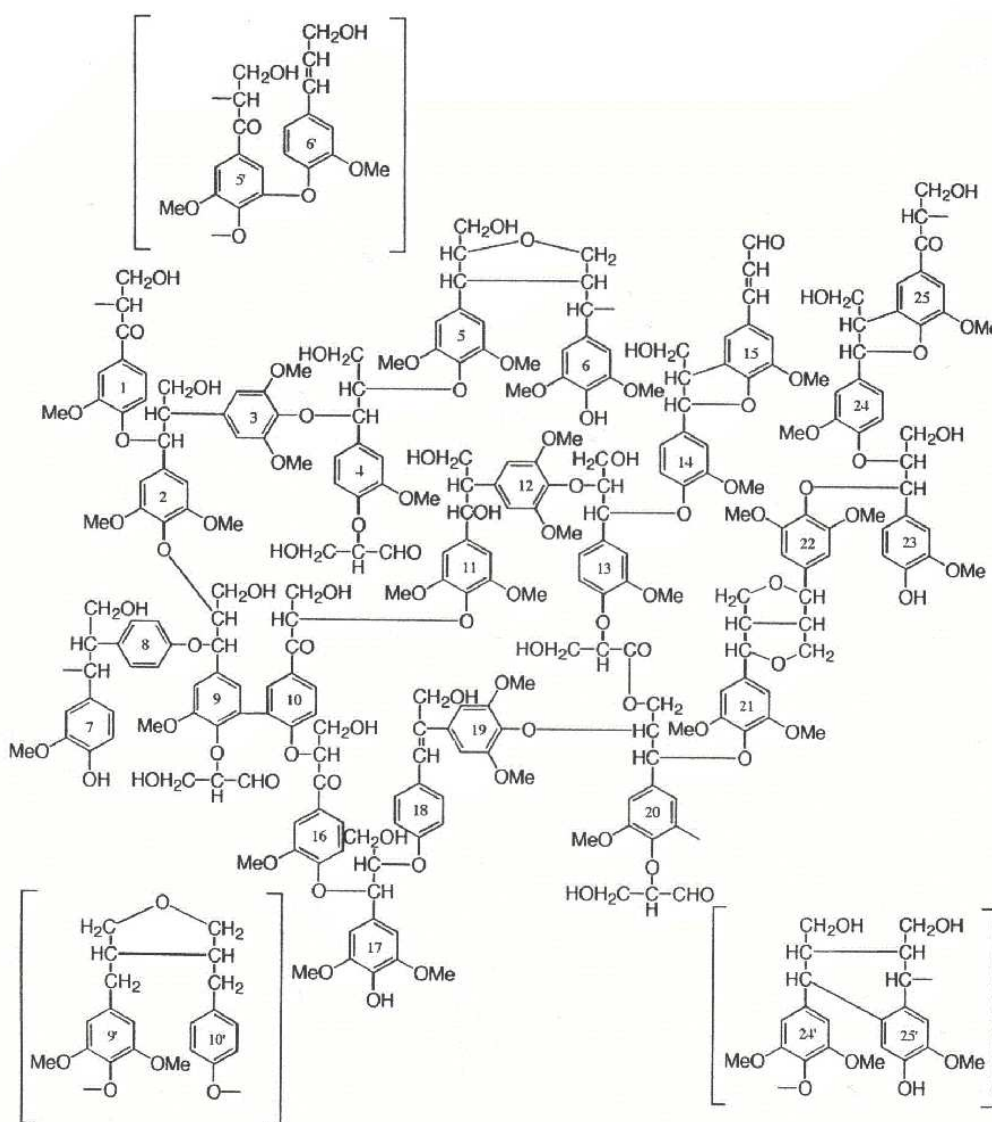


Figure 13 : Modèle de structure de lignine de hêtre (Nimz, 1974).

Les tableaux 1 et 2 révèlent également la variabilité des hémicelluloses identifiées dans les bois de feuillus et de résineux, tant du point de vue quantitatif que qualitatif. Les principales familles d'hémicelluloses du bois étant les xylanes et les mannanes (figure 14). La proportion d'hémicelluloses est plus importante chez les feuillus, pour lesquels, l'hémicellulose majoritaire est un 4-*O*-méthylglucuronoxylane partiellement acétylé (*O*-acétyl-4-*O*-méthylglucuronoxylane) constituant 20 à 35% du bois, tandis que les résineux contiennent des glucuronoarabinoxylanes pour environ 10%. Les feuillus renferment également une petite quantité de glucomannanes, alors que chez les résineux les galactoglucomannanes acétylés représentent jusqu'à 18% des constituants du bois de résineux.

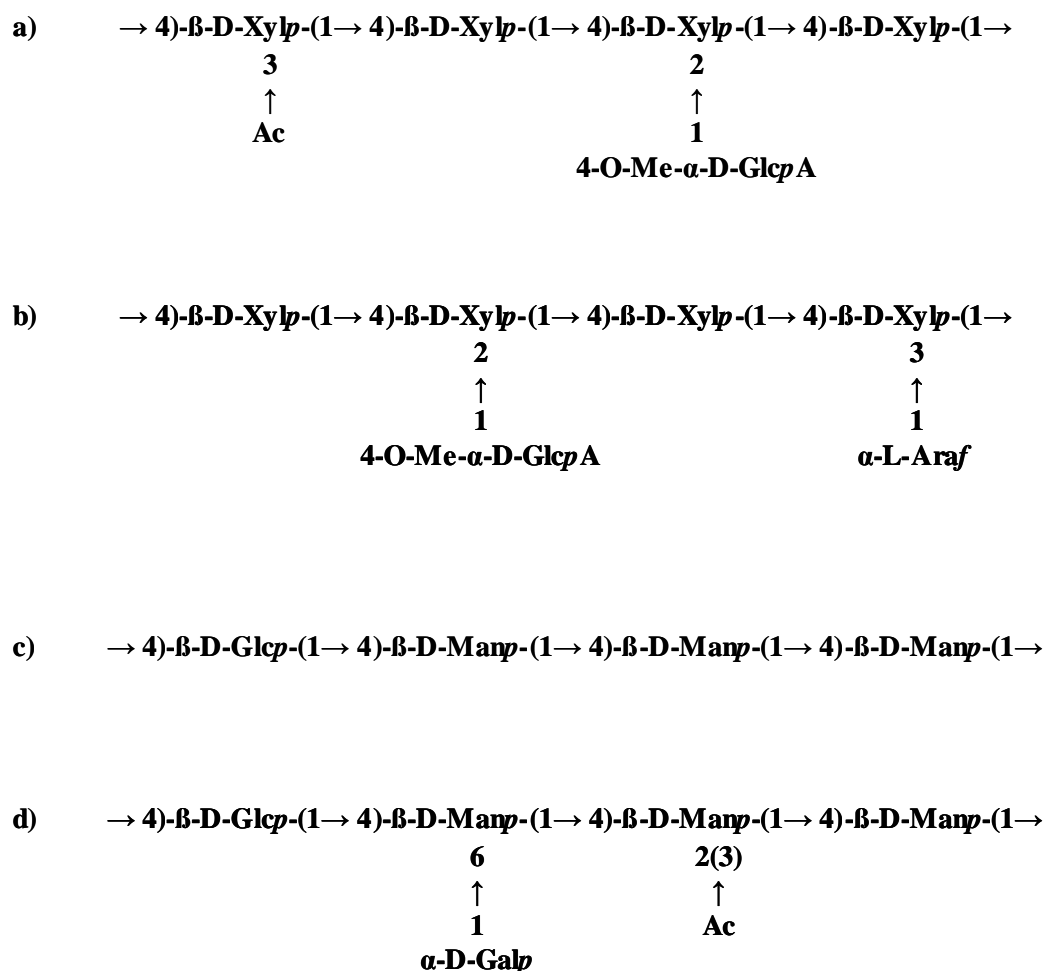


Figure 14 : Structures hémicellulosiques du bois, a) *O*-acétyl-4-*O*-méthylglucuronoxylane (feuillus), b) arabino-4-*O*-méthylglucuronoxylane (résineux), c) glucomannane (feuillus), d) *O*-acétylgalactoglucomannane (résineux).

En plus de ces principaux constituants, le bois contient également d'autres polysaccharides tels que les pectines et l'amidon en très faible quantité, ainsi que des extractibles, pour lesquels les quantités sont variables. Le terme extractibles ou extraits englobe l'ensemble des constituants du bois qui peuvent être extraits par l'eau ou par certains solvants organiques. Les substances hydrosolubles, extractibles par l'eau ou les solvants polaires, sont représentées essentiellement par les composés aromatiques comme les tanins, les flavonoïdes, etc... Les graisses, les cires et les terpènes constituent les principales substances extractibles par les solvants apolaires.

### **I.3.2. Les xylanes du bois**

Du point de vue structural, ces hémicelluloses ont en commun une chaîne principale constituée par un enchaînement de résidus D-xylopyranose liés par des liaisons  $\beta$ -(1→4). La variabilité structurale se manifeste par le degré et la nature des substitutions qui peuvent apparaître sur les C2 et C3 des unités xylose, tels que des résidus de L-arabinofuranose, ou plus rarement de L-arabinopyranose, liés en  $\alpha$ -(1→3) sur les Xyl. Un autre substituant est l'acide glucuronique et son dérivé *O*-méthylé en position 4, qui sont liés en  $\alpha$ -(1→2) sur la chaîne principale. Enfin certaines unités xylose portent des groupements acétyle en positions 2 et 3. Sur ce squelette général, différentes particularités ont été mises en évidence suivant l'essence considérée, comme la présence d'autres substituants que ceux généralement trouvés, ou l'existence de chaînes latérales.

Cette variabilité dans les structures laisse cependant apparaître quelques caractères généraux selon qu'il s'agit de xylanes extraits de bois de feuillus ou de bois de résineux.

#### ***1.3.2.a. Le 4-O-méthylglucuronoxylane des bois de feuillus***

La structure chimique du 4-*O*-méthylglucuronoxylane (GX) des bois durs de feuillus a été très largement étudiée et les références bibliographiques la concernant sont nombreuses. La structure la plus représentative est sans doute celle d'une chaîne linéaire de 200 résidus Xylp associés par l'intermédiaire de liaisons  $\beta$ -(1→4) et substituée par endroit sur le C2 d'un résidu Xylp par un acide 4-*O*-méthylglucuronique. Le rapport 4-*O*-MeGlcA/Xylp est souvent de 1 pour 10. Les hydroxyles des résidus Xylp, et notamment le C3, sont souvent estérifiés par l'acide acétique (Figure 15, Teleman, 2000).

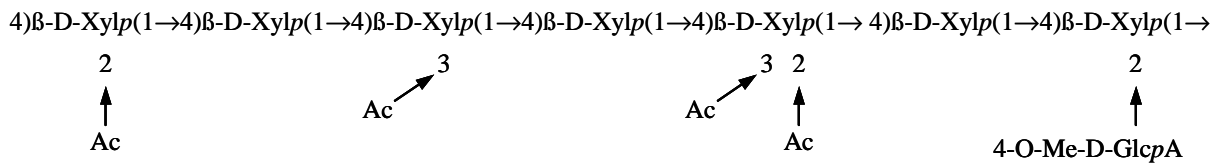


Figure 15 : modèle structural général du 4-*O*-méthylglucuronoxylane (GX) de bois de peuplier (d'après Teleman, 2000).

Quelques questions restent cependant en suspens concernant certains détails de la structure, comme la présence de chaînes latérales de xylose, la distribution des unités d'acide uronique le long de la chaîne principale ou encore la présence d'acide galacturonique et de rhamnose dans cette structure.

#### *i. Chaînes latérales*

Il est généralement admis que les xylanes sont des polymères linéaires. Leurs propriétés filmogènes en font preuve. D'après Horio et Imamura (1964), le xylane de hêtre forme des films d'élasticité comparable à celle du cellophane. Pourtant certains travaux ont montré l'existence de chaînes latérales constituées d'unités xylose sur certaines structures. La présence de ces chaînes latérales peut être mise en évidence par différents types d'analyses. La technique la plus ancienne est une méthylation, suivie de l'hydrolyse du polymère. On quantifie ensuite les proportions de 2- ou 3-*O*-méthylxylose, de 2,3-di-*O*-méthylxylose et de 2,3,4-tri-*O*-méthylxylose, dont la présence caractérise respectivement un branchement de la chaîne principale, un xylose interne non substitué, et une unité terminale non réductrice (figure 16). Comme l'ont montré les travaux de Zinbo et Timell (1965), on ne peut pas affirmer l'existence de ces chaînes latérales sur la seule caractérisation de dérivés 2- ou 3-*O*-méthylxylose ; en effet ils peuvent provenir de la déméthylation de dérivés di- ou triméthylés durant l'hydrolyse. Par contre la présence de plus d'une unité terminale non réductrice est la preuve d'une substitution de la chaîne principale. Mais les dérivés tri-*O*-méthylxylose (caractérisant les unités terminales non réductrices), étant des dérivés extrêmement volatiles, une sous-estimation du taux de branchement est souvent observée. Une autre méthode pour mettre en évidence l'existence de chaînes latérales sur les xylanes est la dégradation de Smith utilisée par Dutton et Unrau (1962), au cours de laquelle les xylanes subissent une coupure



oxydative par le *periodate* de sodium, puis une réduction par le borohydrure de sodium et enfin une hydrolyse (figure 17). La quantité d'éthylène glycol produit est alors une mesure directe du nombre d'unités terminales non réductrices. En confrontant ces deux méthodes, Zinbo et Timell ont établi un modèle structural du xylane de peuplier, comportant 2,2 chaînes latérales en moyenne par molécule de xylane (figure 18). D'autres travaux ont mis en évidence des structures similaires pour les xylanes de saule, de peuplier (Karacsonyi et *coll.*, 1969) et de charme (Ebringerova, 1969), comportant entre 1 et 2 chaînes latérales par molécule en moyenne. Concernant la longueur de ces chaînes latérales, elles seraient relativement courtes (Koshijima et *coll.*, 1965).

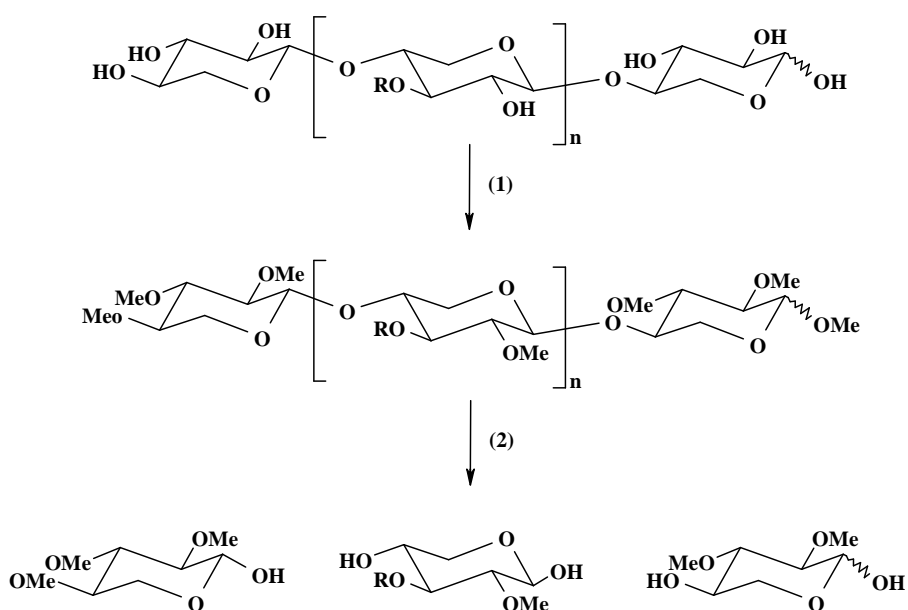


Figure 16 : Analyse de composition des xylanes par méthylation ; (1) DMSO, NaH ou *ter*-butylate de potassium, puis MeI ; (2) hydrolyse par le TFA.

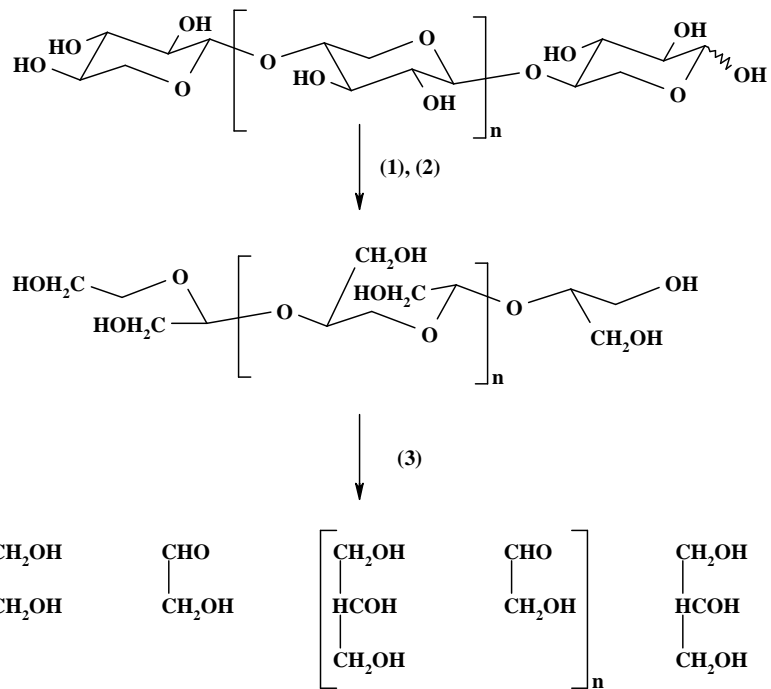


Figure 17 : Dégradation de Smith d'un xylane ; (1)  $\text{IO}_4^-$  ; (2)  $\text{NaBH}_4$  ; (3)  $\text{H}^+$ .

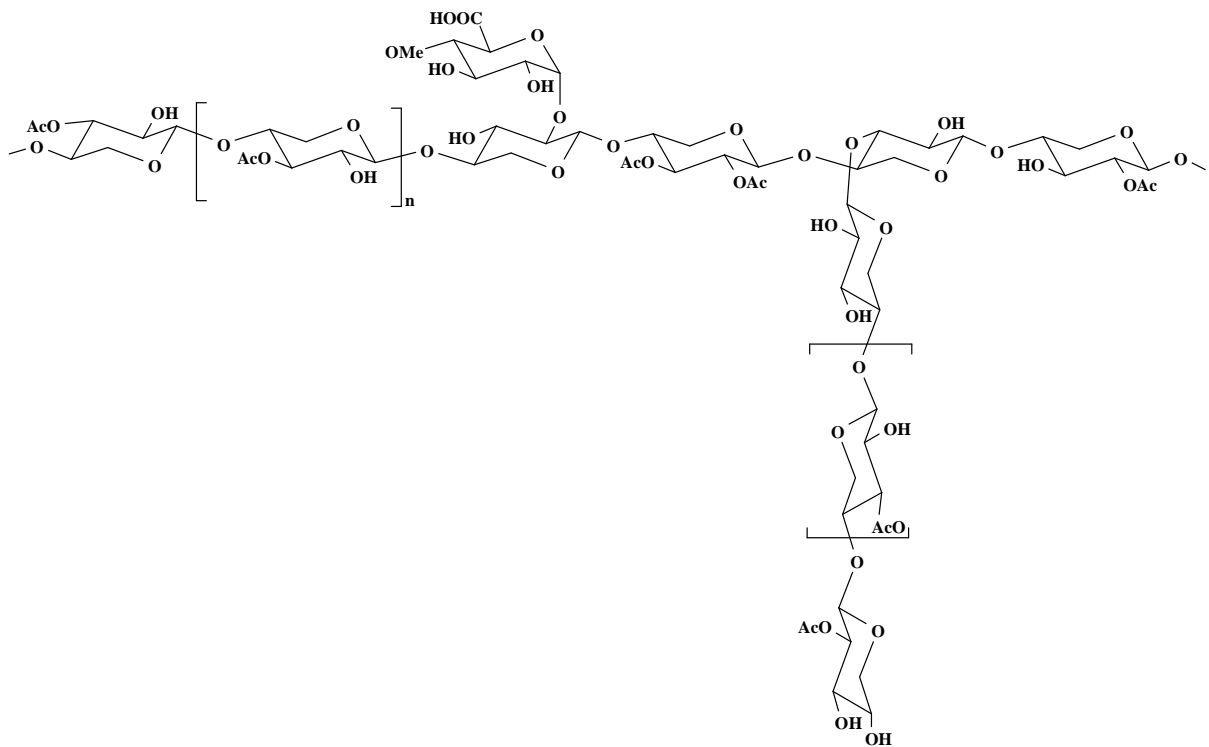


Figure 18 : *O*-acétyl-4-*O*-méthylglucuronoxylane présent dans le bois de peuplier Zinbo et Timell, (1965).

### *ii. Distribution des unités d'acide 4-O-méthylglucuronique*

Les données disponibles dans la littérature concernant la distribution des acides uroniques semblent indiquer que l'acide 4-O-méthylglucuronique est distribué de façon irrégulière et aléatoire sur la chaîne principale de xylane. En effet des oligosaccharides neutres de 18 unités xylose ont été isolés à partir du bouleau, alors que le rapport 4-O-MeGlcA/Xyl est d'environ 1/10 (Havlicek et Samuelson, 1972). Par ailleurs l'analyse d'un xylane extrait de l'écorce de saule contenant en moyenne un acide uronique pour six résidus xylose, a révélé une structure formée d'une alternance de zones non substituées et de zones à l'intérieur desquelles les unités d'acide uronique sont distribuées régulièrement (Toman et coll., 1981).

A ce jour, aucun oligosaccharide renfermant deux acides uroniques vicinaux n'a été isolé d'un hydrolysats de xylane de bois de feuillus.

### *iii. Acide galacturonique et rhamnose*

L'hydrolyse acide partielle du xylane de bouleau a révélé la présence de certains motifs oligosaccharidiques acides (tableau 3), dont la majorité est composée de xylose et d'acide 4-O-méthylglucuronique. D'autres structures sont relativement originales comportant de l'acide glucuronique, ou encore du rhamnose et de l'acide galacturonique. La présence d'acide glucuronique semble être un artefact, provenant de la déméthylation de l'acide 4-O-méthylglucuronique lors de l'hydrolyse acide (Shimizu, 1991). Si certains oligosaccharides contenant du rhamnose et de l'acide galacturonique peuvent être la conséquence d'une contamination par des pectines ou des galactanes, des quantités non négligeables du motif 4-O-(GalA)-Xyl sont obtenues par hydrolyse du xylane purifié. D'autres résultats, provenant de l'hydrolyse enzymatique partielle, ont complété cette étude (tableau 4). De nouveaux motifs ont été identifiés, confirmant que le rhamnose et l'acide galacturonique font partie intégrante de la structure. Par la suite il a été montré que ces unités caractérisent l'unité réductrice de xylanes, comme le montre la figure 19. La présence de ce motif a permis d'expliquer la résistance des xylanes au peeling alcalin (Johansson et Samuelson, 1977a).

Tableau 3 : Oligosaccharides acides obtenus par hydrolyse acide du bois de bouleau à partir de 20g (Shimizu et Samuelson, 1973).

Acides uroniques	Masse (mg)
O-(4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcAp)-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Xyl	41,0
O-(4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcAp)-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Xyl	313,5
O-( $\alpha$ -D-GlcAp)-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Xyl	22,6
2-O-( $\alpha$ -D-GalAp)-L-Rha	8,0
2-O-(4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcAp)-D-Xyl	500,0
4-O-( $\alpha$ -D-GalAp)-D-Xyl	110,0
6-O-( $\beta$ -D-GlcAp)-D-Gal	3,5
2-O-(4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcAp)-D-Xyl	7,5
2-O-( $\alpha$ -D-GlcAp)-D-Xyl	22,1
4-O-Me-D-GlcAp	45,4
GalAp	43,4
GlcAp	9,5

Tableau 4 : Oligosaccharides acides obtenus par hydrolyse enzymatique à partir de 20g de bois de bouleau (Shimizu et coll., 1976 ; Ishihara et coll., 1978).

Acides uroniques
O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -D-GalAp(1 $\rightarrow$ 4)-D-Xyl
O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -D-GalAp
O- $\beta$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -D-GalAp(1 $\rightarrow$ 4)-D-Xyl
O- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -D-GalAp(1 $\rightarrow$ 4)-D-Xyl

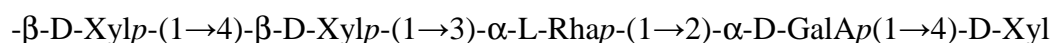


Figure 19 : Motif terminal des xylanes de feuillus (Shimizu, 1991)

#### iv. Groupements acétyle

La mise en œuvre de protocoles d'extraction qui font appel à l'utilisation de solutions alcalines conduit à la désacétylation des *O*-acétyl-(4-*O*-méthylglucurono)xylane contenus dans les bois de feuillus. L'obtention de ces molécules sous leurs formes natives nécessite

l'utilisation de protocoles d'extraction qui préservent les groupements acétyl (extraction en présence de DMSO ou par utilisation des micro-ondes). La localisation de l'acétylation est par ailleurs difficile à déterminer avec certitude en raison de la migration possible du groupement *O*-acétyl entre les C-2 et C-3 des résidus *Xylp* (Shimizu, 1991). Les GX contiennent de 9 à 14 % de groupements acétyl, ce qui correspond à un degré de substitution de 0,36 à 0,54.

### 1.3.2.b. *L'arabino-(4-O-méthylglucurono)xylane des bois de résineux*

Les xylanes de bois de conifères (figure 20), moins abondants que les xylanes de feuillus, sont substitués à la fois par des unités L-arabinose (5 à 10% environ) et par des résidus d'acide 4-*O*-méthylglucuronique (12 à 20% environ). Le degré de polymérisation de ces xylanes est compris entre 50 et 185. Comme dans le cas des xylanes de feuillus, quelques éléments de structure sont encore discutés. Là encore, en plus des substitutions par l'acide 4-*O*-méthylglucuronique ou l'arabinose, des branchements par de courtes chaînes latérales de xylose ont été mis en évidence (Shimizu, 1991). L'extrémité réductrice s'est révélée être de structure identique aux xylanes de feuillus (Andersson et *coll.*, 1983). La principale différence avec les xylanes de feuillus, outre la présence d'arabinose, est le taux important d'acide uronique. L'hydrolyse acide du xylane de mélèze a permis d'obtenir deux séries d'oligosaccharides, comprenant une et deux unités d'acide uronique. Les résultats de cette étude ont montré qu'une grande proportion des acides uroniques présents dans ces xylanes sont positionnés sur deux xyloses adjacents (Shimizu et *coll.*, 1978).

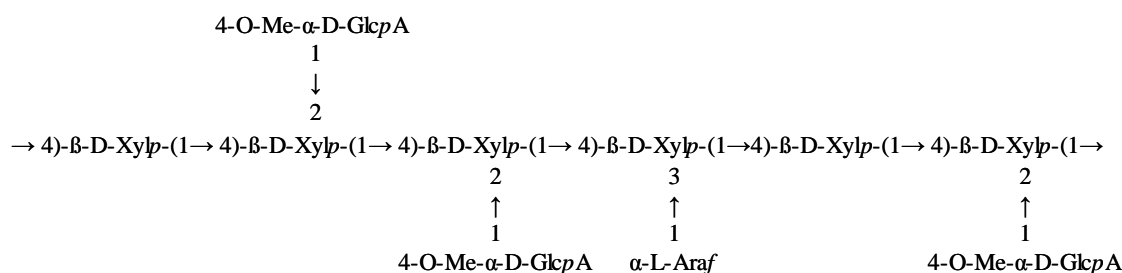


Figure 20 : Structure partielle d'un arabino-(4-*O*-méthylglucurono)xylane des bois de résineux (Shimizu, 1991).

## I.4. L'extraction des xylanes du bois

Le problème principal auquel est confronté l'expérimentateur est celui de la richesse chimique de la paroi cellulaire végétale qui se traduit par la grande diversité structurale des macromolécules, essentiellement polysaccharidiques, qui y sont représentées. Les protocoles à utiliser doivent donc être suffisamment sélectifs pour permettre l'extraction d'une catégorie de macromolécules, ils doivent également avoir le souci de protéger l'intégrité des structures moléculaires en limitant la dégradation de ces dernières. L'étude détaillée de la littérature dans le domaine de l'extraction des hémicelluloses fait état de l'existence d'un grand nombre de protocoles. Cette observation ne trouve son explication que dans la grande variété des structures hémicellulosiques identifiées au sein de la paroi cellulaire végétale. L'élaboration d'un protocole d'extraction spécifique des xylanes en vue de leur exploitation commerciale fait l'objet de nombreux travaux. La question à laquelle doit répondre l'expérimentateur est de savoir quel type de xylanes extraire, à partir de quel matériel végétal, pour quelles propriétés, en vue de quelles applications et en utilisant quels protocoles.

La présence d'une trame polyphénolique formée par la lignine, ainsi que l'existence de liaisons chimiques entre les différentes hémicelluloses qui constituent la paroi, et entre les hémicelluloses et la lignine limite l'extraction des xylanes. Il est alors impossible d'extraire un type de polysaccharide sans rompre ces liaisons et donc sans modifier le polymère par rapport à son état *in situ*. Il faut donc appliquer des conditions d'extractions suffisamment fortes pour permettre la rupture de ces liaisons, sans dégrader les molécules extraites.

Dans le cas de l'extraction à partir du bois, les xylanes sont classiquement recueillis, après délignification en présence de chlorite de sodium, par une extraction alcaline. Au préalable, il est nécessaire d'éliminer les extractibles, afin qu'ils n'interfèrent pas dans les analyses par la suite. Une représentation schématique de la séparation des constituants du bois est illustrée figure 21.

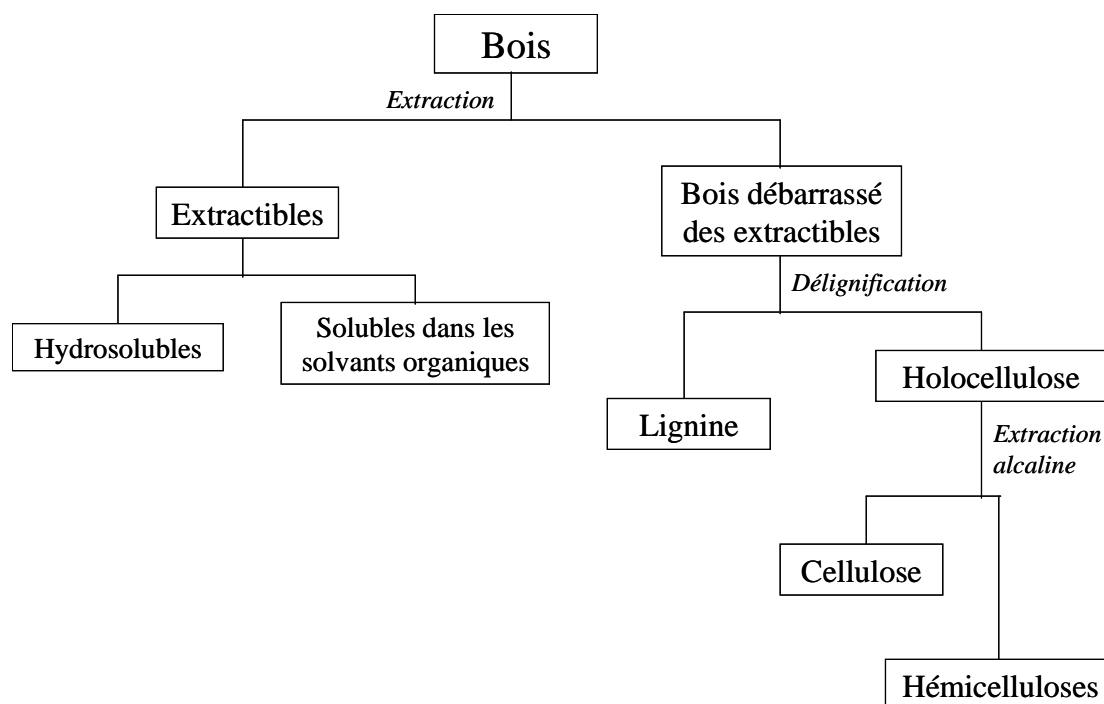


Figure 21 : Séparation des constituants du bois (Baeza et Freer, 2001)

## I.4.1. Choix des solvants d'extraction

### I.4.1.a. Solvants organiques

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF) ont été utilisés pour l'extraction des hémicelluloses. Par rapport aux solutions alcalines, les solvants organiques tels que le DMSO et le DMF favorisent l'extraction des hexosanes. L'extraction par le DMSO présente l'avantage de conserver l'acétylation des xylanes qui sont saponifiés lors des extractions alcalines aqueuses. Ce mode d'extraction fournit donc des fractions très proches de l'hémicellulose *in situ*, mais le rendement d'extraction est relativement faible (<50%).

### I.4.1.b. Solutions alcalines aqueuses

Les solvants d'extraction les plus utilisés sont les solutions alcalines de soude, de potasse ou de chaux, ou encore d'autres bases, telles que le carbonate de potassium, le formiate de sodium et l'ammoniac. Cependant, mises à part la potasse et la soude, les autres bases ne réagissent efficacement que lorsqu'elles sont utilisées en grande quantité pendant des temps relativement longs.

L'utilisation de la chaux  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  permet en particulier le maintien d'un pH constant au cours de la réaction et donne des hémicelluloses de couleur blanche par rapport à celles extraites avec les autres bases (Rutenberg et Herbst, 1957).

La soude s'est révélée la base la plus fréquemment employée pour le traitement des produits ligno-cellulosiques. Elle augmente la capacité d'absorption d'eau, provoque le gonflement des fibres celluloses (Joseleau, 1980), abaisse leur cristallinité, et augmente ainsi la surface spécifique par augmentation du volume du solide améliorant l'accessibilité des réactifs. Le mécanisme d'action de la soude reste mal connu ; plusieurs hypothèses ont été formulées : sous l'action de la soude, la proportion de liaisons hydrogène intermoléculaires serait réduite par solvatation (Joseleau, 1980) ainsi que celle des liaisons entre les hémicelluloses et la lignine ; les alcalis hydrolysent notamment les liaisons esters entre les sucres et les acides hydroxycinnamiques (Mares et Stones, 1973). Le rendement d'extraction augmente avec la concentration en soude.

Les solutions de potasse sont également utilisées pour extraire les hémicelluloses. La potasse apparaît plus sélective que la soude vis-à-vis de l'extraction des xylanes, qu'ils proviennent de feuillus ou de résineux (Shimizu, 1991, Bochicchio et Reicher, 2003). De plus, l'acétate de potassium formé au cours de la neutralisation avec l'acide acétique est plus soluble dans l'éthanol utilisé pour faire précipiter les hémicelluloses que l'acétate de sodium (Browning, 1967), donc plus facilement éliminé.

L'utilisation de solutions alcalines présente cependant des inconvénients. Outre le fait qu'elle provoque la saponification des polysaccharides, l'extraction par des bases peut entraîner l'élimination du groupement  $-\text{OCH}_3$  en position 4 des acides uroniques pour donner un intermédiaire acide 4-déoxyhex-4-énuronique. Après  $\beta$ -éliminations successives, ce dérivé se décompose puis un résidu acide est finalement éliminé (figure 22). Il semble qu'une partie des acides uroniques des 4-*O*-méthylglucuronoxylanes soit éliminée et dégradée (Johansson et Samuelson, 1977b) pour des extractions alcalines à des températures élevées. Il est également connu qu'en milieu alcalin, des réarrangements peuvent survenir sur l'extrémité réductrice des polysaccharides (figure 23), s'accompagnant de phénomènes de « peeling » par des mécanismes de  $\beta$ -élimination (Hansson et Hartler, 1968). En effet, le résidu situé à l'extrémité terminale réductrice d'un polysaccharide peut, sous l'action d'une solution alcaline diluée,



subir une isomérisation partielle sur le C2 pour donner le cétose correspondant à l'aldose épimère : c'est la transformation de Lobry de Bruyn - Alberta van Ekenstein. Ces réactions peuvent être évitées en opérant en milieu réducteur.

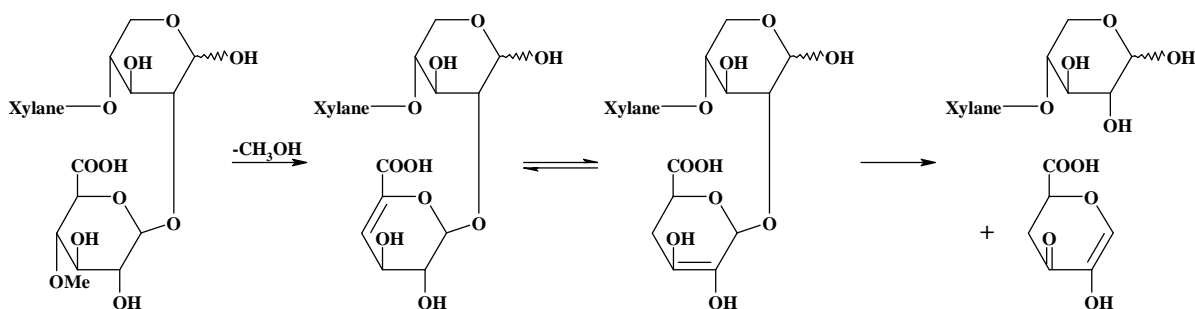


Figure 22 : Dégradation des unités d'acide uronique en milieu basique (Lai, 2001).

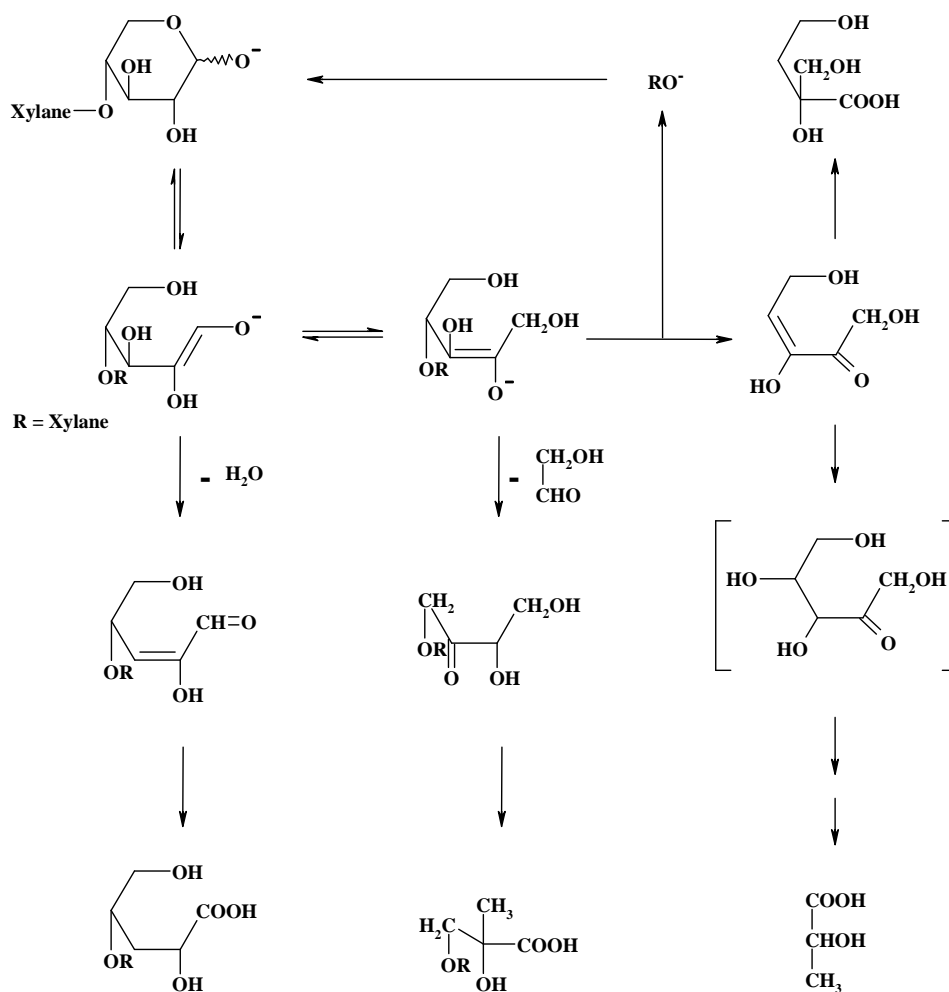


Figure 23 : Dépolymérisation (peeling) des xylenes en milieu alcalin (adapté de Lai, 2001).

### I.4.2. Séparation des fractions polysaccharidiques

Par les différentes techniques d'extraction décrites précédemment, un mélange de polysaccharides est obtenu. Afin d'obtenir des fractions polysaccharidiques homogènes, plusieurs possibilités se présentent.

On peut opérer par extractions successives, avec des solutions alcalines de concentrations croissantes (Carpita, 1984). On utilise d'abord une solution de soude ou de potasse diluée, ce qui a pour effet de faire gonfler les fibres et de faciliter ainsi la pénétration des solutions plus concentrées utilisées ensuite. Puis on augmente la concentration en alcali à chaque extraction, ce qui aboutit à un fractionnement tout en épuisant le bois en hémicelluloses. On peut également utiliser les solubilités préférentielles des différents polysaccharides dans la soude ou la potasse. Ceci est illustré par la figure 24, où le protocole prévoit d'abord une extraction par le DMSO, puis des extractions par des alcalis de concentrations croissantes (KOH ou NaOH). La dernière extraction est effectuée par une base forte en présence de borates. L'ajout d'acide borique  $H_3BO_3$  lors de l'extraction alcaline facilite la dissolution des glucomannanes, les borates formant, avec les hydroxyles *cis* en position 2 et 3 du mannose, un complexe plus alcali-soluble.

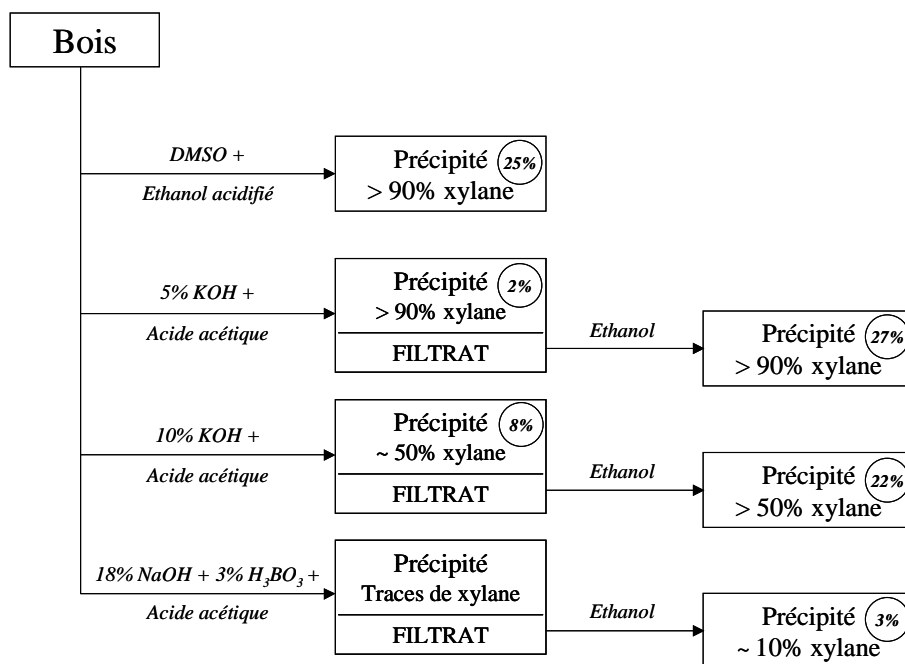


Figure 24 : Extraction et séparation de xylanes par extractions successives par le DMSO et des solutions alcalines. Les pourcentages font référence à la pureté des xylanes dans les fractions obtenues, et les valeurs entourées indiquent le pourcentage d'extraction de xylanes (adapté de Vuorinen et Alén, 1999).

Les polysaccharides en solution alcaline sont ensuite récupérés par précipitation après neutralisation par l'acide acétique pour les fractions hémicellulosiques les plus lourdes, et par précipitation alcoolique du filtrat résiduel pour les fractions de poids moléculaire plus faible.

Certains ions provoquent une précipitation sélective. La précipitation sous forme de complexes de barium ou de cuivre favorise par exemple l'obtention des glucomannanes (Whistler et Shah, 1978). Les sels d'ammonium quaternaires tels que les bromures de cétyl-triméthyl-ammonium ou de cétyl-pyridinium forment des complexes insolubles avec les polysaccharides acides.

### **I.4.3. Description des divers traitements**

Les prétraitements des substrats ligno-cellulosiques s'avèrent très concluants pour l'augmentation des rendements d'extraction des polysaccharides pariétaux, même si une partie de ces polysaccharides est éliminée ou dégradée lors de ces prétraitements. Le but de ces prétraitements est d'augmenter l'accessibilité des polysaccharides pariétaux. Les prétraitements physiques (broyage, explosion à la vapeur, etc ...) altèrent les propriétés physiques telles que la cristallinité ou la surface disponible alors que les prétraitements chimiques (alcalis, acides, oxydants, ...) déstructurent les substrats ligno-cellulosiques et diminuent la teneur en lignines. La combinaison de plusieurs prétraitements est souvent employée.

#### ***I.4.3.a. Traitement mécanique***

La taille et la forme des particules solides a une influence sur le rendement d'extraction. Plusieurs travaux ont montré que le rendement d'extraction des hémicelluloses augmente quand la taille du solide diminue. Le broyage réduit la taille des particules solides, augmentant ainsi la surface d'échange.

#### ***I.4.3.b. Traitement à la vapeur***

Les liaisons hydrogène sont sensibles à la vapeur sous pression. L'action de la vapeur conduit à une solubilisation de la cellulose et des hémicelluloses en brisant les liaisons chimiques entre la lignine et les polysaccharides. L'extraction à la vapeur (steam explosion)

constitue une alternative intéressante à l'extraction alcaline, qui présente l'avantage de préserver l'acétylation des résidus xylose. Il est à noter que le traitement à la vapeur génère de l'acide acétique par l'hydrolyse des groupements acétyle, qui joue alors le rôle de catalyseur de l'hydrolyse, ce qui conduit à la diminution importante du degré de polymérisation (DP) des molécules extraites.

#### ***1.4.3.c. Effet de la température***

Si le rendement d'extraction en hémicelluloses augmente avec la température, il en est de même pour le rendement d'extraction de la lignine et des minéraux. De plus, au delà de 100°C, et sous l'action de NaOH, des réactions de dégradation des hémicelluloses peuvent avoir lieu. Les glucuronoxylanes se dépolymérisent par rupture des liaisons glycosidiques. Au delà de 150°C, la dégradation qui touche les hémicelluloses est très prononcée et les produits de dégradation sont nombreux : xylitol, éthylène-glycol, glycérine, acides polyhydroxylés, etc... (Ebringerova, 1976). Des conditions d'extraction plus douces nécessitent des temps de réaction plus prolongés (24h et plus).

#### ***1.4.3.d. Utilisation des ultrasons***

L'ultrasonication en milieu alcalin s'est révélée très intéressante puisqu'elle conduit à une meilleure séparation à la fois quantitative (rendements d'extraction) et qualitative (DP, pureté des extraits) et ceci pour des températures d'extraction plus basses et des durées d'extraction plus courtes (Hromádková et *coll.*, 1999).

#### ***1.4.3.e. Micro-ondes et extraction***

Teleman a proposé récemment une méthode d'extraction du GX natif du bois de peuplier. L'extraction a lieu dans l'eau et est induite par une irradiation micro-ondes pendant 10 minutes (Teleman, 2000). Ces deux dernières méthodes sont en parfaite adéquation avec l'évolution de la chimie organique contemporaine qui tend à se dispenser de solvants et réactifs toxiques et à limiter les besoins énergétiques.

Comme nous l'avons montré, des hémicelluloses diverses coexistent dans la paroi végétale, ainsi que d'autres polymères auxquels elles sont plus ou moins liées, et des produits

minoritaires tels que des sucres circulants, des lipides, des protéines, des pigments, etc... Il est donc difficile d'extraire les hémicelluloses sans entraîner, du moins partiellement, les autres constituants. C'est pourquoi l'extraction des hémicelluloses peut être précédée de différentes étapes de délipidation, de délignification, et de dépectination.

#### ***1.4.3.f. Elimination des extractibles***

Ces traitements peuvent être réalisés par un mélange de solvants tels que éthanol-benzène, ou éthanol-toluène.

#### ***1.4.3.g. Déprotéination***

Les protéines peuvent être éliminées à l'eau froide ou chaude. L'inconvénient de ce traitement est alors le risque de solubiliser une partie des hémicelluloses.

#### ***1.4.3.h. Dépectination***

Les pectines sont éliminées de façon séquentielle, fonction de leur degré de méthylestérification, d'abord par traitement à l'eau chaude, puis en utilisant un chélateur de calcium.

#### ***1.4.3.i. Désoxygénation***

Elle a pour intérêt de préserver la qualité et les propriétés des hémicelluloses, et de les protéger de la dégradation alcaline (Salimath et Tharanathan, 1982). Il est alors recommandé d'opérer sous atmosphère d'azote.

#### ***1.4.3.j. Traitement par les borohydrures alcalins***

Le traitement de la matière végétale par des réducteurs tels que les borohydrides ou les borates avant l'extraction permet d'éviter la dégradation et l'altération des hémicelluloses par les réactifs d'extraction tels que les alcalis. Le borohydrure réduit la fonction aldéhyde terminale des hémicelluloses et empêche ainsi les réactions de dégradation par le processus de peeling. Les borates se complexent avec les groupements hydroxyles des hémicelluloses et les rendent plus stables.

### ***1.4.3.k. Délignification***

La délignification augmente l'accessibilité des réactifs aux constituants de la matière végétale. Le résidu obtenu, constitué de cellulose et d'hémicelluloses, est appelé holocellulose.

Toutes les méthodes de délignification sont des réactions d'oxydation permettant l'entraînement de la lignine, utilisant des agents électrophiles, car ils peuvent oxyder à la fois les structures phénoliques et non phénoliques de la lignine. Ils agissent par rupture de double liaison (C=C) (Lai, 2001). Les oxydants utilisés classiquement sont le chlorite de sodium en milieu acide ou le chlore. D'autres méthodes plus douces utilisent une solution diluée d'acide *peracétique*.

Idéalement la procédure de délignification devrait éliminer totalement les lignines sans dissolution ou modification des polysaccharides ; cependant aucune méthode n'est totalement satisfaisante et toutes présentent l'inconvénient de dégrader partiellement les hémicelluloses. Certains groupements réducteurs terminaux, ainsi que certains hydroxyles primaires et secondaires peuvent être oxydés et former de nouveaux groupements carboxyle ou carbonyle. On peut observer également une désacétylation partielle. En pratique, la délignification implique toujours une certaine perte de la quantité de sucres (<5% par rapport à la quantité totale), sans pour autant totalement éliminer la matière ligneuse.

Le protocole classique de délignification, décrit par Adams (1965) utilise une solution aqueuse de chlorite de sodium à pH 4 (tamponnée par de l'acide acétique), à 75°C, durant 3h. En général deux traitements suffisent pour réduire le taux de lignines. Bien que le chlorite lui-même ne soit pas trop agressif, du chlore et de l'acide hypochloreux, beaucoup plus réactifs, sont libérés *in situ*.

Des procédés impliquant une délignification par action d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de NaOH ont été utilisés avec succès y compris à une échelle pilote. La présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le milieu augmente les rendements quantitatifs d'extraction des xylanes, améliore le blanchiment des extraits par dégradation oxydative des lignines co-extraites, mais induit une diminution du DP des xylanes isolés.

On peut également extraire les lignines par acidolyse (Monties, 1988), par le dioxanne en présence d'acide chlorhydrique. Contrairement aux méthodes d'oxydations précédentes, l'acidolyse dans le dioxanne ne dégrade pas l'unité C<sub>9</sub> phénylpropane caractéristique des monomères de lignine. Les lignines sont hydrolysées et il en résulte la formation de produits homologues des trois alcools monomères précurseurs. C'est pourquoi cette méthode est également utilisée pour caractériser les lignines selon les proportions relatives des trois types de produits d'acidolyse.

#### **I.4.4. Effets de l'extraction sur la structure**

Quelle que soit la méthode d'extraction, le fait d'extraire un polysaccharide de son milieu introduit une modification de structure par rapport à l'état natif. Ainsi lors de l'extraction alcaline, il peut se produire des saponifications, provoquant l'élimination des groupements acétyles, des acides phénoliques et des fonctions méthylées portées par les acides uroniques (Whistler et Richards, 1970).

L'utilisation de solutions alcalines concentrées peut engendrer en présence d'oxygène, un « peeling » de la chaîne liée en  $\beta(1\rightarrow4)$  : les groupements hydroxyle libres de l'extrémité réductrice sont oxydés, divers intermédiaires réactionnels sont alors produits avant d'être  $\beta$ -éliminés et de laisser paraître un nouveau groupement réducteur. Ce phénomène est récurrent et se propage le long de la chaîne jusqu'à un point de branchement. Il peut être évité par l'élimination de l'oxygène du milieu en travaillant sous atmosphère inerte ou par réduction du groupement réducteur sous l'action de NaBH<sub>4</sub> (Whistler et BeMiller, 1958).

Le rendement d'extraction des hémicelluloses augmente avec la concentration de la base utilisée. L'extraction fractionnée consiste à extraire successivement les hémicelluloses avec des solutions alcalines de concentrations croissantes. L'utilisation directe d'une base concentrée permet une extraction plus rapide et plus complète mais peut provoquer la dégradation partielle des polysaccharides solubilisés à plus faible concentration (Wilkie, 1985).

## **I.5. Techniques de caractérisation des hémicelluloses**

L'étude structurale d'un polysaccharide doit permettre de préciser un certain nombre d'informations :

- la composition osidique qualitative et quantitative,
- la position des liaisons glycosidiques, ainsi que l'anométrie de ces liaisons,
- la localisation des groupements acétyle et la distribution des substituants,
- le degré de polymérisation,
- et éventuellement la structure tridimensionnelle du polymère.

### **I.5.1. Composition monosaccharidique**

La détermination de la composition monosaccharidique d'un polysaccharide nécessite dans un premier temps la rupture des liaisons glycosidiques, suivie de l'analyse et la quantification des monomères libérés, généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse ou par HPLC.

#### ***I.5.1.a. méthodes colorimétriques***

Il est souvent intéressant d'estimer de manière globale et rapide les quantités de sucres présents dans un échantillon, soit pour suivre l'évolution de la composition monosaccharidique lors des différentes étapes d'un protocole, soit pour suivre l'élution des sucres lors d'une séparation par chromatographie sur colonne. Les méthodes colorimétriques sont des techniques de dosage simples à mettre en œuvre et rapides, qui s'appliquent aussi bien à des résidus qu'à des extraits et permettent de doser de manière globale les sucres totaux et de manière spécifique les acides uroniques.

##### ***i. Principe des méthodes colorimétriques***

A haute température, les acides forts déshydratent les pentoses, les hexoses et les acides uroniques pour former respectivement des dérivés furfural, 5-hydroxyméthylfurfural et acide 5-formylfuroïque (figure 25). Ces produits absorbent dans l'UV vers 280 nm avec une absorbance proportionnelle à la quantité de sucres présents. Dans les échantillons dérivés du bois, la lignine peut cependant interférer avec le dosage des sucres. Pour diminuer ces interférences, on effectue la déshydratation en présence d'un chromogène, qui se condense



avec le dérivé furanique pour donner un chromophore dont l'absorption est déplacée dans le visible.

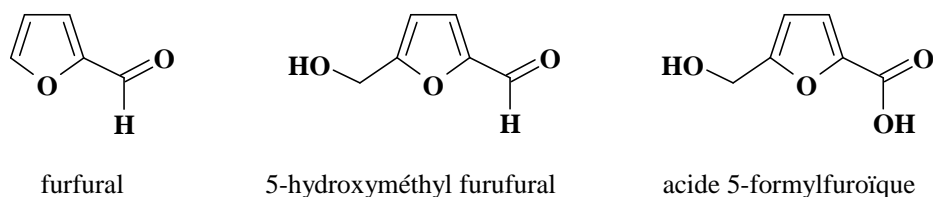


Figure 25 : dérivés furfuriques obtenus par déshydratation des pentoses, des hexoses, et des acides uroniques.

Les réactifs (chromogènes) classiquement utilisés sont le phénol, l'anthrone et l'orcinol (figure 26). Le développement de la coloration, la longueur d'onde à laquelle on observe l'absorption maximale, ainsi que l'intensité de l'absorbance dépendent des réactifs, de la nature et de la structure du sucre dosé (hexose, pentose, acide uronique ou sucre réducteur) et des conditions de réaction (température, temps de réaction et concentration de l'acide).

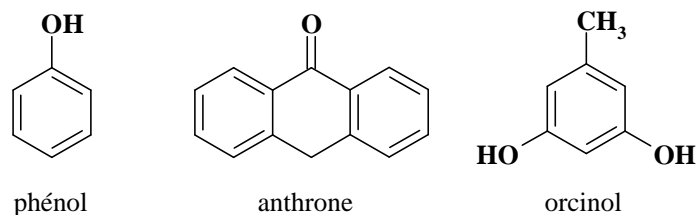


Figure 26 : Exemples de chromogènes utilisés pour les dosages colorimétriques

Appliqué au dosage des hémicelluloses, la méthode nécessite l'hydrolyse du polysaccharide. Celle-ci est réalisée simultanément à la cyclodéshydratation dans la mesure où les acides forts permettent la coupure des liaisons osidiques.

### *ii. Dosage des sucres totaux dans les hémicelluloses*

Les méthodes usuelles du dosage des sucres totaux utilisent comme réactif de coloration l'anthrone, l'orcinol ou le phénol. La méthode à l'anthrone favorise plutôt le dosage des hexoses (Dubois, 1956), alors que le phénol convient mieux au dosage des pentoses. C'est cette méthode qui peut être appliquée au dosage des xylanes.

### *iii. Dosage des acides uroniques dans les hémicelluloses*

Les réactifs les plus sélectifs pour le dosage des acides uroniques sont le carbazol (Thibault et Robin, 1975 ; Dische, 1946), le métahydroxydiphényle (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973), le 3,5-diméthylphénol, ainsi que d'autres dérivés phénoliques. La méthode au carbazol est peu applicable aux extraits aqueux car la présence d'eau affecte la stabilité du complexe coloré (Dische, 1946) ; nous choisirons la méthode au réactif métahydroxydiphényle ou MHDP en présence de tétraborate, développée par Blumenkrantz, sélective vis-à-vis des acides uroniques et rapide. La présence de borates dans le milieu permet d'améliorer la sélectivité de ce réactif vis-à-vis des acides glucuroniques.

L'application de la méthode de correction de Montreuil et Spik (1963) permet de déterminer les quantités relatives en oses neutres et en acides uroniques, en tenant compte de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres et réciproquement.

### *iv. Dosage des oses réducteurs dans les hémicelluloses*

Le pouvoir réducteur des glucides peut être déterminé par la méthode de Nelson-Somogyi (1952) ou par celle à l'acide parahydroxybenzoïque hydrazide (PAHBAH) de Lever (1972) décrite dans la partie expérimentale.

#### *1.5.1.b. méthodes chromatographiques*

Pour déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on opère le plus souvent par séparation et détection des monomères constitutifs après leur hydrolyse.

##### *i. Hydrolyse des liaisons glycosidiques*

La méthode utilisée pour rompre les liaisons glycosidiques doit permettre l'hydrolyse complète des liaisons tout en préservant les monomères obtenus de toute dégradation secondaire.

Le principe consiste à mettre en contact la matière végétale ou les polysaccharides isolés avec un acide fort. La variation assez importante des conditions d'hydrolyse décrites dans la littérature est attribuée à la diversité des produits soumis à l'hydrolyse. Les échantillons contenant de la cellulose sont hydrolysés par des acides minéraux forts ou par

l'acide trifluoroacétique, capables d'attaquer la structure cristalline de la cellulose ; notons que des méthodes d'hydrolyse enzymatique peuvent également être employées (Buchert, 1993). L'hydrolyse par l'acide sulfurique se fait dans la plupart des cas en deux étapes. Une première étape correspondant à l'imprégnation, au gonflement des fibres, appelée préhydrolyse, est effectuée à concentration élevée ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  72%), pour des temps de contact courts, à 30°C. Puis le substrat est traité par l'acide dilué ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  4%), à reflux pendant 3 à 6h ; après traitement l'acide doit être neutralisé. Une méthode alternative, permettant d'éviter les dégradations non spécifiques qui ont lieu lors de l'hydrolyse à l'acide sulfurique, utilise le TFA 1 à 4M à reflux pendant 1h ; cette méthode présente l'avantage d'être rapide et permet une élimination simple de l'acide par entraînement en présence de méthanol.

### *ii. Résistance de la liaison uronosidyle dans les 4-O-méthylglucuronoxylanes*

De manière générale, le rendement d'hydrolyse dépend à la fois des conditions de l'hydrolyse et de la nature des polysaccharides. Certaines hémicelluloses, contenant des acides uroniques, sont plus difficiles à hydrolyser que des polysaccharides neutres. Ceci est dû à la résistance particulière de la liaison xylose-acide uronique à l'hydrolyse acide. Dans ces conditions, une telle résistance à l'hydrolyse conduit à l'obtention d'un mélange de monosaccharides et d'acides aldobiuroniques (dimères constitués d'un ose neutre et d'un acide uronique).

La stabilité relative du disaccharide à l'hydrolyse acide s'explique par les effets du groupement carboxyle en C-5 (figure 27). Le doublet de l'oxygène, déjà engagé dans une liaison hydrogène avec le carboxyle en C-5, est moins disponible pour stabiliser, par délocalisation, le carbocation qui se formerait lors d'un mécanisme d'hydrolyse acide (figure 28).

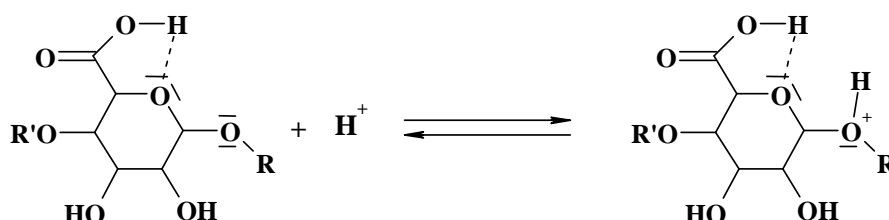


Figure 27 : Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide, d'après Timell et coll., 1965.

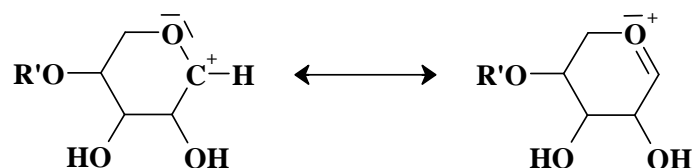


Figure 28 : stabilisation du cation formé lors de l'hydrolyse des xylanes.

L'emploi d'un acide plus concentré pour l'hydrolyse peut entraîner une dégradation des acides uroniques libérés par décarboxylation. De plus une élévation de la température de réaction provoque la dégradation de certains oses neutres et notamment le xylose (Blakeney, 1983). L'hydrolyse acide classique n'est donc que partielle et à titre d'exemple, dans le cas de l'hydrolyse du bois, 66% en masse d'acides uroniques restent liés au xylose (Shimizu, 1991).

Pour pallier ces difficultés, certains auteurs préconisent la mise en œuvre de l'hydrolyse enzymatique (Dekker et Richards, 1976). Remarquablement sélective, elle est réalisée dans des conditions douces de température. Mais elle nécessite autant d'enzymes différentes que de types de liaisons mises en jeu dans les polysaccharides. Cette méthode est d'autant plus difficile à mettre en œuvre que certaines de ces enzymes ne sont pas disponibles commercialement.

Une méthode alternative et rapide pour l'hydrolyse des liaisons glycosidiques dans les hémicelluloses est la méthanolyse (figure 29). Elle ne peut être appliquée qu'à l'analyse d'échantillons non cristallins. Une conversion quasi totale en méthylglycosides est généralement atteinte par chauffage pendant 24 heures à 80°C, en présence de méthanol chlorhydrique 1M. Les liaisons uronosidyles sont alors rompues probablement du fait de l'estérification des unités d'acides uroniques. De plus ces acides uroniques libérés sont mieux préservés dans le cas de la méthanolyse étant donné qu'ils sont convertis en méthylglucuronosides très stables (Huang, 1992).

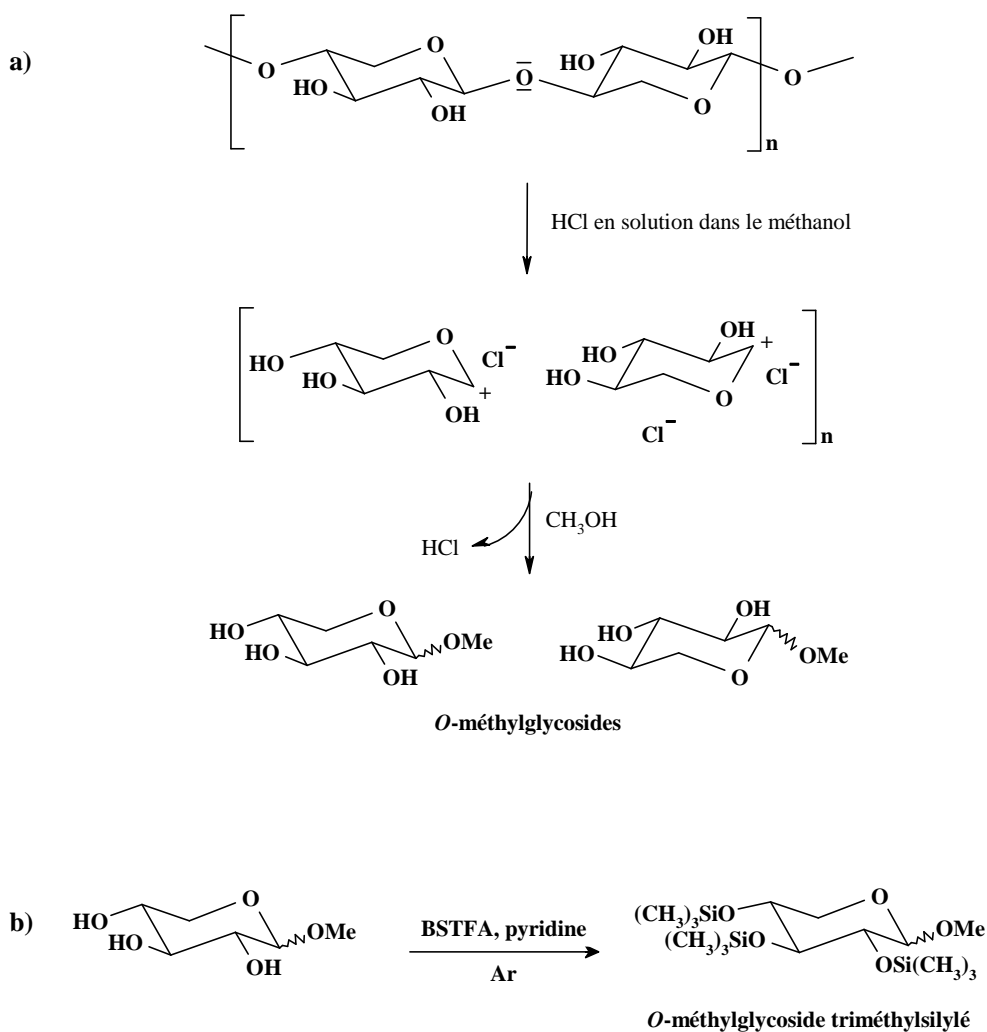


Figure 29 : Préparation des dérivés TMS ; a) méthanolyse ; b) triméthylsilylation.

### iii. Séparation CPG / HPLC

L'analyse des méthylglycosides libérés après hydrolyse peut être réalisée par les techniques de chromatographies gazeuses ou liquides.

La chromatographie liquide haute performance permet de réaliser directement, sans modification de l'échantillon, et à faible température, la séparation des différents monosaccharides. Les systèmes chromatographiques sont nombreux.

La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse rapide, qui du fait de sa grande sensibilité, et de sa capacité à séparer de mélanges complexes se révèle être la

technique la plus adaptée à l'analyse des méthylglycosides triméthylsilylés des résidus et extraits végétaux. L'analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse nécessite au préalable la dérivation des méthylglycosides en composés plus volatils.

*iv. Méthodes de dérivation des sucres pour l'analyse CPG*

Les produits volatils dérivés des sucres sont nombreux (tableau 5), les techniques de dérivation les plus courantes étant la *per*triméthylsilylation des monosaccharides (ou de leur méthylglycosides), et la réduction des monosaccharides en alditols par le borohydrure de sodium suivie de leur acétylation par l'anhydride acétique en présence de N-méthylimidazole (Blakeney, 1983). Les dérivés aldonitriles acétates et trifluoroacétates ont été également couramment décrits et les méthyloximes acétates sont parfois employés. Les produits volatils obtenus sont détectés par ionisation de flamme (détecteur FID).

Tableau 5 : Méthodes de dérivation des monosaccharides.

<b>Méthodes de dérivation</b>	<b>dérivé</b>	<b>Références</b>
<i>Per</i> triméthylsilylation	<i>TMS</i>	Bleton et coll. (1996)
Acétylation	<i>acétates</i>	Biermann (1989)
Trifluoroacétylation	<i>trifluoroacétates</i>	Englmaier (1989)
Réduction/actétylation	<i>alditols acétates</i>	Black and Fox (1996)
Oximation/acétylation	<i>aldonitriles acétates</i>	McGinnis (1989)
<i>O</i> -méthyloximation/acétylation ou triméthylsilylation	<i>O</i> -méthyloxime acétates ou <i>O</i> -méthyloxime <i>TMS</i>	Neeser and Schweizer (1989)

En solution, les sucres (aldoses et cétooses) existent en équilibre dynamique entre les formes cycliques et ouverte (seulement à l'état de traces pour cette dernière forme). Lors de la cyclisation (formes pyranose et/ou furanose), deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent être formés pour chacune des formes pyranose et furanose, dépendant de l'orientation de l'hydroxyle anomérique (figure 30). Si la dérivation conserve l'anomérie du sucre, deux à quatre isomères peuvent être observés pour chaque monosaccharide, certains sucres existant soit sous forme pyranose soit sous forme furanose et d'autres présentant les deux formes.

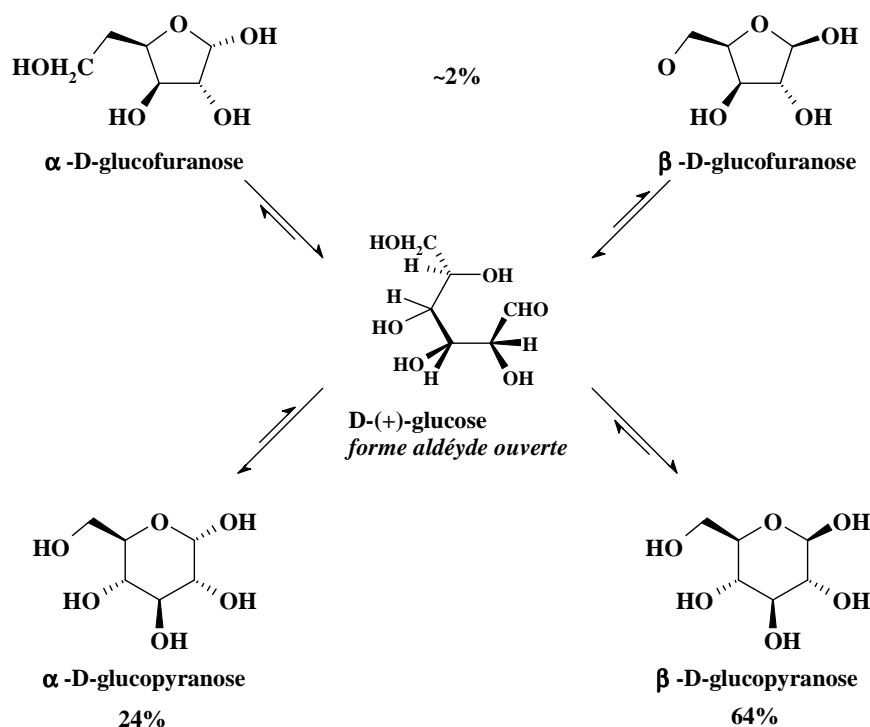


Figure 30 : Equilibre mutarotationnel du glucose en solution.

Les alditols acétates sont largement utilisés du fait que ce sont des dérivés extrêmement stables, contrairement aux dérivés trifluoroacétyles et triméthylsilyles (très sensibles à l'humidité), et qu'ils sont mieux séparés que les autres dérivés étant donné que chaque sucre ne donne qu'un pic ; en effet la réduction des sucres en alditols élimine l'anomérisation. De même, dans le cas des dérivés *O*-méthyloxime acétates (Murphy and Phenlock, 1972), l'anomérisation n'est pas conservée ; certains sucres apparaissent cependant sous la forme de deux pics, dus à la présence des deux conformations syn et anti. Les dérivés trifluoroacétyles et triméthylsilyles sont quant à eux obtenus sans perte de l'anomérisation.

La silylation est la méthode de dérivation des méthylglycosides obtenus par méthanolyse des polysaccharides. En effet cette méthode présente l'avantage de permettre l'identification simultanée des hexoses, déoxyhexoses, pentoses et acides uroniques et osamines. Les dérivés triméthylsilylés sont formés par réaction des monosaccharides avec un mélange d'hexaméthylidisilazane (HMDS) et de chlorure de triméthylsilane (TMCS) dans la pyridine anhydre (Sweeley, 1963). D'autres agents silylants sont maintenant couramment utilisés pour la dérivation des monosaccharides ; notamment on emploie fréquemment un

mélange de deux réactifs, le BSTFA (N,O-Bis-triméthylsilylacétamide) (95%) et le TMCS (5%) dans la pyridine anhydre (figure 29).

#### v. *Chromatogramme témoin*

La séparation des dérivés TMS par chromatographie en phase gazeuse nécessite, au préalable, l'analyse des monosaccharides standards, comprenant les oses neutres et les acides uroniques présents dans les substrats végétaux. Chaque unité glucidique, après méthanolyse et dérivatisation, donne lieu à plusieurs pics chromatographiques, correspondant aux anomères  $\alpha$  et  $\beta$ , ainsi qu'aux formes pyranose et furanose. Dans le cas des acides uroniques, en plus des anomères  $\alpha$  et  $\beta$ , les formes lactones ont été observées, dans le cas où la configuration du sucre permet leur formation (ce qui est possible dans le cas de l'acide glucuronique, contrairement à l'acide galacturonique). Le nombre de pics (entre deux et quatre), leurs temps de rétention et leurs proportions relatives sont caractéristiques de chaque monosaccharide. Ceci facilite l'identification des différents sucres en mélange même si le chromatogramme devient plus complexe du fait du nombre important de pics observés.

Il est donc possible d'établir, à partir d'échantillons commerciaux de chacun des sucres, un chromatogramme témoin, permettant la caractérisation des sucres présents dans un extrait ou résidu polysaccharidique de sciures de bois (figure 31).

Comme nous l'avons précédemment développé, l'hémicellulose majoritaire des bois de feuillus est un 4-*O*-méthylglucuronoxylane. Son analyse par CPG requiert donc essentiellement deux sucres témoins : le xylose, disponible commercialement, et l'acide 4-*O*-méthylglucuronique non disponible.



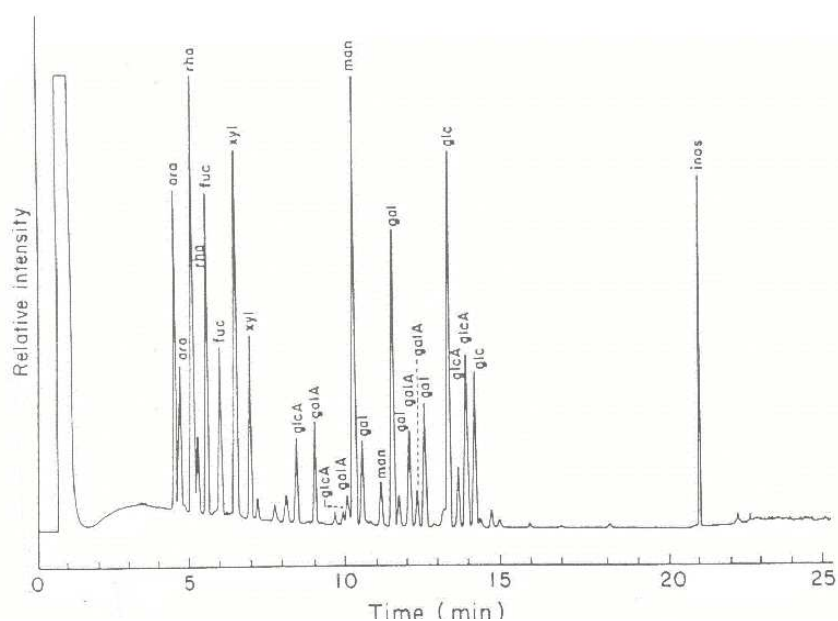


Figure 31 : Chromatogramme témoin des dérivés TMS des oses neutres et acides uroniques (York et coll., 1986)

Idéalement, un spectromètre de masse couplé à la CPG nous aurait permis une identification directe de ce sucre ; D'une part, ne disposant pas de ce matériel pour des analyses de routine, et d'autre part, compte-tenu du savoir faire de notre laboratoire dans le domaine de la synthèse glucidique, nous avons choisi de synthétiser ce sucre témoin. Le choix de la méthode de synthèse est développé dans le chapitre II.

### I.5.2. Analyse structurale

Les procédés d'analyse structurale permettent la détermination partielle ou totale de la structure des polysaccharides.

#### I.5.2.a. Position des liaisons glycosidiques

L'analyse par CPG-SM des polysaccharides après méthylation a pour objectif de préciser la structure des polysaccharides en identifiant les différents types de liaisons qui associent les monosaccharides. Elle débute par la perméthylation de toutes les fonctions hydroxyle libres. Les monosaccharides partiellement méthylés sont par la suite libérés par hydrolyse acide (ou par méthanolyse) avant d'être réduits par le NaBD<sub>4</sub>. Ce dernier permet, par rapport au NaBH<sub>4</sub>, de différencier le C1 du C6 du monosaccharide réduit puisque seul le

carbone de la fonction réductrice est porteur d'un deutérium. L'acétylation des fonctions hydroxyle libres, c'est à dire engagées à l'origine dans une liaison osidique, conduit à la caractérisation des modes d'association entre les monosaccharides (figure 32). Les acétates d'alditols partiellement méthylés ou méthylglycosides partiellement méthylés et acétylés obtenus soit par hydrolyse acide soit par méthanolyse, sont ensuite caractérisés par CPG-SM.

L'analyse par méthylation renseigne donc sur la nature des unités et leurs modes d'enchaînement dans un polysaccharide ; elle fournit également une information concernant l'existence de branchements, mais ne donne aucune précision quant à la longueur des chaînes latérales. Elle ne renseigne ni sur l'anométrie des liaisons, ni sur la séquence des monosaccharides dans le polysaccharide.

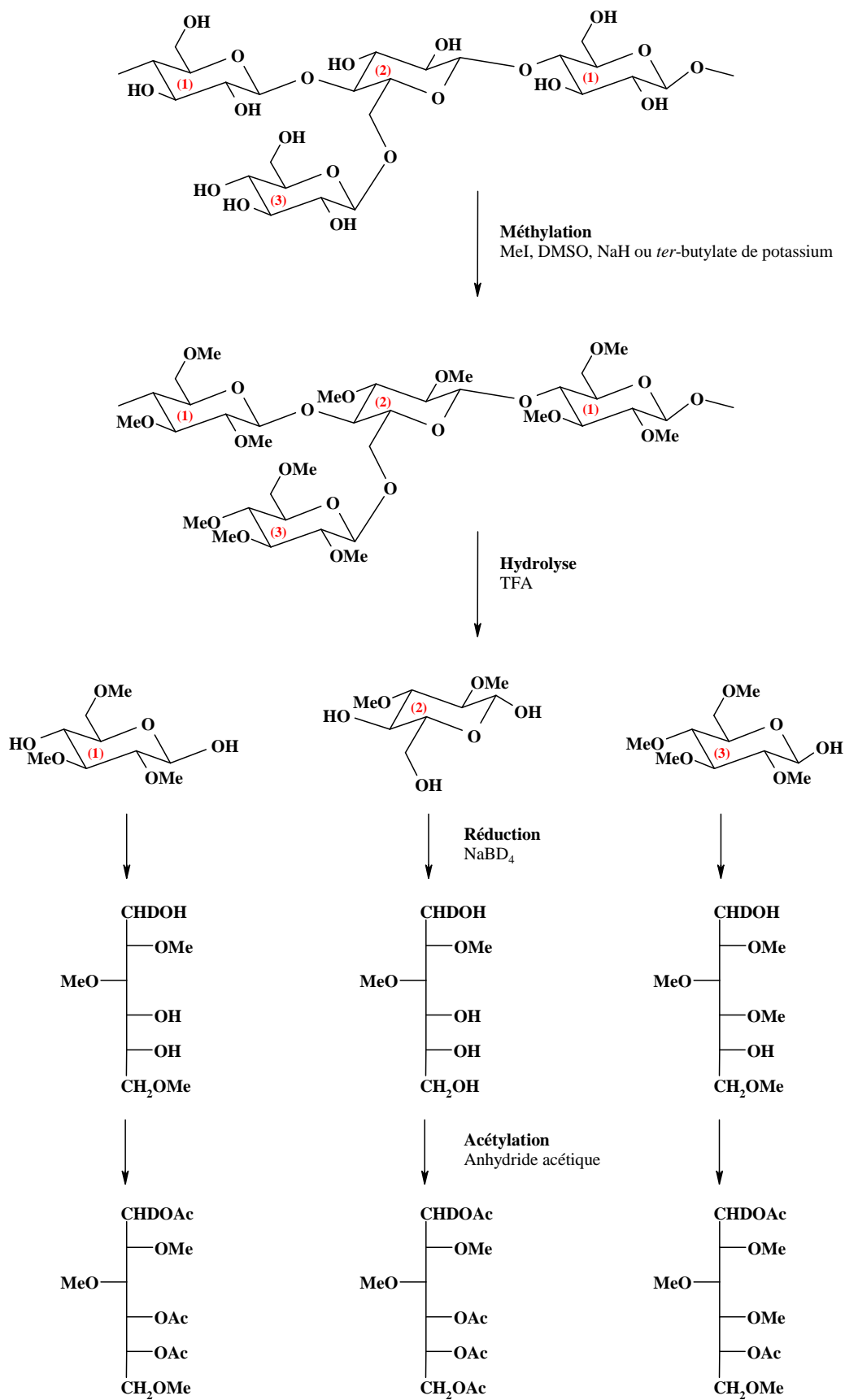


Figure 32 : analyse structurale des polysaccharides. Préparation des alditols partiellement méthylés partiellement acétylés.

### ***1.5.2.b. Séquence***

La méthodologie de l'analyse d'un polysaccharide repose souvent sur l'obtention d'unités oligosaccharidiques plus faciles à caractériser sous forme native par SM-MALDI,  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  RMN ou après dérivation par CPG et CPG-SM comme nous l'avons vu précédemment. La dépolymérisation peut être effectuée de différentes manières, hydrolyse enzymatique ou hydrolyse acide, dans des conditions opératoires variables (avec différents acides, des temps d'hydrolyse plus ou moins longs, etc...), mais le type de rupture et l'importance de la dépolymérisation ne dépend pas uniquement des conditions expérimentales, mais également de la structure du polymère lui-même. En effet, les stabilités relatives des liaisons osidiques du polysaccharide conditionnent l'hydrolyse partielle. Dans le cas des polysaccharides contenant des acides uroniques, nous avons déjà souligné la stabilité particulière de la liaison uronosidique.

#### ***i. Hydrolyse enzymatique***

Les méthodes les plus efficaces sont naturellement celles qui font appel aux enzymes spécifiques qui vont permettre l'obtention d'unités de répétition plus facilement analysables. Ce mode de préparation est particulièrement bien adapté à des polymères homogènes tels que les GX qui sont composés d'enchaînements homogènes de résidus D-Xylp. La dégradation complète des GX en monomères nécessite l'action combinée d'endo- ou d'exoenzymes qui non seulement hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale, mais également libèrent les constituants des chaînes latérales. L'ensemble des activités nécessaires à la rupture des liaisons de la chaîne principale est regroupé sous le terme général de xylanases alors que celles qui éliminent les chaînes latérales sont parfois appelées enzymes accessoires (Bonnin *et al.*, 1997 ; figure 33). Les xylanases sont très largement répandues dans tous les compartiments du monde vivant, notamment des microorganismes (bactéries, levures et champignons). Les endoxylanases (1,4- $\beta$ -D-xylane-4-xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8) rompent la liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) à l'intérieur de la chaîne principale de xylane. Elles libèrent des oligomères linéaires ou substitués de fort, puis de faible DP. Les spécificités de reconnaissance des sites de coupure des endoxylanases sont multiples et variables selon les sources. La majorité des endoxylanases décrites dans la littérature sont capables d'hydrolyser une liaison dans un environnement non substitué. Cette règle générale a pourtant des exceptions. Citons, à titre d'exemple, une endoxylanase purifiée de *Bacillus subtilis* qui reconnaît un résidu acide glucuronique latéral et hydrolyse la liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-xylosyl du

xylose non substitué adjacent. Elle est ainsi désignée sous le terme de glucuronoxylane xylanohydrolase (Nishitani et Nevins, 1991). Les xylosidases (1,4-β-D-xylane-4-xylohydrolase, E.C. 3.2.1.37) hydrolysent de petits oligomères libérés par les endoxylanases, en xylose monomère. Dans le cas des GX, les enzymes accessoires impliquées dans la libération des substituants sont de deux types. Les glucuronidases (xylane-α-D-1,2-glucuronohydrolase, E.C. 3.2.1.131) libèrent l'acide glucuronique ou son dérivé méthylé, l'acide 4-*O*-méthyl glucuronique, fixés sur la chaîne de xylane par une liaison α-(1→2) (Siika-Aho et al., 1994). Leur action se conjugue à celle des endoxylanases strictes pour l'hydrolyse totale des xylanes. Les xylanes acétylestérases (E.C. 3.2.1.6) sont encore peu décrites dans la littérature. Elles sont capables de libérer de l'acide acétique à partir d'un xylane dont des résidus xylose portent un groupement acétyle sur les carbones C2 ou C3. Elles sont importantes dans l'hydrolyse des xylanes car la présence de groupements acétyle sur le squelette principal est un obstacle à l'adsorption des endoxylanases sur leur substrat (Biely et coll., 1986). L'hydrolyse enzymatique va conduire à l'obtention de différents xylo-oligosaccharides neutres et acides.

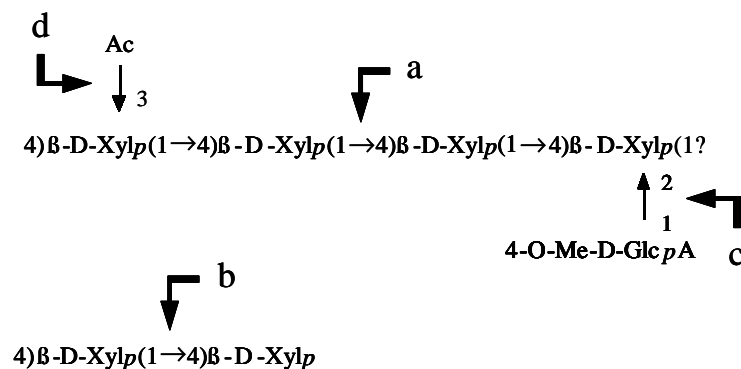


Figure 33 : Hydrolyse enzymatique de GX (d'après Bonnin et coll., 1997), a : 1,4 β D xylane-4-xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8 ; b : 1,4 β D xylane-4-xylohydrolase, E.C. 3.2.1.37 ; c : xylane α D 1,2 glucuronohydrolase, E.C. 3.2.1.31 ; d : acétyl-estérase (E.C. 3.2.1.6).

### ii. Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide ménagée non sélective constitue parfois une approche complémentaire à l'hydrolyse enzymatique. Grâce au caractère aléatoire de l'hydrolyse acide, certains motifs structuraux du polysaccharides peuvent être identifiés dans plusieurs oligosaccharides, ce qui peut permettre de reconstruire le polymère à partir des structures oligosaccharidiques (figure 34). Quand les liaisons glycosidiques du polysaccharide sont

comparables en terme de stabilité, l'hydrolyse acide fournit un mélange statistique d'oligosaccharides et de monosaccharides ; c'est le cas des polysaccharides neutres.

Dans le cas des polysaccharides acides, comme les glucuronoxylanes, la stabilité chimique des liaisons impliquant des acides uroniques confère à ces dernières une résistance parfois importante aux acides forts tels que HCl ou TFA, y compris à une température élevée. C'est pourquoi on obtient généralement une grande proportion d'acides aldobiuroniques par hydrolyse acide de ces xylanes (Timell, 1967). L'hydrolyse partielle est alors toujours statistique mais tient compte des stabilités relatives des liaisons osidiques ; on parle alors d'hydrolyse sélective. Comme dans le cas de l'hydrolyse enzymatique, l'hydrolyse chimique va conduire à l'obtention de différents xylo-oligosaccharides neutres et acides.

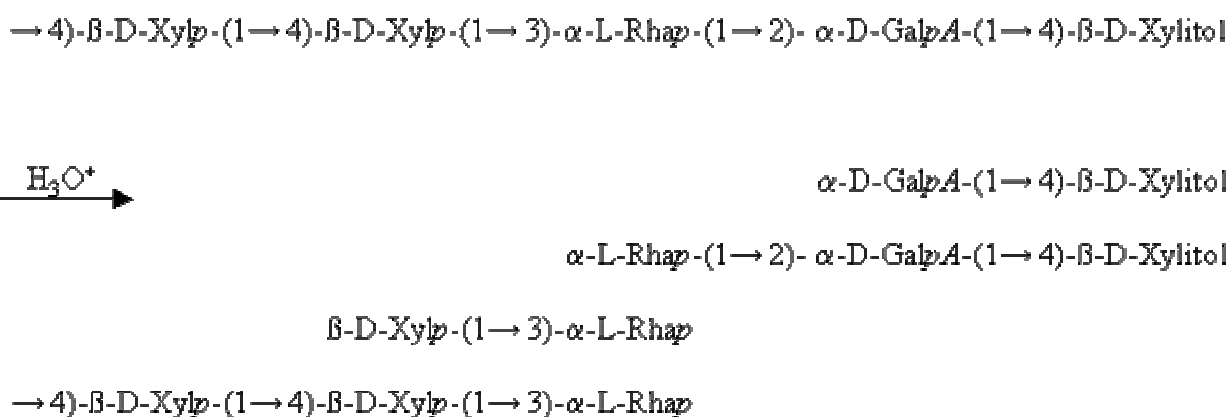


Figure 34 : Principe de l'analyse d'un polysaccharide à partir de l'étude des oligosaccharides libérés après hydrolyse partielle du polysaccharide (Vuorinen et Alèn, 1999).

La figure 35 illustre le mécanisme général de l'hydrolyse acide des liaisons glycosidiques, incluant 3 étapes successives : la protonation de l'oxygène anomérique, suivie de la décomposition de l'acide conjugué pour former un ion oxonium, qui peut exister en conformation demi-chaise ; cette étape est déterminante. La dernière étape est une addition d'eau rapide pour régénérer une extrémité réductrice. Des travaux ont montré que la présence d'un groupement carboxylique en C5 du méthylglucose (méthylglucuronoside) réduit la vitesse de l'hydrolyse de 50 à 70%. Entre les hydrolyses des liaisons glycosidiques du cellobiose et de l'acide cellobiuronique, la vitesse diminue de 97%. Cette diminution de

réactivité s'explique par les effets inducteurs et conformationnels du groupement carboxyle en C-5, ce que nous avons déjà expliqué précédemment.

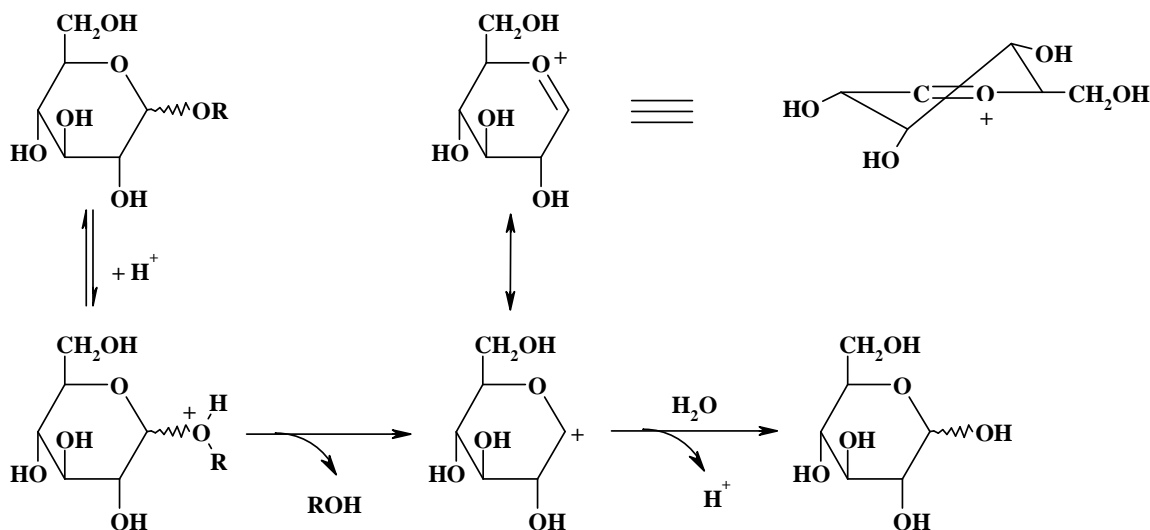


Figure 35 : Mécanisme de l'hydrolyse acide des glucopyranosides (Timell, 1964).

### iii. Autohydrolyse

L'autohydrolyse des polysaccharides est une méthode d'hydrolyse douce, suivant le même mécanisme que l'hydrolyse acide mais catalysée par les fonctions carboxyliques et sulfates portées par les acides uroniques qui entrent dans la composition du polysaccharide. L'autohydrolyse des polysaccharides consiste donc en leur hydrolyse par leurs propres groupements acides. Cette méthode a été développée pour l'étude des polysaccharides sulfatés et de phycocolloïdes anioniques (Ciancia et Cerezo, 1993).

La sélectivité de cette réaction d'autohydrolyse est basée sur la différence de stabilité des liaisons glycosidiques mises en jeu, mais elle dépend également de la distribution des groupements acides autour de ces liaisons glycosidiques, catalysant l'hydrolyse. Ainsi comme le montre la figure 36, la liaison glycosidique la plus labile d'un polysaccharide acide est la liaison précédent l'unité d'acide uronique dans la chaîne polysaccharidique.

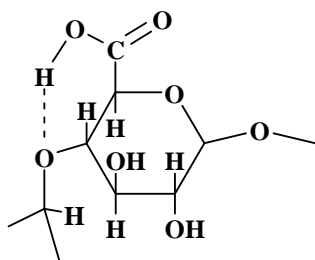


Figure 36 : Catalyse intramoléculaire de l'hydrolyse acide de la liaison glycosidique précédant l'acide uronique dans la chaîne polysaccharidique par le groupement carboxylique (Ciancia et Cerezo, 1993).

Très simple à mettre en œuvre, l'autohydrolyse nécessite au préalable de convertir les polysaccharides en leur forme acide par simple passage sur résine échangeuse d'ions. Les protocoles se déroulent ensuite dans des conditions de température et de pression déterminées selon la nature du polysaccharide. Classiquement, les conditions retenues vont de la température ambiante et à pression atmosphérique jusqu'à des températures de 190°C à 13 bars (c'est par exemple le cas du vapocraquage du bois que nous définirons par la suite). Une telle méthode conduit à la libération d'oligosaccharides de DP variables. L'autohydrolyse, méthode d'hydrolyse peu agressive, permet de protéger le polysaccharide des déacétylations ou désulfatations possibles et ainsi de conserver des renseignements précieux quant à la structure du polysaccharide.

#### *iv. Méthodes d'hydrolyses spécifiques*

D'autres méthodologies sont employées pour obtenir une hydrolyse spécifique. L'acétylyse, réalisée en présence d'anhydride acétique ou d'un mélange anhydride acétique, acide acétique, acide sulfurique 10:10:1 (Lindberg et coll., 1975), favorise la rupture des liaisons glycosidiques comprenant des hydroxyles primaires, et représente donc une méthode d'hydrolyse spécifique des liaisons (1→6). La β-élimination constitue également une technique de dégradation chimique pour les polysaccharides acides. La dégradation des polysaccharides acides par le lithium dans l'éthylène diamine (Mort et Bauer, 1982) est une méthode de dégradation des acides uroniques.

#### *1.5.2.c. Séparation des oligosaccharides*

La séparation des mélanges d'oligosaccharides après hydrolyse est certainement l'étape la plus fastidieuse de l'étude structurale d'un polysaccharide.



Les fractions oligosaccharidiques peuvent être séparées par tamisage moléculaire (chromatographie d'exclusion stérique) en fonction de leur masse moléculaire ou plus exactement en fonction de leur volume hydrodynamique ; d'autres méthodes de séparation sont liées à la charge des molécules (chromatographie d'échange d'ions), à leur polarité (chromatographie en phase inverse), et plus rarement à leur structure (chromatographie d'affinité).

#### ***1.5.2.d. Structure des oligosaccharides***

##### ***i. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)***

La spectroscopie RMN est une méthode physico-chimique qui seule permet à l'heure actuelle de déterminer la structure primaire complète d'une chaîne oligosaccharidique. Cette méthode permet de réaliser le dosage et l'identification de chacun des monosaccharides, de préciser l'enchaînement des monomères, les points de branchement et les anoméries.

Le spectre proton  $^1\text{H}$  à une dimension permet tout d'abord de déterminer la valeur des déplacements chimiques de chaque proton identifiable et éventuellement de les comparer avec ceux décrits dans les banques de données ; il renseigne également sur le nombre de résidus monosaccharidiques (nombre de protons anomères). Les spectres COSY (Correlation Spectroscopy) homonucléaire (corrélation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) permettent de mesurer toutes les constantes de couplage (J) et les déplacements chimiques des protons qui résonnent dans la « bulk region », entre 3,2 et 4 ppm, renfermant de nombreux protons avec des fréquences de résonance proches ce qui rend leur distinction très difficile. Ainsi il est possible de déterminer la nature des monosaccharides, leur configuration anomérique, et la nature du cycle (pyranose ou furanose). Le couplage  $^3\text{J}$  des protons anomériques renseigne effectivement sur l'anomérie : si H2 est axial, la constante de couplage est comprise entre 2 et 4 Hz pour les  $\alpha$ -pyranoses, et entre 7 et 9 Hz pour les  $\beta$ -pyranoses. Si H2 est équatorial, la différence est plus faible. D'une manière générale, les carbones anomériques résonnent à des champs forts ( $\delta_{\text{C1}} \approx 100$  ppm) pour des cycles pyranoses comportant un substituant axial en position anomérique, alors que les autres pyranoses résonnent vers 105 ppm. Des déplacements vers les champs plus faibles ( $\delta_{\text{C1}} \approx 110$  ppm) sont caractéristiques de la plupart des composés furanoses (van Halbeek, 1994).

Les spectres HMQC (Heteronuclear MultiQuantum Coherence) permettent de corréler chaque proton avec le carbone auquel il est lié (spectre  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ). Dans ce cas, outre l'identification des carbones et la détermination de leurs déplacements chimiques, l'observation d'un déblindage des carbones permet de déterminer la substitution, c'est à dire les points de branchements des monosaccharides. Enfin les spectres HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) donne les couplages  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  et les constantes  $^3J$  associées, permettant de corréler les noyaux distants de trois liaisons covalentes. Notamment les constantes  $^3J_{\text{H1,Cx}}$  où x est la position du carbone du monosaccharide voisin inclus dans la liaison glycosidique (figure 37), permettent de préciser l'enchaînement des monosaccharides, donc la séquence de l'oligosaccharide.

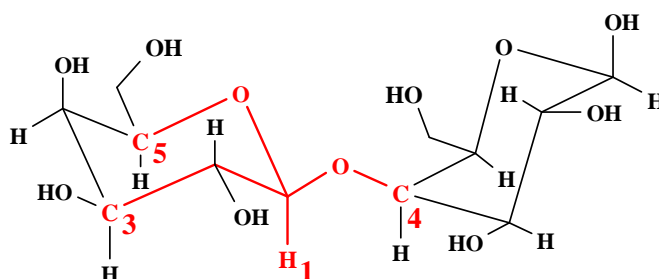


Figure 37 : Représentation des corrélations  $^3J_{\text{H,C}}$  (en rouge) proton-carbone observées à partir du proton H1 dans un spectre HMBC . La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison glycosidique.

La liaison entre chaque unité monosaccharidique peut être déterminée également par application de l'effet nOe (nuclear Overhauser enhancement) qui fournit généralement des pics de corrélation intenses entre les protons H1 et Hx de deux sucres reliés par une liaison  $1 \rightarrow x$  (Strecker, 1993).

La RMN, méthode spectroscopique non destructive, permet donc d'établir la structure complète d'un oligosaccharide, même complexe, à la seule condition de disposer d'une quantité appréciable de matériel glucidique (5 à 10  $\mu\text{mol}$  soit entre 2 et 10 mg)

### ii. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse complémentaire à la RMN. Cette technique était employée à l'origine pour caractériser les éthers méthyliques résultant des expériences de perméthylation, la position des groupements méthyle de chaque

monosaccharide issu d'une hydrolyse acide étant caractéristique des liaisons entre monomères. Mais ce résultat ne permet pas d'accéder à la séquence oligosaccharidique.

Même si la méthode est destructive pour l'échantillon, la spectrométrie de masse présente l'avantage de ne nécessiter que de très faibles quantités de matériel (10 à 1000 fois moins que pour la RMN). La clé de l'analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse réside dans le choix de la technique d'ionisation. Ces dernières années, des méthodes d'ionisation par désorption ont été mises au point, qui peuvent être appliquées à des échantillons non volatils puisqu'elles ne nécessitent pas la vaporisation du substrat à analyser ; elles provoquent directement la formation d'ions gazeux. Les spectres ainsi obtenus sont très simples, constitués essentiellement de l'ion moléculaire ou de l'ion moléculaire protoné.

L'ionisation des molécules glucidiques dissoutes dans une matrice (glycérol, triglycérol) par bombardement d'atomes neutres (argon ou xénon) accélérés (FAB, Fast Atom Bombardment) constitue une technique d'investigation très performante d'oligosaccharides natifs, *perméthylés* et *peracétylés*. Bien que non indispensable, la dérivation par *perméthylation* ou *peracétylation* des échantillons est préférable, améliorant la sensibilité de l'analyse et simplifiant l'interprétation des fragmentations. La FAB-MS des ions positifs des oligosaccharides *perméthylés* ou *peractéylés* fournit, à côté de l'ion moléculaire, une série d'ions fragments permettant d'établir la séquence de l'oligosaccharide, la fragmentation ayant lieu préférentiellement au niveau des liaisons glycosidiques.

La spectrométrie de masse à ionisation par nébulisation électrostatique (ESI/MS, Electrospray Ionisation Mass Spectrometry) a été décrite pour la première fois en 1984. L'ionisation a lieu à pression atmosphérique et à température ambiante. Le mécanisme de l'électrospray n'est pas encore bien élucidé, mais le processus peut être décrit relativement simplement. Une solution d'échantillon est introduite dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression. Le brouillard résultant est entraîné par un gaz porteur sec à travers un capillaire, ce qui a pour effet d'évaporer le solvant. La diminution du rayon des gouttelettes augmente leur densité de charge électrique, ce qui provoque une désorption des ions dans la phase gazeuse. Les ions formés peuvent être multichargés dans le

cas où plusieurs sites ionisables ou polaires sont présents sur la molécule, ce qui permet d'utiliser l'électrospray pour le calcul de masses de macromolécules (jusqu'à 200 000 Da environ). En effet les mesures de masse étant effectuées au travers d'un rapport  $m/z$ , plus la charge  $z$  augmente et plus la gamme de masses accessibles sur un instrument donné est élevée. Cette technique bénéficie d'une très grande précision (1 Da pour 10 000) et d'une grande sensibilité (de l'ordre de la picomole). Une caractéristique importante de cette technique réside dans le fait qu'elle produit peu de fragmentations des macromolécules biochimiques très sensibles à la température.

L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) constitue une autre technique d'analyse (figure 38). Elle permet d'obtenir des informations précises concernant les masses moléculaires des biopolymères polaires. Ces masses peuvent varier de plusieurs centaines à plusieurs centaines de milliers de Da. Le spectre obtenu se caractérise par l'absence totale de fragmentation. A côté de l'ion moléculaire formé on peut observer la présence d'ions porteurs de deux ou trois charges positives. Outre sa grande sensibilité (détermination de masses moléculaires avec une précision atteignant 0,01% à partir de moins d'une picomole de produit), cette technique permet d'analyser des molécules pures ou en mélange. Un autre avantage réside dans l'absence de dérivation préalable des échantillons à analyser.

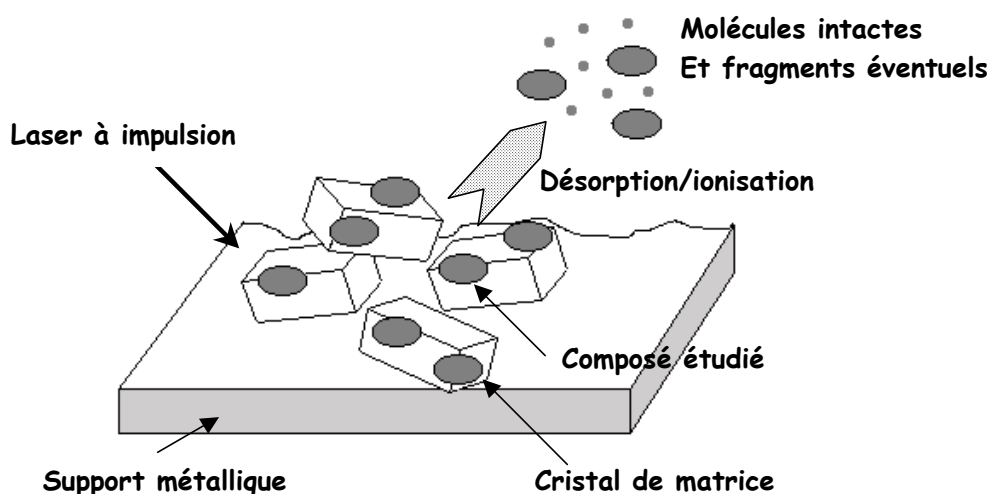


Figure 38 : Principe de la technique MALDI.

### *iii. Analyse de mélanges par couplage de la spectrométrie de masse à d'autres techniques*

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) constitue l'un des outils les plus puissants d'analyse de mélanges complexes de molécules organiques ou biochimiques. Dans cette application on révèle le spectre des fractions au fur et à mesure de leur sortie de la colonne de chromatographie. Cette technique est classiquement utilisée pour l'analyse des séquences oligosaccharidiques par l'identification des dérivés éthers méthyliques sous forme alditols ou méthyl-glycosides partiellement méthylés et acétylés.

La spectrométrie de masse en tandem (SM-SM), qui consiste à coupler deux spectromètres de masse, est également utilisée pour l'élucidation de mélanges d'oligosaccharides. Dans cette technique, le premier spectromètre de masse sert à produire et à séparer les ions moléculaires des différents composants du mélange et le second, à fragmenter successivement ceux-ci et à enregistrer les spectres des ions parents correspondants. La détermination complète de séquences oligosaccharidiques est alors possible en combinant une technique d'ionisation FAB avec la spectrométrie de masse en tandem (Fournet, 1991).

#### *1.5.2.e. Analyse structurale des polysaccharides*

Une autre alternative à l'analyse structurale des polysaccharides en général, de GX en particulier, est l'étude des molécules sous leur forme native. Dans ce cas, l'utilisation de la spectroscopie RMN ( $^1\text{H}$ - et  $^{13}\text{C}$ - RMN) va fournir des indications concernant la nature de la chaîne principale, le taux de branchement par l'acide 4-*O*-méthylglucuronique ainsi que sur l'importance et la position des groupements *O*-acétyle. Récemment, des études de RMN bidimensionnelles homo- et hétéronucléaires de type COSY, TOCSY, HSQC ou NOESY ont apporté des informations complémentaires qui permettent, sur la base de signaux caractéristiques, l'identification des différentes structures de GX natifs.

La spectrométrie de masse MALDI peut également être appliquée aux macromolécules de haut poids moléculaire si leur polydispersité n'est pas trop importante (inférieure à 1,1). L'utilisation de cette technique pour l'analyse des polysaccharides polydisperses requiert le couplage avec une séparation préalable par chromatographie

d'exclusion stérique. Ainsi on diminue la polydispersité des échantillons jusqu'à des valeurs compatibles avec l'analyse MALDI (Garozzo, 2000).

#### ***1.5.2.f. Poids moléculaire***

Même si la connaissance du poids moléculaire moyen est une donnée intéressante, c'est surtout la distribution en masse qui caractérise un polymère. En effet, les polysaccharides végétaux peuvent présenter une polydispersité importante. Une des techniques les plus répandues pour ce type d'analyse est la chromatographie d'exclusion stérique qui permet de séparer les macromolécules en fonction de leur poids moléculaire, ou plus exactement en fonction de leur volume hydrodynamique qui prend en compte la conformation des molécules. La calibration peut être effectuée avec des dextrans de poids moléculaire connu, s'ils présentent une forte similitude avec les polysaccharides étudiés. On peut également utiliser la spectrométrie de masse MALDI comme nous venons de le présenter.

## I.6. Valorisations industrielles des xylanes

Si l'on excepte les phycocolloïdes, la cellulose et l'amidon sont les principaux polysaccharides d'origine végétale à usage industriel. Les hémicelluloses en général, les xylanes en particulier, si ils représentent à l'heure actuelle un volume d'exploitation modeste, suscitent pourtant une attention grandissante (Ebringerova et Hromadkova, 1999). Leurs propriétés physico-chimiques originales les rapprochent des hydrocolloïdes. Ces derniers désignent des polysaccharides d'origine naturelle ou leurs dérivés, qui se dissolvent ou se dispersent dans l'eau pour former des solutions ou suspensions visqueuses. Les hydrocolloïdes ayant une grande affinité pour l'eau, affectent la texture du milieu auquel ils sont ajoutés et modifient la perception du consommateur vis-à-vis d'un produit, d'où leur utilisation notamment dans les secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique, en tant qu'épaississant, émulsifiant ou gélifiant (Whistler et Shah, 1978 ; Lenz et Wutzel, 1984). Ces polymères possèdent en solution une faible viscosité sous contrainte et une forte viscosité au repos à concentration élevée, ces caractéristiques sont celles qui sont recherchées pour les épaississants commerciaux d'origine naturelle tels que la gomme xanthane et la gomme caroube (Brisson et *coll.*). Par ailleurs, leurs propriétés liantes ont été exploitées en tant qu'additifs dans la préparation des pâtes à papier. Ils apportent une meilleure flexibilité aux fibres et améliorent la résistance mécanique du papier (El-Ashmawy et *coll.*, 1976). Enfin leurs propriétés nutritionnelles sont non négligeables. Les xylanes sont en effet employés en tant que fibres alimentaires. Ils ne sont pas dégradés par les enzymes digestives humaines et permettent ainsi d'accélérer le transit intestinal. En outre, leur ingestion diminuerait de manière significative l'accumulation des lipides dans le foie et le taux de cholestérol sanguin (Chanliaud, 1995).

Les xylanes peuvent donc être utilisés à l'état natif, sur la base de leurs propriétés physico-chimiques, mais les principales voies de valorisation de ces polysaccharides reposent soit sur leur hydrolyse pour former des précurseurs utilisés dans l'industrie chimique, soit sur leur fonctionnalisation qui permet d'envisager de nouvelles applications.

### **I.6.1. Hydrolyse des xylanes**

Comme nous l'avons précisé précédemment, les xylanes natifs peuvent être hydrolysés pour obtenir des sucres élémentaires qui fourniront après fermentation, déshydratation ou réduction par hydrogénation catalytique, toute une gamme de produits dont certains présentent une haute valeur ajoutée (figure 39, d'après Popa, 1996).

Parmi les produits d'hydrolyse les plus importants obtenus à partir des xylanes, citons le xylitol qui est obtenu par réduction de la fonction aldéhyde du xylose, et les dérivés furaniques, précurseurs pour la synthèse de nombreuses molécules. Le xylitol est un agent édulcorant semblable au sucre ordinaire, mais son apport calorifique est beaucoup plus faible car il est absorbé plus lentement et partiellement métabolisé par l'organisme. Il possède un caractère inhibiteur vis-à-vis du développement des caries, et il est actuellement utilisé comme additif dans de nombreux produits alimentaires (chewing-gums, chocolats et autres friandises, aliments diététiques) et dans les dentifrices (Holmbom, 2002). Le furfural, obtenu par déshydratation des pentoses, est un produit de base de l'industrie chimique. Il est le précurseur d'une large gamme de monomères, tel que l'alcool furfurylique, des dérivés vinyliques, acryliques et métacryliques ou époxydes, capables de polymériser (Gandini et Belgacem, 2002a). Entre autres, l'alcool furfurylique, obtenu par réduction du furfural, est largement exploité pour l'obtention de résines furaniques caractérisées par une très grande résistance à la température et aux agents chimiques agressifs (solvants, acides et bases).

La figure 39 donne une vue globale du schéma de valorisation des xylanes. Si une telle procédure apparaît économiquement attractive dans le cas des bois de feuillus qui sont riches en xylanes (20 à 30% de la masse) et pauvres en lignine, elle semble plus délicate à mettre en œuvre dans le cas des bois de résineux en raison de leur faible contenu en xylanes (moins de 10 % de la masse) et de leur richesse en lignine (plus de 30% de la masse). Cependant, la répartition des constituants chimiques du bois ne justifie pas actuellement une extraction industrielle, d'autant que ce processus ne résout pas globalement tous les problèmes. L'extraction est également synonyme de résidus. Dans presque tout les cas, les coûts liés au transport, au stockage, à la manipulation, à l'extraction et à la purification de molécules à partir du bois ou de ses co-produits ne soutiennent pas la comparaison, face au coûts d'obtention des produits concurrents que la chimie de synthèse permet de produire.



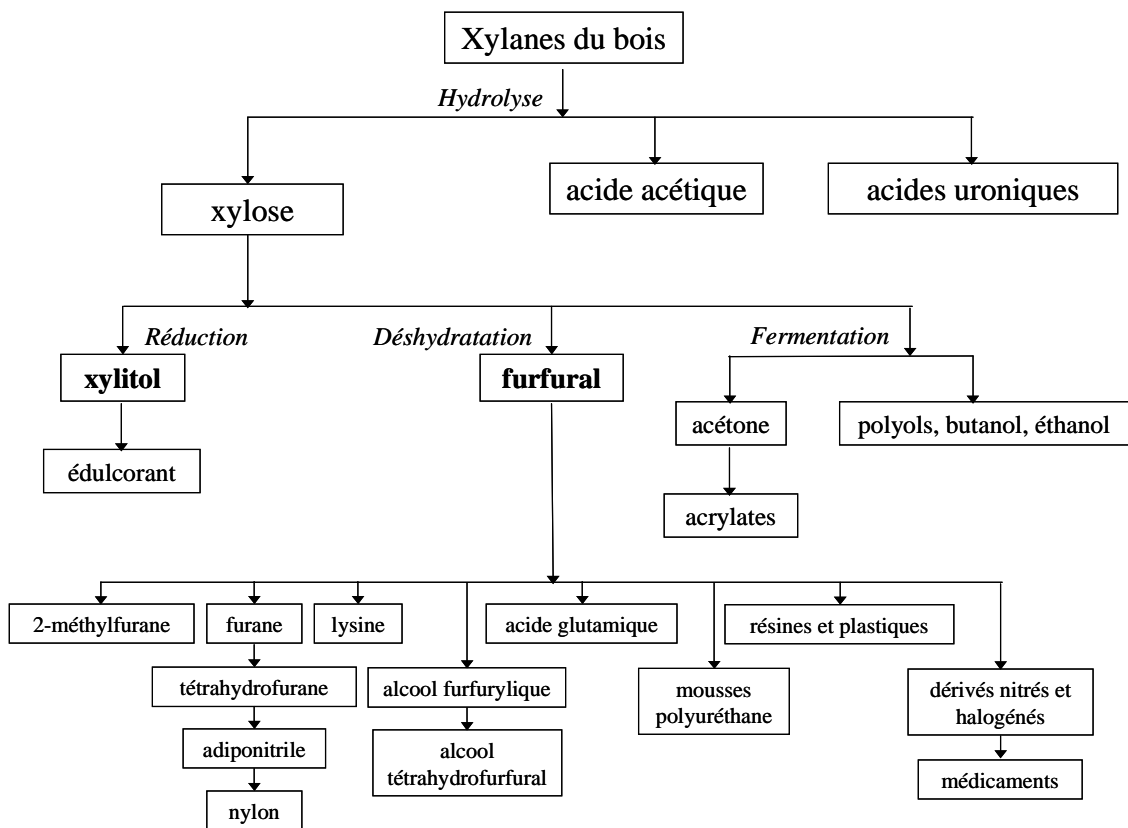


Figure 39 : Hydrolyse des xylanes et exemples d'applications industrielles (d'après Popa, 1996).

### I.6.2. Fonctionnalisation des xylanes

La fonctionnalisation des hémicelluloses de la famille des xylanes a été jusqu'à présent très peu étudiée. Elle ne trouve pour le moment que des applications industrielles très limitées. A titre d'exemple, les modifications les plus représentatives sont reportées figure 40. Elles mettent en jeu des réactions classiques de la synthèse organique. Si on considère l'importance de la littérature qui leur est consacrée, les xylanes polysulfates ou PPS (pentosanes polysulfates) connaissent un développement important notamment dans le domaine médical. Leur activité anticoagulante comparable à celle de l'héparine a été mise en évidence par de nombreux travaux. Ces dérivés sont également reconnus pour leur activité antitumorale, ils bloquent les récepteurs des facteurs de croissance (bFGF) à la surface des cellules tumorales. Ils empêcheraient également la formation de calculs reinaux en inhibant la croissance des cristaux d'oxalate de calcium qui en sont à l'origine, et permettraient également de diminuer le taux de cholestérol et de triglycérides. La préparation de ces dérivés, compte-tenu de leur fort intérêt pharmaceutique, est protégée par des brevets.

L'alkylation par des groupements ammonium quaternaires tel que le 2-hydroxypropyltriméthylammonium (TMAHP) a permis l'obtention de dérivés TMAHP, à partir de xylanes de différentes structures, employés comme additifs dans la fabrication de la pâte à papier. Ces xylanes cationiques possèdent également une activité antimicrobienne (Ebringerova, 1994b). Par ailleurs, l'éthérisation a donné lieu à plusieurs types de dérivés, parmi lesquels les carboxyméthylxylanes, employés en tant que drogue antitumorale ou encore valorisés en tant que flocculants, adhésifs ou détergents (Brisson et coll., 1994). Enfin la substitution des hydroxyles par des groupements carbamates après estérification conduit à des matériaux thermoplastiques (Vincendon, 1993).

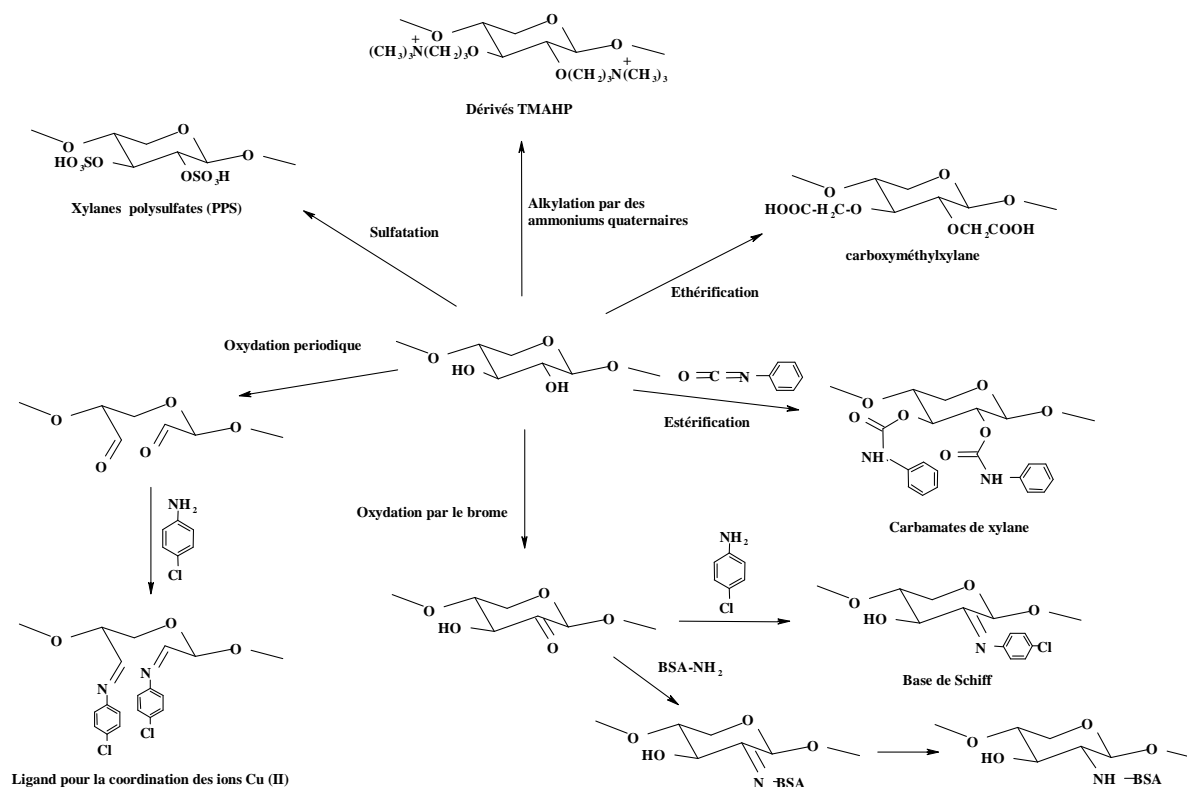


Figure 40 : Dérivés chimiques des xylanes (d'après Ebringerova et Hromadkova, 1999).

## **I.7. Une nouvelle voie de valorisation chimique des xylanes – Plastiques d'origine végétale.**

Les usines pétrochimiques du monde engloutissent chaque année 270 millions de tonnes de pétrole et de gaz dans la fabrication des matières plastiques (Gerngross et Slater, 2000). Les combustibles fossiles fournissent en effet l'énergie et la matière première nécessaires à la transformation du pétrole brut en matériaux tels que le polystyrène, le polyéthylène ou le polypropylène. La raréfaction progressive de ces matières organiques s'accompagnera inmanquablement d'une augmentation sensible de leur coût. Les Biotechnologies et la Chimie organique peuvent néanmoins apporter des solutions et la littérature en la matière propose sur ce thème de nombreuses références (Paillet and Peguy, 1990 ; Wang and Tao, 1995 ; Feil, 1995 ; Gandini et Belgacem, 2002b).

Il semble qu'à l'heure actuelle, les Biotechnologies privilégient trois approches pour remplacer les matières plastiques par des produits dérivés des plantes : la production directe de plastiques par des micro-organismes, par des plantes cultivées ou la transformation des sucres. C'est en 1977 que les sociétés américaines *Cargill* et *Dow Chemical* ont associé leurs efforts pour produire, après fermentation des sucres d'origine végétale en acide lactique et polymérisation de ce dernier, un plastique nommé acide polylactique (Gerngross et Slater, 2000) ou APL (PLA en anglais). Ce polymère est doté de propriétés semblables à celles du téréphtalate de polyéthylène, un plastique d'origine pétrochimique très utilisé pour la fabrication de bouteilles d'eau minérale notamment. Quelques années plus tard, la société *Imperial Chemical Industries* commercialisait un autre plastique obtenu après fermentation de sucres d'origine végétale (Kemish, 1993), *Biopol*, qui est un copolymère de la famille des poly-3-hydroxyalcanoates (PHA). Ce bioplastique est toutefois nettement plus coûteux que ses homologues synthétiques dérivés de combustibles fossiles. Son seul avantage est sa biodégradabilité. Face à des coûts de production élevés, les scientifiques ont orienté leurs recherches vers la synthèse directe des plastiques par les plantes. L'objectif est ici de modifier le patrimoine génétique des plantes cultivées afin de leur faire synthétiser le plastique directement sur pied. Ces travaux se heurtent néanmoins à une série de problèmes liés :

- à la *physiologie de la plante* : les chloroplastes des feuilles qui sont le siège de la photosynthèse semblent être un lieu privilégié de la production des plastiques par la plante. Une synthèse trop importante à ce niveau abaisse les rendements de la photosynthèse et donc la quantité de plastique produit.

- *aux méthodes d'extraction et de purification des plastiques à partir de la plante* : ces méthodes imposent l'utilisation d'énormes quantités de solvant.

- *à l'opinion publique* : la dissémination d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans notre environnement suscite actuellement des polémiques parfois violentes. L'énoncé récent du *principe de précaution* ainsi que le durcissement de la réglementation liée à ce type de manipulations constituent sans doute un frein sérieux au développement de telles technologies puisqu'ils imposent des conditions de culture strictement contrôlées incompatibles avec une production à grande échelle.

La synthèse organique apporte quant à elle des réponses différentes. Une stratégie consiste à modifier chimiquement les polymères végétaux. Rappelons d'ailleurs que les premiers polymères de synthèse ont été obtenus par modification chimique de la cellulose, comme la nitrocellulose ou encore l'acétate de cellulose, utilisés entre autres comme thermoplastiques. L'estérification des groupements hydroxyle des fibres cellulosiques par des chaînes aliphatiques modifie profondément leurs propriétés, et notamment la thermoplasticité et le caractère hydrophobe, mais aussi la biodégradabilité, la solubilité, l'inflammabilité, etc... Les propriétés du matériau obtenu dépendent alors de la longueur de la chaîne greffée, ainsi que du degré de substitution du polymère estérifié ou DS, c'est à dire du nombre de fonctions hydroxyle estérifiées par unité anhydroglucose dans le cas de la cellulose. Les esters cellulosiques à courte chaîne carbonée (moins de six atomes de carbones) représentent actuellement un marché industriel important, utilisés et commercialisés dans des domaines aussi variés que les fibres textiles, les films, pellicules et membranes, les revêtements et vernis, les matériaux thermoplastiques ou encore les matériaux composites. Les esters de cellulose, tels que l'acétate de cellulose (CA) ou les esters mixtes acétate propionate (CAP) et acétate butyrate (CAB) de cellulose (figure 41), tous fabriqués à partir de cellulose microcristalline hautement purifiée, sont concurrencés par les plastiques dérivés de l'industrie pétrochimique tels que le polyéthylène, le polypropylène, le polyéthylène téréphtalate, les polycarbonates, les nylons, etc., pour lesquels les produits de base, éthylène, propylène, xylène ou encore éthylène glycol sont encore économiquement très attrayants. De plus, l'obtention d'esters de cellulose nécessite la solubilisation préalable de la cellulose ce qui engendre la mise en œuvre d'une méthodologie lourde et coûteuse, contrairement aux polymères synthétiques issus de polycondensations. Leurs propriétés demeurent pourtant originales et ils continuent à satisfaire certains marchés.

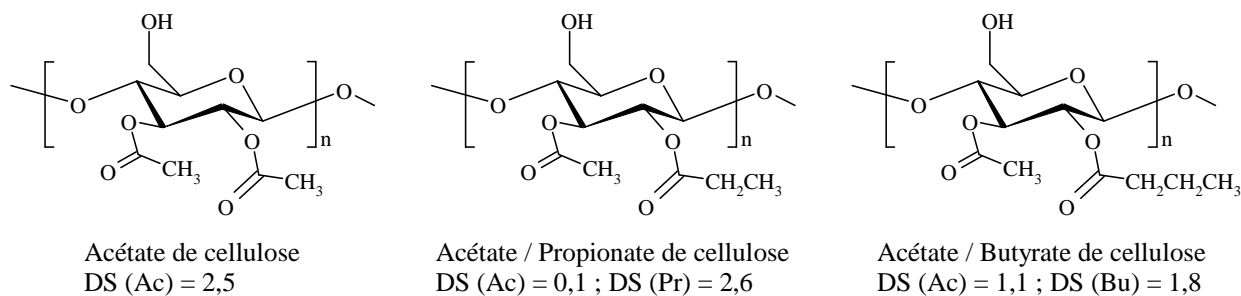


Figure 41 : Structures d'esters de cellulose commercialisés en tant que thermoplastiques.

Les qualités thermomécaniques des esters de cellulose demeurent leur principal handicap. En effet en raison de la fragilité des chaînes polysaccharidiques aux températures élevées, la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) et la température de décomposition du matériau sont souvent très proches. La température de transition vitreuse correspond au passage d'un état vitreux, dans lequel le polymère est dur et fragile à un état caoutchouteux pour lequel le polymère est mou et flexible. A partir de cette température, le matériau est plus souple et plus facile à travailler. C'est la raison pour laquelle un plastifiant est souvent ajouté afin d'abaisser la température de transition vitreuse et donc élargir le domaine d'applications des thermoplastiques. Plusieurs plastifiants sont couramment utilisés y compris à une échelle industrielle. C'est le cas du triéthylcitrate pour l'acétate de cellulose et l'adipate de dioctyle pour le CAP. Néanmoins l'emploi de plastifiant peut parfois se révéler gênant pour certaines applications. Ces molécules, de petite taille, ont tendance à s'évaporer au cours du temps, ce qui peut modifier les performances du matériau à court ou moyen terme.

Une autre solution pour abaisser la  $T_g$  d'un polymère est de greffer des substituants à longue chaîne, de manière à augmenter le volume libre et donc à diminuer les interactions entre les chaînes de polymères. La présence de substituants latéraux volumineux et flexibles comme les chaînes grasses, en écartant les chaînes polysaccharidiques, abaisse leur  $T_g$  et influe donc sur le domaine d'utilisation de ces thermoplastiques. Des travaux ont montré sur une série d'esters de cellulose allant de l'acétate au palmitate (C16), que la  $T_g$  diminue de manière significative avec l'augmentation de la longueur des chaînes grasses greffées (Edgar, 2001). Ainsi, sans ajout de plastifiant, il est possible d'obtenir des plastiques hydrophobes plus souples, plus déformables, moins cassants, ce qui laisse entrevoir de nouveaux domaines d'applications, tel que l'emballage ou encore la plasticulture et en particulier les films de paillage agricole (Joly, 2003 ; Fredon, 2001).

L'ensemble de ces travaux, initié à partir d'un substrat modèle, la cellulose, permet d'envisager de nouvelles voies de valorisation pour les polysaccharides, et notamment pour les xylanes du bois. L'objectif de cette étude est de proposer de nouveaux matériaux plastiques par acylation des 4-*O*-méthylglucuronoxylanes extraits de sciures de châtaignier.

## Chapitre II

### Extraction et analyse structurale des xylanes de feuillus





## **Chapitre II : Extraction et Analyse structurale des xylanes de feuillus**

### **II.1. Extraction et composition chimique des xylanes issus de différentes espèces forestières**

L'objectif de cette première partie est de déterminer la composition polysaccharidique de sciures issues de quatre essences forestières, dont deux feuillus (châtaignier et chêne) et deux résineux (épicéa et Douglas). Nous avons choisi d'extraire les xylanes pariétaux par des solutions alcalines. L'extraction par voie alcaline semble en effet être la plus appropriée, puisqu'elle permet de rompre les liaisons hydrogène, les interactions ioniques, et les liaisons covalentes de type ester entre les constituants de la paroi, facilitant ainsi leur extraction. L'utilisation d'un protocole d'extraction séquentielle, par utilisation de bases de concentrations croissantes, doit permettre d'obtenir des fractions hémicellulosiques homogènes.

#### **II.1.1. Protocole d'extraction standard**

Le protocole expérimental utilisé (figure 42) pour l'extraction séquentielle et sélective des polysaccharides pariétaux des sciures de bois a été adapté de Bailey (1967) et Carpita (1984). Ce protocole débute tout d'abord par une étape permettant d'extraire sélectivement les sucres circulants (glucose, fructose, saccharose) par solvatation dans l'éthanol à chaud. Les pectines sont ensuite éliminées de façon séquentielle à partir du résidu  $R_{EtOH}$  après extraction par l'eau, puis par l'oxalate d'ammonium 1% (chélateur de calcium). Afin de permettre une extraction optimale des hémicelluloses du bois, il est nécessaire de procéder à la délignification du résidu dépectinisé. La méthode employée (Adams, 1965) utilise une solution tamponnée de chlorite de sodium (0.6 g / 1g de matière sèche) dans l'acide acétique (0.2 mL / 1g de matière sèche) à 80°C pendant une heure. Les hémicelluloses sont extraites à partir du résidu délignifié par utilisation de bases de concentrations croissantes : KOH 0,43M, KOH 4,3M, NaOH 4,3 M. Les extractants KOH et NaOH sont additionnés d'un agent réducteur, le  $NaBH_4$  (3 mg.mL<sup>-1</sup>), et l'extraction se déroule sous azote afin de prévenir tout risque de dégradation.

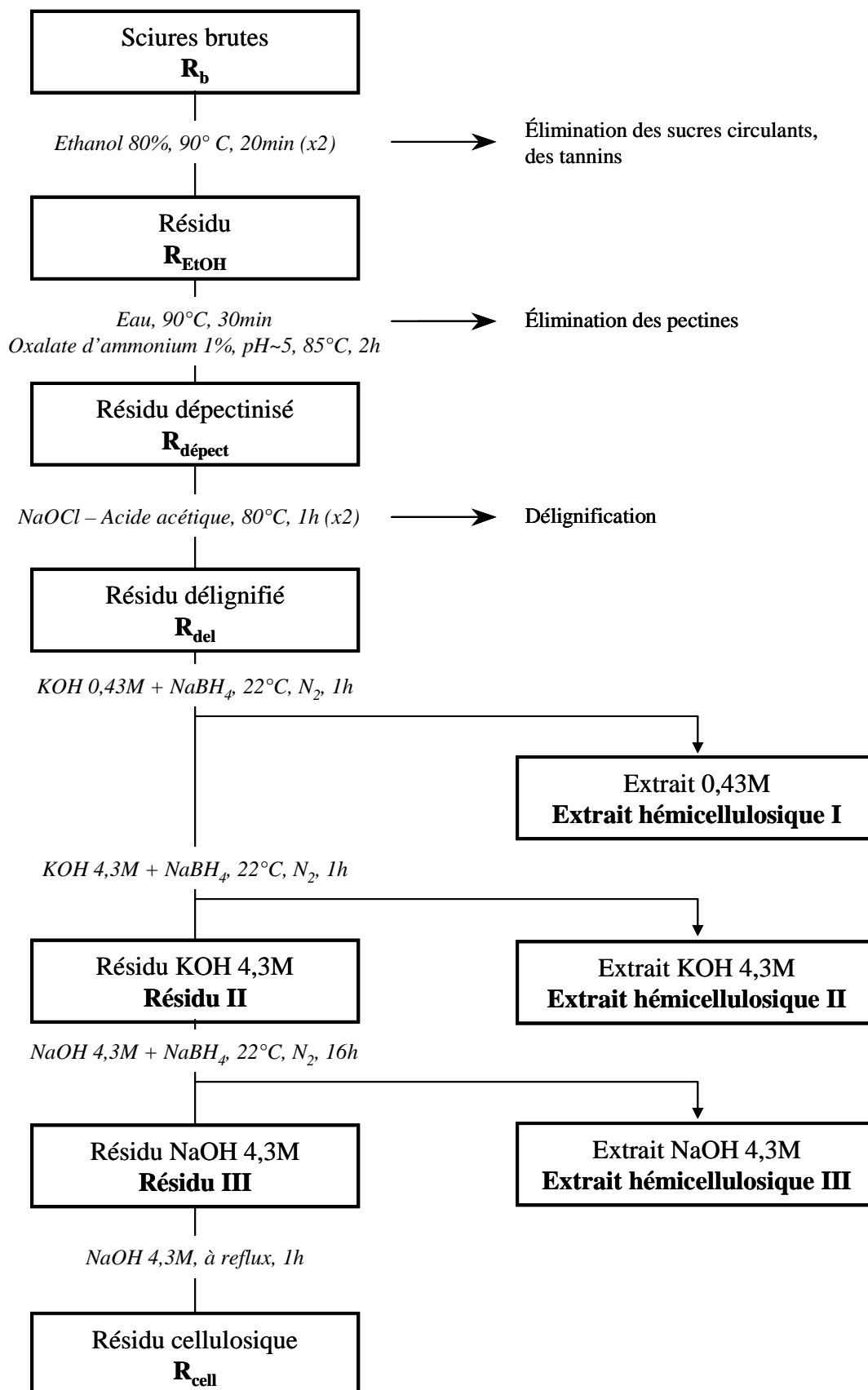


Figure 42 : Protocole d'extraction sélective et séquentielle des polysaccharides pariétaux adapté de Bailey (1966) et Carpita (1984).

Les extraits sont séparés des résidus d'extraction par centrifugation, puis neutralisés par l'acide acétique glacial. Les polymères qui précipitent au cours de cette étape de neutralisation (Fractions *insol*) sont séparés des hémicelluloses restantes en solution (Fractions *sol*) par centrifugation, puis, après redissolution dans l'eau, dialysés contre de l'eau distillée et lyophilisés. Les surnageants sont précipités par ajout de trois volumes d'éthanol et les précipités formés sont à leur tour récupérés par centrifugation, redissous dans l'eau, et dialysés avant d'être lyophilisés (figure 43).

Le résidu  $R_{Cell}$  est enfin obtenu après passage de  $R_{III}$  dans la soude 4,3M, à reflux. Après chaque étape d'extraction, les résidus sont rincés rapidement à l'eau distillée et un aliquot est prélevé pour la réalisation ultérieure d'une analyse de composition monosaccharidique par TMS<sub>d</sub>.

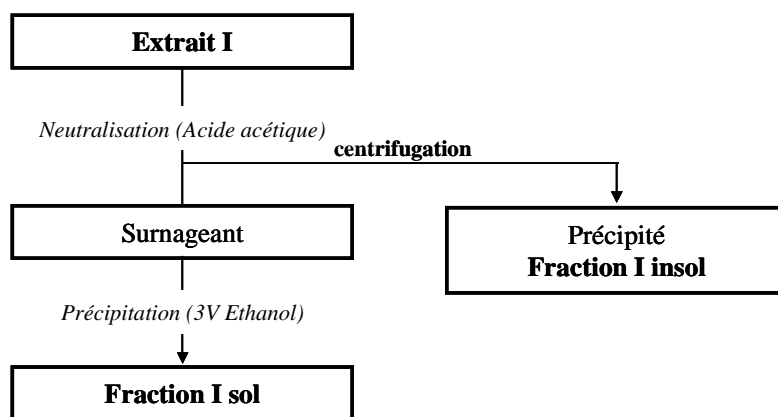


Figure 43 : Traitement des différents extraits.

### II.1.2. Etude quantitative et qualitative des résidus et fractions extraits

L'analyse de la composition monosaccharidique des extraits bruts de sciures et des résidus d'extraction a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés. Cette méthode, comme nous l'avons expliqué précédemment, présente l'avantage de permettre l'identification simultanée des hexoses (Gal, Glc, Man), déoxyhexoses (Rha, Fuc), pentoses (Xyl, Ara), acides uroniques (GlcA, GalA) et, après réacétylation, des osamines (GlcNAc). Elle nécessite la libération préalable des oses constitutifs par méthanolyse et la dérivatisation des méthylglycosides recueillis par un agent silylant.

Le schéma d'analyse que nous avons adopté pour suivre la qualité du protocole d'extraction repose sur l'étude simultanée de la composition monosaccharidique des extraits et des résidus d'extraction. Ce schéma d'analyse a le mérite, d'une part de permettre l'étude de ce qui a été sélectivement extrait par les différents tampons et d'autre part, de visualiser dans les résidus le départ des molécules extraites ainsi que la nature des polysaccharides qui restent à extraire.

Lorsqu'on analyse la composition monosaccharidique des extraits et des résidus d'extraction (tableaux 6, 7, 8 et 9) des différentes sciures de bois sélectionnées pour cette étude, il est possible de remarquer une grande diversité de composition qui se traduit par la grande variété des monosaccharides identifiés (Rha, Ara, Xyl, Man, Glc, Gal, GalA et GlcA). La composition des différents extraits bruts est, de plus, très révélatrice de la spécificité des tampons d'extraction utilisés. En effet, l'analyse de composition des extraits II et III montre clairement l'extraction sélective des hémicelluloses dont les sucres caractéristiques sont les suivants : Xyl, Man, Ara, Glc et GlcA. Le protocole adopté pour l'extraction sélective des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale apparaît alors comme tout à fait adapté aux sciures de bois sur lesquelles il a été appliqué avec succès.

L'analyse de la composition des résidus d'extraction  $R_{EtOH}$ ,  $R_{dépect}$ ,  $R_{del}$ ,  $R_{II}$ ,  $R_{III}$  et  $R_{cell}$  définis figure 42 témoigne du départ progressif des différents polymères au cours de l'extraction (tableaux 6, 7, 8 et 9). C'est ainsi que l'on peut tout d'abord observer une diminution de la teneur en GalA dans  $R_{dépect}$  ce qui traduit l'extraction sélective des composés pectiques. Une observation similaire peut être faite pour les résidus  $R_{II}$ ,  $R_{III}$  et  $R_{cell}$  où l'abaissement, notamment chez les feuillus, de la teneur en Xyl, Man ou Gal, indique l'extraction de composés de type xylane, mannane et/ou xyloglucane (composés hémicellulosiques). La composition monosaccharidique des résidus  $R_{cell}$ , met de plus en évidence la présence d'hémicelluloses non extractibles dans les conditions expérimentales employées. Compte-tenu de la composition osidique de ces résidus, et sachant que la cellulose n'est pas affectée par cette méthodologie, nous pouvons conclure que les hémicelluloses encore présentes dans ces résidus sont des xyloglucanes (cas des sciures de feuillus) et un mélange de xyloglucanes et de mannanes (cas des sciures de résineux). Le manque d'extractibilité de cette fraction hémicellulosique résiduelle ne peut, à ce stade des expériences, trouver son explication que par une localisation très en profondeur de ces

polymères dans la paroi cellulaire (paroi secondaire) accompagnée d'une interaction très forte avec les lignines encore présentes.

Tableau 6 : Composition monosaccharidique des extraits et résidus d'extraction, isolés à partir de sciures de châtaignier.

	Composition monosaccharidique (%molaire)							
	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	GlcA
R <sub>b</sub>	1,4	1,8	58,6	4,7	10,7	16,2	1,2	5,4
R <sub>EtOH</sub>	2,0	2,9	71,7	5,8	2,0	5,8	8,9	0,9
R <sub>dépect</sub>	1,0	2,7	74,8	5,2	2,8	5,7	6,0	1,8
R <sub>del</sub>	1,0	2,8	73,1	4,3	2,7	4,8	10,3	1,1
<b>Fraction I<sub>sol</sub></b>	<b>0,3</b>	<b>2,3</b>	<b>91,9</b>	<b>0,6</b>	<b>1,0</b>	<b>0,7</b>	<b>2,8</b>	<b>0,4</b>
<b>Fraction I<sub>insol</sub></b>	<b>0,8</b>	<b>4,2</b>	<b>80,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>1,6</b>	<b>10,4</b>	<b>2,1</b>
<b>Fraction II<sub>sol</sub></b>	<b>0,2</b>	<b>1,4</b>	<b>89,6</b>	<b>3,5</b>	<b>1,0</b>	<b>3,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>
<b>Fraction II<sub>insol</sub></b>	<b>0,3</b>	<b>5,0</b>	<b>84,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,7</b>	<b>1,5</b>	<b>3,6</b>	<b>2,8</b>
Résidu II	2,0	3,3	46,6	8,8	4,0	25,5	7,8	1,9
<b>Fraction III<sub>sol</sub></b>	<b>0,9</b>	<b>1,6</b>	<b>66,5</b>	<b>14,1</b>	<b>5,0</b>	<b>9,5</b>	<b>1,1</b>	<b>1,3</b>
<b>Fraction III<sub>insol</sub></b>	<b>0,5</b>	<b>1,3</b>	<b>86,6</b>	<b>2,6</b>	<b>1,3</b>	<b>5,7</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>
Résidu III	1,4	2,4	34,9	7,9	5,7	43,2	3,4	1,2
R <sub>cell</sub>	0,6	0,6	24,5	6,5	6,7	58,5	0,0	2,5

Tableau 7 : Composition monosaccharidique des extraits et résidus d'extraction, isolés à partir de sciures de chêne.

	Composition monosaccharidique (%molaire)							
	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	GlcA
R <sub>b</sub>	1,6	3,0	74,2	3,4	3,3	6,8	6,3	1,3
R <sub>EtOH</sub>	1,5	3,1	75,4	2,8	7,7	6,8	1,7	0,9
R <sub>dépect</sub>	0,6	2,4	75,6	3,1	1,9	3,4	11,7	1,4
R <sub>del</sub>	0,8	2,8	80,9	3,1	1,8	3,9	5,5	1,3
<b>Fraction I<sub>sol</sub></b>	<b>0,5</b>	<b>2,9</b>	<b>87,2</b>	<b>0,2</b>	<b>1,8</b>	<b>0,5</b>	<b>3,5</b>	<b>3,4</b>
<b>Fraction I<sub>insol</sub></b>	<b>0,5</b>	<b>4,6</b>	<b>69,5</b>	<b>3,8</b>	<b>0</b>	<b>2,4</b>	<b>15,7</b>	<b>3,6</b>
<b>Fraction II<sub>sol</sub></b>	<b>0,1</b>	<b>1,7</b>	<b>92,8</b>	<b>1,1</b>	<b>0,4</b>	<b>1,4</b>	<b>2,3</b>	<b>0,3</b>
<b>Fraction II<sub>insol</sub></b>	<b>0,2</b>	<b>3,5</b>	<b>86,5</b>	<b>0,9</b>	<b>0,4</b>	<b>1,6</b>	<b>4,9</b>	<b>1,9</b>
Résidu II	1,6	2,1	45,7	4,9	8,6	30,1	5,9	1,0
<b>Fraction III<sub>sol</sub></b>	<b>0,6</b>	<b>2,0</b>	<b>80,9</b>	<b>7,0</b>	<b>2,3</b>	<b>1,5</b>	<b>4,2</b>	<b>1,4</b>
<b>Fraction III<sub>insol</sub></b>	<b>0,4</b>	<b>1,5</b>	<b>88,9</b>	<b>1,5</b>	<b>1,1</b>	<b>3,8</b>	<b>1,7</b>	<b>1,1</b>
Résidu III	1,2	3,0	45,9	3,6	7,3	32,5	5,4	1,1
R <sub>cell</sub>	1,2	1,2	37,9	4,6	3,2	51,9	0,0	0,0

Tableau 8 : Composition monosaccharidique des extraits et résidus d'extraction, isolés à partir de sciures d'épicéa.

Composition monosaccharidique (%molaire)								
	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	GlcA
R <sub>b</sub>	5,4	1,8	25,4	39,8	7,5	12,7	6,6	0,8
R <sub>EtOH</sub>	5,2	16	23,9	41,5	8,4	12,9	5,8	0,6
R <sub>dépect</sub>	4,6	1,5	28,6	38,0	8,0	12,7	5,8	0,7
R <sub>del</sub>	4,0	1,6	25,7	42,6	8,5	13,7	3,4	0,6
<b>Fraction I<sub>sol</sub></b>	<b>5,7</b>	<b>2,9</b>	<b>71,8</b>	<b>2,7</b>	<b>5,7</b>	<b>3,3</b>	<b>6,3</b>	<b>1,6</b>
<b>Fraction I<sub>insol</sub></b>	<b>3,6</b>	<b>2,5</b>	<b>22,5</b>	<b>61</b>	<b>46</b>	<b>14,8</b>	<b>37,2</b>	<b>8,7</b>
<b>Fraction II<sub>sol</sub></b>	<b>5,0</b>	<b>1,0</b>	<b>80,9</b>	<b>4,8</b>	<b>1,7</b>	<b>1,5</b>	<b>4,6</b>	<b>04</b>
<b>Fraction II<sub>insol</sub></b>	<b>2,6</b>	<b>4,6</b>	<b>28,1</b>	<b>19,1</b>	<b>4,7</b>	<b>31,7</b>	<b>7,5</b>	<b>1,7</b>
Résidu II	3,8	1,8	25,0	37,1	7,2	21,0	3,6	0,7
<b>Fraction III<sub>sol</sub></b>	<b>5,0</b>	<b>1,5</b>	<b>65,5</b>	<b>13,9</b>	<b>5,6</b>	<b>4,7</b>	<b>3,4</b>	<b>0,3</b>
<b>Fraction III<sub>insol</sub></b>	<b>3,1</b>	<b>5,0</b>	<b>26,8</b>	<b>21,1</b>	<b>6,6</b>	<b>31,5</b>	<b>4,2</b>	<b>1,7</b>
Résidu III	3,3	1,3	24,6	34,9	7,3	25,9	2,3	0,4
R <sub>cell</sub>	3,3	0,4	22,9	33,9	9,3	29,8	0,5	0,0

Tableau 9 : Composition monosaccharidique des extraits et résidus d'extraction, isolés à partir de sciures de Douglas.

Composition monosaccharidique (%molaire)								
	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	GlcA
R <sub>b</sub>	4,3	1,4	23,1	42,6	10,2	16,6	1,4	0,5
R <sub>EtOH</sub>	4,2	1,3	19,1	44,3	11,5	2,0	17,1	0,5
R <sub>dépect</sub>	3,4	1,2	28,4	36,5	12,5	16,8	1,0	0,4
R <sub>del</sub>	2,3	1,0	18,9	30,9	24,8	21,2	0,3	0,7
<b>Fraction I<sub>sol</sub></b>	<b>4,9</b>	<b>2,4</b>	<b>68,7</b>	<b>1,7</b>	<b>12,6</b>	<b>5,7</b>	<b>2,5</b>	<b>1,5</b>
<b>Fraction I<sub>insol</sub></b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>14,3</b>	<b>3,2</b>	<b>4,2</b>	<b>7,8</b>	<b>60,5</b>	<b>5,5</b>
<b>Fraction II<sub>sol</sub></b>	<b>3,1</b>	<b>0,9</b>	<b>78,0</b>	<b>7,7</b>	<b>3,3</b>	<b>6,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>
<b>Fraction II<sub>insol</sub></b>	<b>4,3</b>	<b>1,3</b>	<b>52,6</b>	<b>15,3</b>	<b>5,8</b>	<b>20,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>
Résidu II	3,0	1,0	18,8	41,9	9,5	21,5	4,1	0,2
<b>Fraction III<sub>sol</sub></b>	<b>2,6</b>	<b>0,1</b>	<b>65,5</b>	<b>13,7</b>	<b>8,0</b>	<b>7,1</b>	<b>2,5</b>	<b>0,6</b>
<b>Fraction III<sub>insol</sub></b>	<b>3,2</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>13,3</b>	<b>7,8</b>	<b>20,5</b>	<b>3,0</b>	<b>2,2</b>
Résidu III	2,6	0,9	18,4	37,1	9,1	29,9	1,6	0,3
R <sub>cell</sub>	2,1	0,3	16,2	38,2	8,3	29,0	6,0	0,0

Une étude plus approfondie des tableaux 6 à 9 et du tableau 10 montre que les sciures issues de bois de feuillus et de résineux présentent une composition hémicellulosique

sensiblement différente tant sur le plan qualitatif que quantitatif. En effet, si l'ensemble des extraits obtenus à partir des sciures de chêne et de châtaignier sont homogènes et principalement composés de xylose (de 66 à 93 % molaire), les extraits issus des sciures d'épicéa et de douglas apparaissent nettement plus hétérogènes (essentiellement Man, Glc, Gal, Xyl). Quantitativement, les hémicelluloses sont beaucoup plus représentées dans les sciures de feuillus (10.2 à 13.8 % massique) que dans les sciures de résineux (2.2 à 2.5 % massique). Globalement la quantité maximale d'hémicelluloses est obtenue par l'extraction par la potasse à 4,3M. On peut noter que les rendements des fractions insolubles sont généralement plus élevés que pour les fractions solubles, et ce pour les différentes extractions et les quatre essences.

Tableau 10 : Bilan quantitatif de l'extraction

	<b>Rendement d'extraction (%)</b>			
	<i>Châtaignier</i>	<i>Chêne</i>	<i>Epicéa</i>	<i>Douglas</i>
Fraction I <sub>sol</sub>	0,6	1,1	0,1	0,1
Fraction I <sub>insol</sub>	1,3	1,8	0,2	0,5
Fraction II <sub>sol</sub>	1,9	4,3	0,1	0,4
Fraction II <sub>insol</sub>	4,3	4,1	1,2	0,3
Fraction III <sub>sol</sub>	0,6	0,6	0,1	0,3
Fraction III <sub>insol</sub>	1,4	1,9	0,9	0,7
<b>Hémicelluloses extraites</b>	<b>10,1</b>	<b>13,8</b>	<b>2,6</b>	<b>2,3</b>
<b>Résidu cellulosique</b>	<b>45,8</b>	<b>47,9</b>	<b>65,7</b>	<b>65,5</b>

En conclusion, nos résultats nous permettent de faire les remarques expérimentales suivantes :

- Les sciures de chêne et de châtaignier sont composées presque exclusivement d'hémicelluloses de type xylane qui sont parfois purs (*i.e.* sciures de chêne, fraction Fraction II<sub>sol</sub>), et qui représentent 10 à 14% de la masse sèche.
- Les hémicelluloses isolées à partir des sciures de résineux sont moins riches en hémicelluloses et plus hétérogènes, constituées d'un mélange de mannanes, de xylanes et/ou d'hétéroxylanes et de xyloglucanes.

Les xylanes extraits des bois de feuillus apparaissent donc être de bon candidats pour servir de modèle à une étude plus approfondie en vue d'une valorisation chimique. Dans ce but nous avons choisi de concentrer notre travail sur les xylanes de châtaignier, essence d'intérêt régional.

## **II.2. Analyse de composition – Optimisation des conditions d'analyse**

Les xylanes extraits de châtaignier sont très homogènes dans leur composition, principalement constitués de xylose (à environ 90% molaire). Comme nous l'avons décrit lors de l'étude bibliographique, les xylanes de feuillus sont substitués de façon plus ou moins importante par l'acide glucuronique, et plus souvent par son dérivé, l'acide 4-*O*-méthylglucuronique. Cependant, au cours de l'analyse de composition des xylanes comportant des unités de 4-*O*-MeGlcA, nous sommes confrontés d'une part au problème de l'identification de ce sucre par manque de témoin adapté, et d'autre part à sa sous-estimation du fait de la grande résistance des liaisons uronosidyle à l'hydrolyse. C'est pourquoi, préalablement à une étude plus approfondie de l'extraction et de la caractérisation des xylanes de châtaignier, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'optimisation du dosage des monosaccharides par l'étude de la réaction de méthanolyse, et dans un second temps à la synthèse de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique.

### **II.2.1. Etude et optimisation de l'étape de méthanolyse**

L'analyse de la composition monosaccharidique des polysaccharides est couramment obtenue par CPG après hydrolyse acide ou méthanolyse du polymère, et dérivation des oses ainsi libérés. La méthanolyse semble être la méthode la plus adaptée à l'analyse des hémicelluloses et des pectines (Sundberg, 1996), puisqu'elle permet l'identification simultanée des oses neutres et des acides uroniques qui entrent dans la composition de ces polysaccharides (Quemener et Thibault, 1989 ; Marga et *coll.*, 1995). Placés au contact d'acide chlorhydrique dans le méthanol anhydre, les polysaccharides se dépolymérisent, en libérant des méthylglycosides qui sont des composés relativement stables.

Rappelons cependant que la cinétique de rupture des liaisons glycosidiques des polysaccharides dépend du type de liaisons et de la nature des oses constitutifs du polymère. Un temps de réaction trop court ou des concentrations d'acide trop faibles ne permettent pas la libération complète des monomères, alors qu'un temps trop long ou une concentration trop forte provoque une dégradation des oses libérés. Dans les deux cas, on sous-estime les teneurs en oses du polysaccharide. D'où la nécessité d'optimiser l'étape de méthanolyse pour estimer de manière précise la composition monosaccharidique des polysaccharides.



Dans cette partie, nous avons étudié l'efficacité de la méthanolyse pour la rupture des liaisons glycosidiques et glucuronosidiques, dans le cas d'un 4-*O*-méthylglucuronoxylane commercial, extrait du hêtre. Pour cela nous avons fait varier deux paramètres, le temps de la réaction (2h, 5h et 24h) et la concentration de HCl (0,5M, 1M, 2M, 4M). Les résultats sont regroupés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Influence du temps d'hydrolyse et du pH de la solution utilisée sur le dosage des sucres d'un xylane (composition monosaccharidique exprimée en % molaire).

	HCl 0,5 M			HCl 1 M			HCl 2 M			HCl 4 M		
	2h	5h	24h	2h	5h	24h	2h	5h	24h	2h	5h	24h
<b>Xyl</b>	100	96,2	94,6	95,4	93,8	92,5	96,6	93,8	90,0	88,9	95,0	87,4
<b>4-<i>O</i>-MeGlcA</b>	0	3,8	5,4	4,6	6,2	7,5	3,4	6,2	10,0	11,1	5,0	12,6

Le tableau 11 montre que, quelle que soit la concentration de l'acide utilisée, la quantité d'acide 4-*O*-méthylglucuronique libéré augmente en prolongeant le temps de réaction. Ceci est naturellement dû à la cinétique de la réaction qui permet la rupture des liaisons Xyl/4-*O*-MeGlcA pour des temps de réaction prolongés. Dans le cas de fortes concentrations en acide chlorhydrique (4M), l'élévation des teneurs en 4-*O*-MeGlcA est sans doute à associer à une sous-estimation de la quantité de xylose du fait de sa probable dégradation. Cette dernière hypothèse est confirmée par la diminution des rendements massiques de réaction qui passent de 87% (condition 2M, 24 h) à 80% (condition 4M, 24 h).

Les conditions 1M, 24h et 2M, 24h paraissent être les meilleurs compromis tant d'un point de vue qualitatif, elles préservent l'équilibre entre Xyl et 4-*O*-MeGlcA, que d'un point de vue quantitatif, les rendements massiques étant supérieurs à 80%. D'autant plus faciles à éliminer que sa concentration est faible, nous avons choisi l'acide chlorhydrique 1M pour un temps d'hydrolyse de 24h à 80°C pour l'analyse des xylanes du bois.

## II.2.2. Synthèse et caractérisation de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique

Pour obtenir l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, deux méthodes peuvent être envisagées. La première repose sur l'hydrolyse acide préalable de 4-*O*-méthylglucuronoxylanes extraits, afin de pouvoir purifier par séparation chromatographique l'acide aldobiuronique caractéristique des xylanes de feuillus, le 2-*O*-(4-*O*-méthyl-D-glucopyranosido)-D-xylose (Gorin, 1957). Ce dernier est par la suite oxydé par le brome en présence de benzoate de calcium pour donner le sel de calcium de l'acide 2-*O*-(4-*O*-méthylglucurono)-xylonique (figure 44). Ce sel est enfin traité par le tétraacétate de plomb, puis hydrolysé par l'acide acétique, pour conduire à l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, avec un rendement global de 51%.

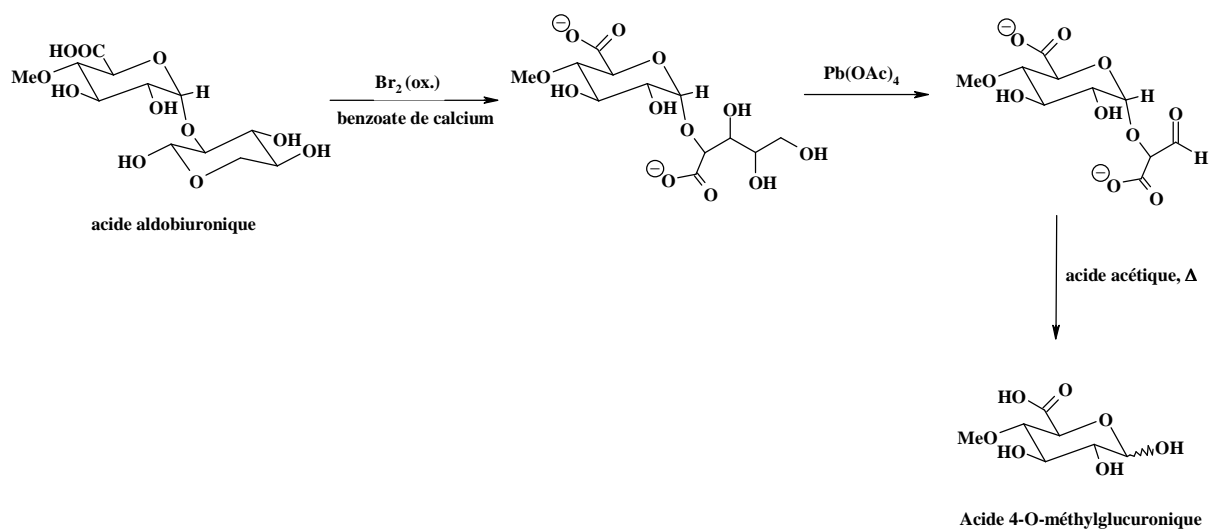


Figure 44 : Préparation de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique à partir de l'acide aldobiuronique.

Cette stratégie de synthèse ne présente pas de difficulté d'un point de vue chimique, mais si l'on tient compte de l'étape préliminaire d'hydrolyse du polymère associée à une purification fastidieuse de l'acide aldobiuronique, ainsi que du rendement global moyen de la synthèse, cette méthode s'avère peu intéressante.

La seconde méthode, qui est celle que nous avons adoptée, consiste à synthétiser directement cet acide uronique. Nous avons choisi comme substrat de départ le méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranose et avons retenu la stratégie de synthèse utilisée par Li et Helm (1995). La stratégie de synthèse, illustrée par la figure 45, consiste à protéger toutes les positions du méthylglucose à l'exception de la position 4, puis à méthyler cette position, et enfin à oxyder l'alcool primaire après déprotection des groupements hydroxyle en positions 2,3 et 6.

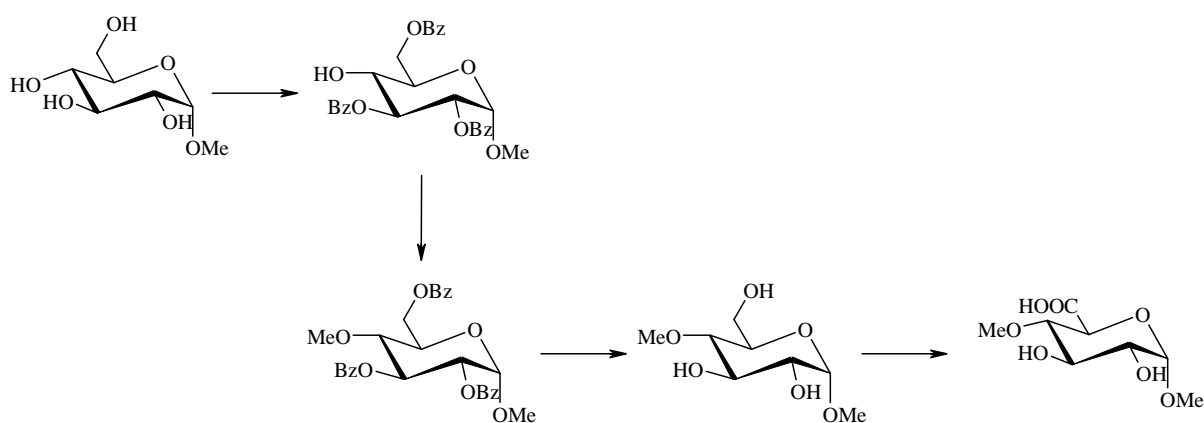


Figure 45 : Stratégie de synthèse de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique.

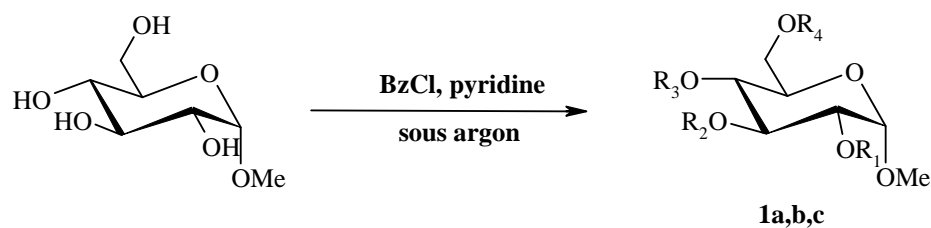
Il est à noter que dans ce cas on obtient l'acide méthyl-4-*O*-méthylglucuronique. En effet, le fait d'utiliser comme substrat de départ un glucose dont la position 1 est bloquée présente l'avantage de simplifier la synthèse. De plus la présence du groupement méthyle en position 1 n'est pas gênante puisque l'analyse de composition des polysaccharides par méthanolyse débute par la libération de méthylglycosides.

### ***II.2.2.a. Protection sélective des positions 2,3 et 6 du méthylglucose***

Cette première étape de protection de sucres, laissant la position 4 libre, est l'étape clef de la synthèse. Peu de données sont disponibles à ce sujet dans la littérature. Classiquement, à partir du méthylglucose, ceci peut être obtenu en formant dans un premier temps un acétal entre les positions 4 et 6. Les fonctions alcools en positions 2 et 3 sont alors protégées par des groupements benzyles (Castro et *coll.*, 2000) par exemple, et la position 6 pourra, après hydrolyse de l'acétal, être bloquée par un groupement tel que le trityle (Baker, 1963) ou le diphenyl-ter-butylsilyle (Hanessian, 1975). Cette procédure, comme nous venons de le montrer, requiert de nombreuses étapes de protection et déprotection, et conduit généralement à des rendements modestes. Li et Helm (1995) proposent quant à eux, une méthode de protection sélective en deux étapes, utilisant comme groupement protecteur le benzoyle. La stratégie développée consiste à acyler par le chlorure de benzoyle, le méthylglucose préalablement traité par l'oxyde de tributylétain. Cette méthode, initialement rapportée par Ogawa et Matsui (1981) conduit au méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside avec un rendement de 63%. Cependant l'utilisation de l'oxyde de tributylétain génère des sous-produits extrêmement difficiles à éliminer par les techniques usuelles de purification. La

présence de telles impuretés dans l'échantillon que nous nous proposons de synthétiser n'est finalement pas compatible avec son utilisation en analyse par CPG quantitative.

Pour ces raisons, en adaptant un protocole adapté de Williams et Richardson (1967), nous avons choisi d'effectuer cette protection sélective en une seule étape, par acylation du méthylglucose par le chlorure de benzoyle dans la pyridine (figure 46).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>1a</b>	Bz	Bz	H	Bz
<b>1b</b>	Bz	H	Bz	Bz
<b>1c</b>	Bz	Bz	Bz	Bz

Figure 46 : Benzylation sélective du méthylglucose

Cette réaction consiste d'une manière générale à faire réagir sous atmosphère d'argon, le méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranose solubilisé dans la pyridine avec du chlorure de benzoyle qui est ajouté goutte à goutte. Les résultats obtenus par Williams et Richardson (1967) semblent indiquer que dans le cas du galactose, du mannose et dans une moindre mesure du glucose, le composé 2,3,6-tri-*O*-benzoylé est obtenu avec de bons rendements, de l'ordre de 50%, à basse température (-30°C). Nous avons donc dans un premier temps effectué la réaction à -30°C. Dans ce cas le suivi de la réaction par CCM montre la formation de nombreux produits, parmi lesquels nous avons identifié le composé 2,3,6-tri-*O*-benzoylé **1a** attendu, ainsi que les composés 2,4,6-tri-*O*-benzoylé **1b** et 2,3,4,6-tétra-*O*-benzoylé **1c**, auxquels s'ajoutent des produits minoritaires mono et di-*O*-benzoylés. A cette température, le rendement en composé **1a** n'excède pas 30%. Dans le but d'améliorer la sélectivité de la réaction, nous avons testé différentes conditions, pour lesquelles nous avons fait varier la température (-30°C, 0°C, 25°C), le temps de réaction (50 min à 3 h 30) et la quantité de chlorure de benzoyle (3,1 et 4 équivalents). Quelles que soient les conditions, la formation des trois composés **1a**, **1b** et **1c** est toujours observée. Dans le meilleur des cas (25°C, 1h30, 3,1 éq. BzCl), le rendement en

méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside est de 54%, et on note par ailleurs que pour tous ces essais le rapport entre les deux composés tri-*O*-benzoylés **1a**/**1b** est de 75/25 et reste quasi constant (tableau 12). Les composés 2,3,6-tri-*O*-benzoylé **1a**, ainsi que les composés **1b** et **1c** ont été caractérisés par RMN.

Tableau 12 : Résultats obtenus pour la réaction de benzylation du méthylglucose.

Entrée	Température	Temps	BzCl	Rendement
1	-30°C	480 min	3,1 éq.	35%
2	25°C	90 min	3,1 éq.	54%
3	0°C	120 min	3,1 éq.	48%
4	25°C	120 min	3,1 éq.	37%
5	0°C	50 min	4 éq.	39%
6	0°C	210 min	3,1 éq.	46%

La purification est une des difficultés de cette étape. Il est nécessaire d'effectuer une première séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice, qui permet de récupérer le mélange des deux composés tri-*O*-benzoylés **1a** et **1b**. Le composé **1a** est enfin séparé du mélange par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice.

### II.2.2.b. Méthylation du méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside

La méthylation régiosélective des sucres sur une position autre que la position anomérique est très peu décrite dans la littérature. Néanmoins des méthodes de perméthylation existent, qui utilisent le diméthylsulfate dans la soude aqueuse (Haworth, 1915), l'iodométhane en présence de NaH dans le DMSO (Ciucanu, 1984) ou encore l'iodométhane en présence de soude en poudre dans le DMSO (Ciucanu, 1990, 1994). Mais ces dernières méthodes ne peuvent être utilisées dans notre cas car la présence de NaH ou de NaOH entraînerait à la débenzylation du sucre. En revanche la méthylation de Kuhn (1955), qui utilise l'oxyde d'argent comme base, semble plus adaptée au cas des sucres benzoylés. C'est donc cette stratégie que nous avons adoptée pour méthyler le méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside **1a** en position 4. Cette méthode consiste à faire réagir le produit **1a** solubilisé dans le DMF anhydre, sous atmosphère d'argon et à l'obscurité, avec de l'iodométhane en présence d'oxyde d'argent (Figure 47).

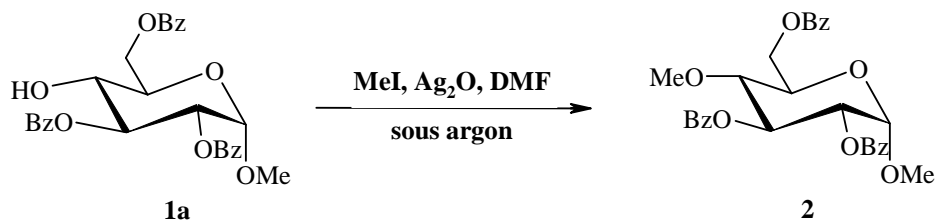


Figure 47 : Méthylation du méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside

Le suivi par CCM de la réaction indique qu'au bout de 24h, le produit de départ n'a pas complètement disparu. Plusieurs produits se sont formés, parmi lesquels le produit **2** attendu, ainsi que de nombreux produits résultant de débenzoylations et de méthylations des positions ainsi déprotégées. Dans les conditions opératoires choisies, le rendement en produit **2** n'excède pas 12%. L'optimisation du temps de réaction nous permet, pour un temps de réaction de 5h, d'isoler le composé méthyl-4-*O*-méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside **2** avec un rendement de 46%. L'analyse des produits de réaction montre que, outre la présence du composé de départ qui n'a pas réagi, les conditions de la réaction de Kuhn ne permettent pas de s'affranchir de la formation concomitante du méthyl-2,4,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ainsi que son dérivé méthylé en position **3**.

### II.2.2.c. Déprotection du méthyl-4-*O*-méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside

La débenzoylation est classiquement effectuée en milieu basique en utilisant comme base, le méthylate de sodium (figure 48).

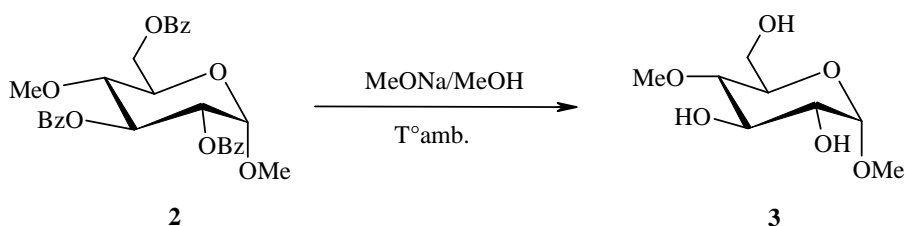


Figure 48 : Débenzoylation du méthyl-4-*O*-méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside

Pour cela, le méthyl-4-*O*-méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside est mis à réagir avec 1 équivalent de méthylate de sodium (solution méthanolique à 0,5M). La réaction est totale au bout de 3h. Après un traitement classique, le méthyl-4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside **3** est obtenu avec un rendement quantitatif.

### II.2.2.d. Oxydation sélective du méthyl-4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside

L'oxydation des sucres en acides uroniques peut être réalisée, d'après la littérature, par catalyse hétérogène O<sub>2</sub>-Pt/C (Van Bekkum, 1992), par électrocatalyse (Parpot et *coll.*, 1993) ou par des oxydes d'azote NaNO<sub>3</sub> ou NaNO<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (de Nooy et *coll.*, 1997). Au cours des quinze dernières années, les radicaux nitroxy (figure 49), radicaux organiques stables, dont l'utilisation est en accord avec le développement d'une chimie propre, ont été très largement employés pour l'oxydation des alcools primaires, aussi bien dans le cas des monosaccharides (Davis et Flitsch, 1993 ; Brochette-Lemoine et *coll.*, 1999) que pour l'oxydation des polysaccharides (Tahiri et Vignon, 2000). C'est notamment le cas du 2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-oxyle, appelé communément TEMPO, qui a fait l'objet de nombreuses études (Trombotto, 2001).

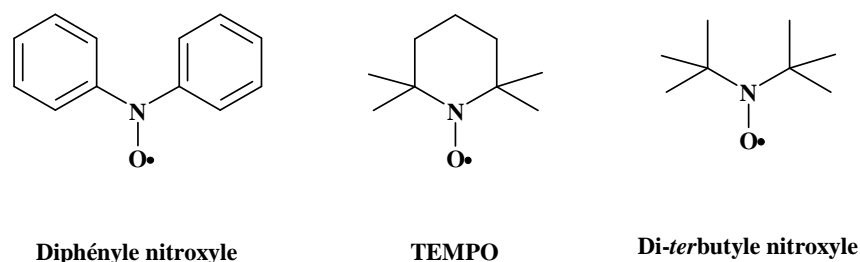


Figure 49 : Exemples de radicaux nitroxyles organiques

Généralement, dans le cas des réactions d'oxydation des hydroxyles primaires, l'entité réactive est la forme oxydée du TEMPO, l'ion oxoammonium, oxydant plus fort. Celui-ci est le plus souvent formé par oxydation du radical nitroxy *in situ* dans un cycle catalytique ; pour cela plusieurs oxydants sont utilisés comme notamment l'acide *m*-chloroperbenzoïque, l'oxygène en présence de CuCl, et surtout le système hypochlorite de sodium/bromure de sodium (de Nooy et *coll.*, 1996). Ce procédé a été appliqué à l'oxydation sélective des fonctions alcool primaire d'un certain nombre de sucres (de Nooy et *coll.*, 1994,1995) ; dans toutes ces études l'hypochlorite de sodium a été utilisé comme oxydant primaire, en présence de quantités catalytiques de NaBr, pour la régénération de l'ion oxoammonium. Des études ont montré que les ions bromure ont un effet catalytique sur la vitesse d'oxydation (Besemer, et van Bekkum, 1994). L'origine de cette catalyse est la rapide conversion des ions bromure en ions hypobromite, selon une réaction d'oxydo-réduction impliquant l'hypochlorite (figure 50).

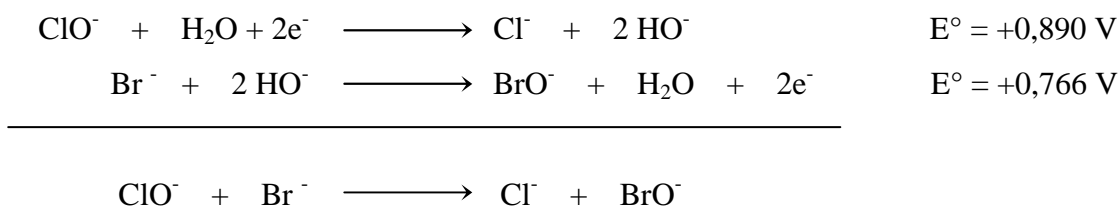


Figure 50 : Formation de l'hypobromite par réaction d'oxydo-réduction.

Un mécanisme réactionnel a été proposé par de Nooy et *coll.* (1994), faisant intervenir l'hypobromite comme espèce oxydante active (figure 51). Cependant, ce mécanisme reste controversé car d'autres espèces oxydantes telles que  $\text{Br}_2$ ,  $\text{Br}_3^-$  et  $\text{HOBr}$ , présentes dans le milieu réactionnel, peuvent également participer au cycle catalytique.

Les conditions de la réaction (pH, température, concentration en NaBr) ont été optimisées dans le cas de polysaccharides hydrosolubles. Il a notamment été montré qu'un pH proche de 10 permet d'obtenir les vitesses de réaction les plus élevées et limite l'oxydation compétitive des alcools secondaires par les hypohalites. Dans le cas des pyranosides, la sélectivité pour les alcools primaires est quasi quantitative, et le produit de réaction est obtenu sous forme de carboxylate.

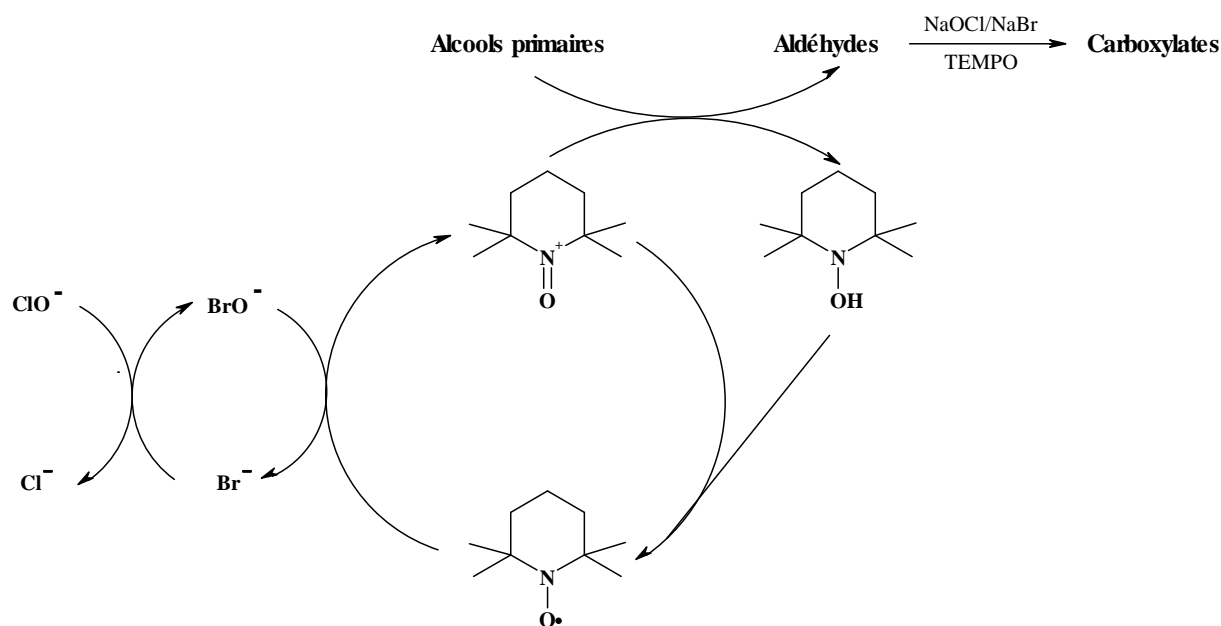


Figure 51 : Mécanisme d'oxydation des alcools primaires.



Parce qu'elle conduit à de très bons rendements et qu'elle est réalisée dans l'eau, cette méthode nous a paru parfaitement adaptée à la préparation de l'acide méthyl-4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosiduronique **4** (figure 52).

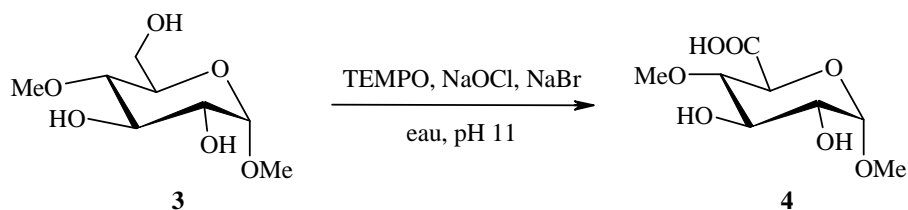


Figure 52 : Oxydation sélective du méthyl-4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside.

Le composé **3**, préalablement solubilisé dans l'eau, est mis à réagir, à 0°C sous atmosphère d'argon, en présence de 0,01 éq. de TEMPO, 0,5 éq. de NaBr et 2,2 de NaOCl (solution aqueuse à 5%) ajoutés goutte à goutte. Le pH de la solution est maintenu entre 10 et 11 tout au long de la réaction, par addition goutte à goutte d'une solution de soude à 0,5M. La réaction est suivie par CCM et conduit au bout de 1h30 au sel de sodium de l'acide méthyl-4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosiduronique attendu, avec un rendement dans tous les cas supérieur à 90%. Il est à noter que pour ce composé, les techniques classiques de chromatographie sur gel de silice n'ont pas permis de l'isoler pur. En revanche, le composé **4** a pu être purifié par plusieurs chromatographies successives d'exclusion stérique sur Biogel P2.

### II.2.2.e. Caractérisation de l'acide méthyl-4-*O*-méthylglucuronique

La structure de l'acide méthyl-4-*O*-méthylglucuronique a été caractérisée par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , les données étant présentées dans la partie expérimentale, ainsi que par spectrométrie de masse haute résolution en mode électrospray. Celle-ci, en fournissant la formule brute attendue pour l'acide méthyl-4-*O*-méthylglucuronique, confirme sa structure. Le spectre de masse du composé **4** préalablement triméthylsilylé, obtenu par couplage CG/SM avec un mode d'ionisation par impact électronique, est présenté figure 53.

Lors de l'analyse des glucides par spectrométrie de masse en mode impact électronique, l'ion moléculaire est souvent absent du spectre ce qui est le cas ici. Par ailleurs, le pic de base à  $m/z = 73$   $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+]$  mais aussi le pic à  $m/z = 147$   $[(\text{CH}_3)_3\text{Si-O-Si}^+(\text{CH}_3)_2]$  sont toujours présents dans les spectres de masse des dérivés triméthylsilylés de glucides. Le

pic à  $m/z = 89$  [ $\text{CH}_3\text{OSi}^+(\text{CH}_3)_2$ ] qui a, dans notre cas, une intensité relative de 25,6% est quant à lui généralement observé pour des méthylglycosides. La figure 54 montre quelques unes des fragmentations observées choisies parmi les plus significatives. Les pics de faible intensité à  $m/z=231$ ,  $m/z=199$  mais aussi  $m/z=317$  ou encore  $m/z=285$  sont caractéristiques des dérivés d'acide glucuronique (Bleton, 1996). Les pics à  $m/z=423$  et  $m/z=391$ , correspondant respectivement à la perte d'un groupement  $\text{CH}_3$  puis d'un groupement  $\text{CH}_3\text{OH}$ , sont également en accord avec la structure proposée pour le composé **4**. En outre, le fait que le pic à  $m/z=204$ , correspondant à la perte de  $\text{CH}_3\text{OCHO}$  puis  $\text{CH}_3\text{OCH}=\text{CHCOOTMSi}$ , ait une intensité importante (77,5%) indique que le glucide étudié est sous sa forme pyranose. En effet, il est couramment admis que cette fragmentation, qui nécessite une circulation d'électrons sur tout le cycle est favorisée par un cycle à six atomes (Kennedy et Robertson, 1978). D'autre part, la présence du groupement méthyle en position 4 donne également lieu à une série de pics caractéristiques. C'est le cas notamment du pic très intense à  $m/z=159$  mais aussi des pics à  $m/z=146$ ,  $m/z=247$  ou encore  $m/z=133$ .

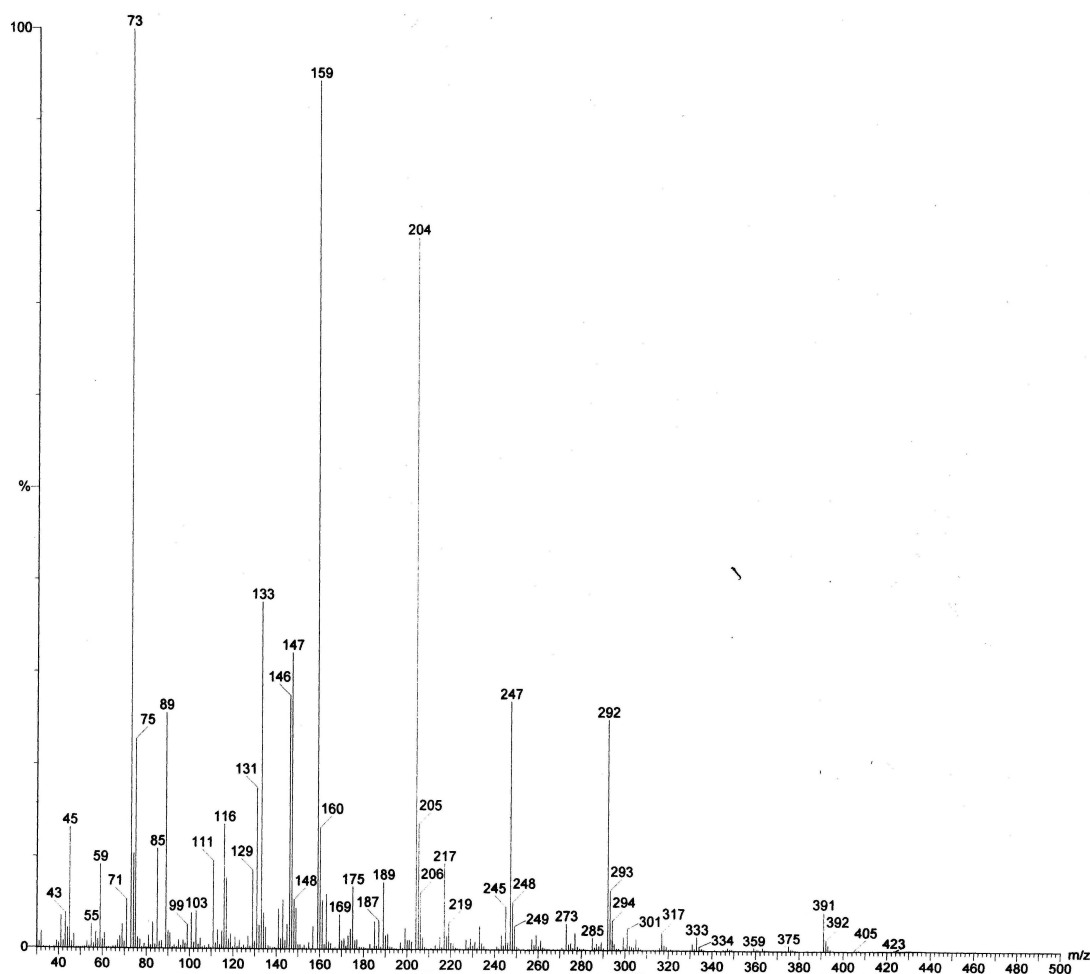


Figure 53 : Spectre de masse (EI) de l'acide méthyl 4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosiduronique.

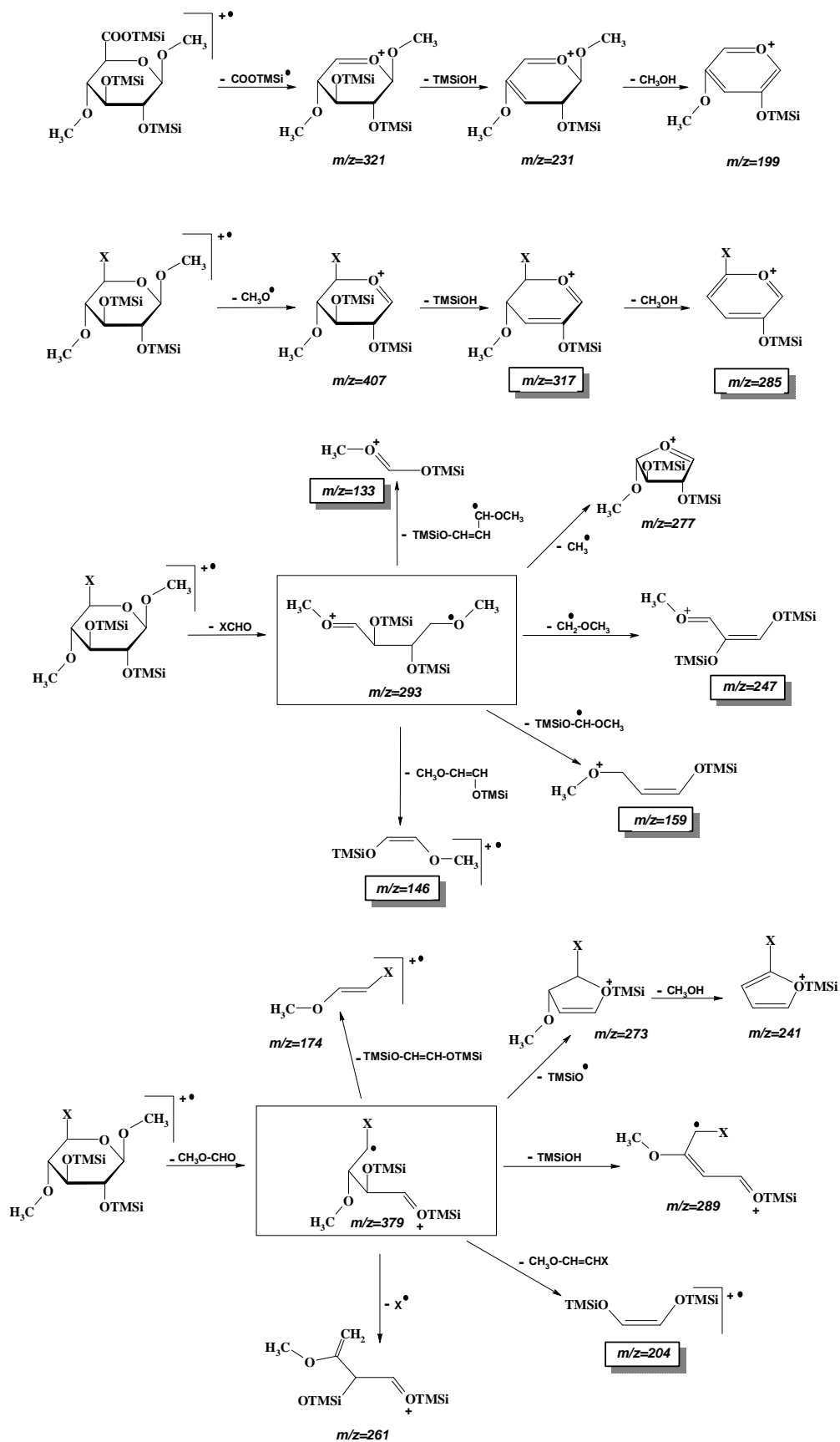


Figure 54 : Représentation des principales fragmentations observées sur le spectre de masse (EI) de l'acide méthyl-4-O-méthylglucuronique (X = COOTMSi).

Enfin, afin d'établir un chromatogramme témoin qui permettra d'identifier l'acide 4-*O*-méthylglucuronique lors des analyses de compositions des xylanes par CPG, le composé **4**, après méthanolyse et triméthylsilylation, est injecté en CPG. Le chromatogramme obtenu (figure 55) présente 2 pics correspondant aux deux formes pyranose  $\alpha$  et  $\beta$  de l'acide uronique. En effet, contrairement à l'acide glucuronique qui présente également les formes furanoses, ici la présence d'un groupement méthoxy sur le C4 empêche leur formation (Bleton et *coll.*, 1996).

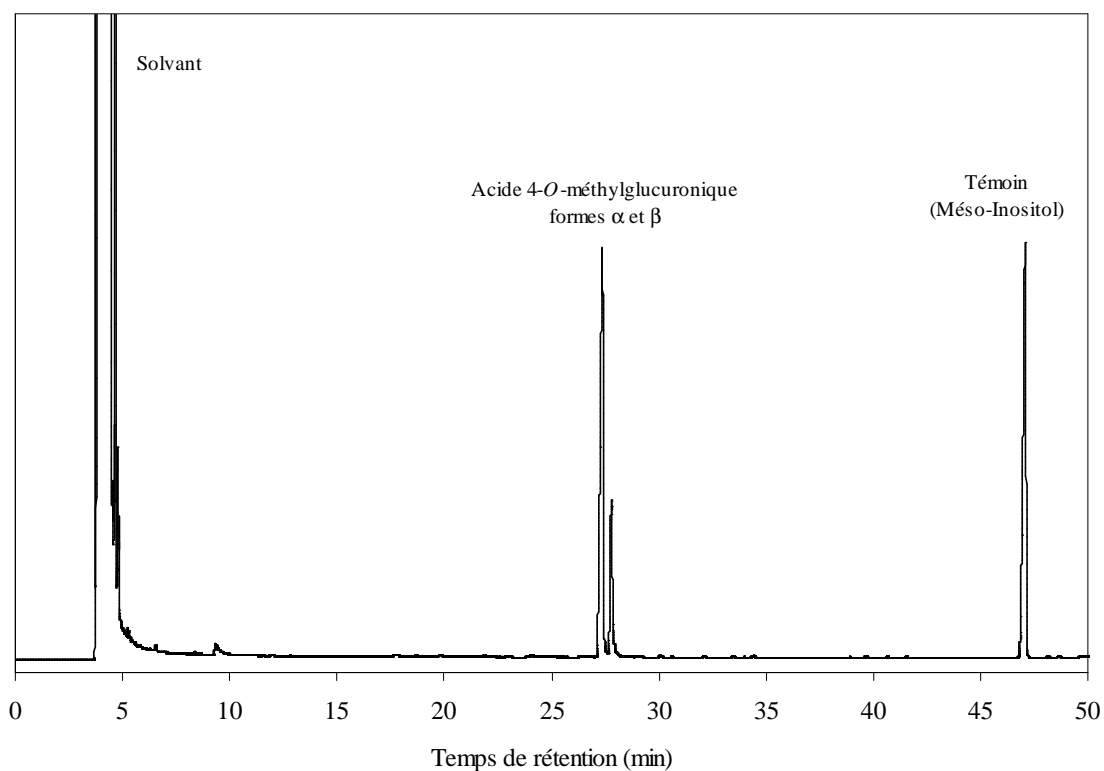


Figure 55 : Chromatogramme du produit **4** après méthanolyse et triméthylsilylation (voir les conditions en partie expérimentale).

## **II.3. Xylanes de châtaignier**

### **II.3.1. Optimisation du protocole d'extraction**

Les protocoles qui conduisent à l'extraction des macromolécules de la paroi des cellules végétales doivent répondre à un double impératif : ils doivent être suffisamment sélectifs (ou du moins spécifiques) pour permettre l'extraction d'une catégorie de molécules ; ils doivent aussi avoir le souci de limiter la dégradation des molécules au cours de leur extraction. C'est la raison pour laquelle l'expérimentateur est contraint d'ajuster les étapes clés du protocole pour chaque type de matériau biologique. Dans le cas du bois, matériau hautement lignifié, les étapes de délignification et d'imprégnation sont souvent employées comme préalable à l'extraction des polysaccharides de la paroi cellulaire. Selon Joseleau (1980), en rompant les associations intermoléculaires polysaccharides-lignine, la délignification améliorerait l'action des réactifs d'extraction et garantirait, en conséquence, une meilleure extractabilité des polysaccharides de la paroi. Elle repose néanmoins sur un mécanisme oxydatif dont il est nécessaire de vérifier les conséquences sur la dégradation partielle éventuelle des polymères pariétaux les plus fragiles, comme c'est le cas des xylanes par exemple. Par ailleurs, en provoquant le gonflement des fibres de la paroi cellulaire, l'étape d'imprégnation faciliterait l'accessibilité des polysaccharides par les solvants d'extraction. La figure 56 présente les quatre protocoles que nous avons mis en œuvre afin d'apprécier l'influence de ces prétraitements, et de leurs séquences, sur l'extractabilité des xylanes des sciures de châtaignier.

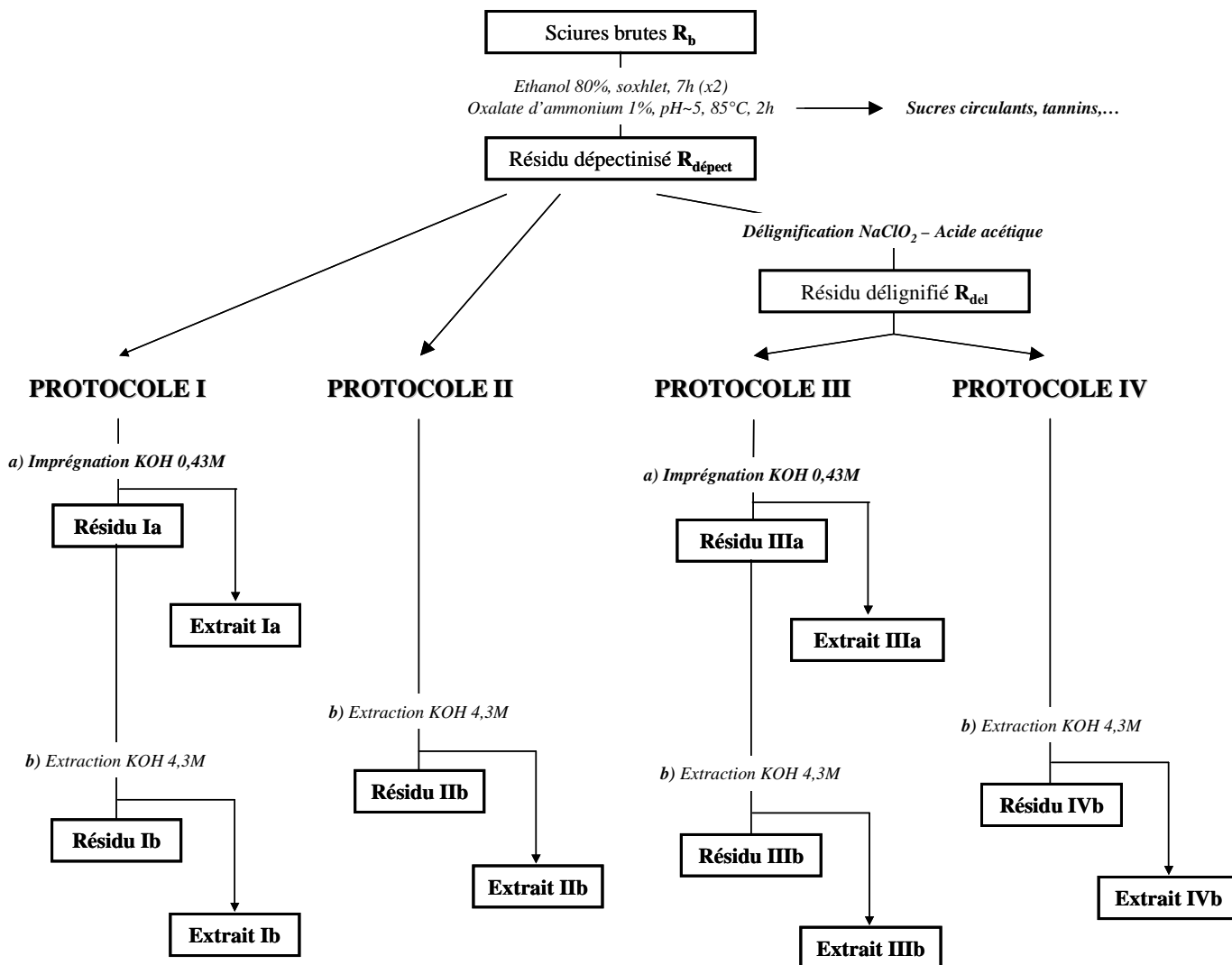


Figure 56 : Protocoles d'extraction des xylanes à partir de sciures de châtaignier ; protocole I : imprégnation, extraction ; protocole II : extraction directe ; protocole III : délignification, imprégnation, extraction ; protocole IV : délignification, extraction.

### II.3.2. Bilan d'extraction et analyse des xylanes extraits

Les résultats du dosage des sucres des différents résidus d'extraction et les rendements d'extraction ainsi que la composition des différentes fractions sont regroupés dans les tableaux 13 et 14.

Du point de vue qualitatif, le suivi de la composition des résidus au cours des protocoles d'extraction (Tableau 13) montre un appauvrissement progressif de ces derniers en xylose. Une telle observation confirme la sélectivité des protocoles utilisés pour extraire les glucuronoxylanes du bois de châtaignier. Plus précisément, il est possible de constater que dans la cas des sciures non délignifiées (protocoles I et II), la teneur en xylose passe de 69% à 34%, alors que dans le cas des sciures délignifiées (protocoles III et IV), elle passe de 69% à moins de 10%. Par ailleurs, au cours des extractions, la teneur en glucose augmente sensiblement et passe de 4% à 28% pour les protocoles I et II, et 70% pour les protocoles III et IV. Parallèlement à l'appauvrissement des résidus en xylose, les teneurs en glucose augmentent, ce qui traduit un enrichissement de ces résidus en xyloglucanes, plus incrustés dans la paroi. Pour conclure, ces résultats témoignent d'une meilleure extractibilité des xylanes à partir de sciures préalablement délignifiées.

Tableau 13 : Compositions monosaccharidiques des résidus d'extractions (définis figure 56 p 124).

	Composition monosaccharidique (%molaire)								
	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	GlcA	4-O-MeGlcA
R <sub>b</sub>	1,7	2,7	<b>69,0</b>	4,0	4,2	4,0	6,3	0,9	<b>7,2</b>
R <sub>dépect</sub>	1,8	3,3	<b>65,8</b>	3,5	6,8	4,3	8,1	1,2	<b>5,2</b>
R <sub>del</sub>	1,2	2,3	<b>66,6</b>	3,6	3,8	4,0	5,3	1,2	<b>12,1</b>
Résidu I a	5,3	4,6	<b>55,6</b>	4,2	8,6	5,5	11,7	1,3	<b>3,2</b>
Résidu I b	3,5	4,1	<b>34,1</b>	6,2	8,5	27,8	12,2	1,0	<b>2,7</b>
Résidu II b	3,5	3,9	<b>33,4</b>	6,4	8,0	28,1	11,6	2,4	<b>2,7</b>
Résidu III a	0,7	1,8	<b>58,2</b>	8,2	3,4	14,4	1,2	0,8	<b>11,4</b>
Résidu III b	0,6	0,9	<b>7,6</b>	12,5	3,6	71,2	1,5	1,0	<b>1,2</b>
Résidu IV b	0,8	1,6	<b>9,7</b>	11,7	4,2	65,8	4,1	0,7	<b>1,4</b>

Du point de vue quantitatif, l'analyse des rendements d'extraction mesurés pour chaque fraction, montre que l'essentiel des xylanes est extrait par la potasse 4,3M, les rendements de l'étape d'imprégnation (potasse 0,43M) étant plus faibles, en particulier pour la fraction Ia (tableau 14). Par ailleurs, les rendements d'extraction globaux passent de 13% pour les protocoles I et II à 19% dans le cas des sciures délignifiées (protocoles III et IV). Dans ce dernier cas, les rendements d'extraction sont satisfaisant. En effet les données de la littérature indiquent que la part des glucuronoxylanes ne dépasse pas 20 à 30% de la masse sèche du bois, selon les espèces (Alèn, 2000).

Tableau 14 : Rendements et compositions monosaccharidiques des différents extraits

	<b>Composition monosaccharidique (%molaire)</b>										
	<b>Rdt* (%)</b>	<b>Ara</b>	<b>Rha</b>	<b>Xyl</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>	<b>GalA</b>	<b>GlcA</b>	<b>4-O- MeGlcA</b>	<b>Xyl / 4-O- MeGlcA</b>
Extrait Ia	<b>3,5</b>	0,6	3,0	<b>71,3</b>	1,1	3,6	0,8	3,8	1,0	<b>14,8</b>	<b>4,8:1</b>
Extrait Ib	<b>8,4</b>	0,5	1,6	<b>73,7</b>	1,7	3,1	0,5	2,1	0,7	<b>16,0</b>	<b>4,6:1</b>
Extrait IIb	<b>13,8</b>	1,4	6,3	<b>61,2</b>	4,5	11,4	1,5	5,7	2,8	<b>5,3</b>	<b>11,6 :1</b>
Extrait IIIa	<b>6,20</b>	0,9	2,4	<b>69,5</b>	0,2	2,9	0,4	4,2	0,9	<b>18,6</b>	<b>3,7:1</b>
Extrait IIIb	<b>12,30</b>	0,7	1,8	<b>81,8</b>	0,7	0,7	0,8	2,3	1,4	<b>9,9</b>	<b>8,3:1</b>
Extrait IVb	<b>19,2</b>	0,8	1,8	<b>76,3</b>	0,9	2,0	1,0	2,1	0,6	<b>14,6</b>	<b>5,2:1</b>

\* Rendement en poids par rapport à la matière sèche de départ

Comparés deux à deux, les résidus obtenus à partir des protocoles I et II d'une part et III et IV d'autre part, montrent que l'étape d'imprégnation n'améliore pas significativement le bilan quantitatif de l'extraction. En revanche, dans le cas des protocoles n'incluant pas d'étape de délignification (I et II), des xylanes légèrement plus purs sont recueillis (fraction Ib) quand le résidu a subi une étape d'imprégnation préalable. En effet, la fraction IIb, directement extraite par la potasse 4,3M, est moins riche en xylose que la fraction Ib ; elle semble contaminée par d'autres polysaccharides, sans doute de type pectiques, compte-tenu des pourcentages de GalA, Rha et Gal observés.

S'agissant des fractions isolées, les rapports molaires Xyl/4-O-MeGlcA varient de 3,7 à 11,6 unités xylose pour une unité d'acide 4-O-méthylglucuronique. Les xylanes extraits du



châtaignier sont donc riches en acide uronique, ce qui est en accord avec les taux classiquement rapportés pour les bois de feuillus (tableau 15).

Tableau 15 : Rapports molaire (Xyl/4-*O*-MeGlcA) de quelques glucuronoxylanes extraits de différentes essences forstières.

Origine	Xyl/4- <i>O</i> -MeGlcA	Référence
Bois de hêtre	6,7 :1	Toman et <i>coll.</i> (1986)
Bois de peuplier	8,3 :1	Jacobs et <i>coll.</i> (2001)
Bois de bouleau	11 :1/20 :1	Jacobs et <i>coll.</i> (2001)
Bois de bouleau blanc ( <i>Betula Papyrifera</i> , Marsh)	12 :1	Bowering et <i>coll.</i> (1961)

### II.3.3. Suivi de l'extraction par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et qui ne nécessite que peu de quantité de matériau à analyser. Elle peut être employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés. Certains groupements, considérés comme marqueurs, peuvent révéler la présence de certaines catégories de polysaccharides ou d'autres molécules associées (acides féruliques, lignines, protéines). Les profils des spectres IR ainsi que les intensités relatives des bandes d'absorption obtenus lors de l'analyse des différents extraits hémicellulosiques sont similaires (extraits Ia et IIIa, figure 57).

Les spectres IR des xylanes, et plus particulièrement des 4-*O*-méthylglucuronoxylanes ont été étudiés en détail par Marchessault et Liang (1962) et plus récemment par Kacurakova et *coll.* (2000). Les bandes d'absorption apparaissant sur la figure 57 et répertoriés dans le tableau 16 sont caractéristiques de xylanes de type (1→4), avec une bande d'absorption maximale à 1044 cm<sup>-1</sup>, correspondant aux vibrations d'élongation des liaisons du cycle et des liaisons C-OH (Kacurakova et *coll.*, 1999). La bande de faible intensité, mais très nette à 898 cm<sup>-1</sup> est caractéristique des liaisons glycosidiques de type β (Gupta et *coll.*, 1987).

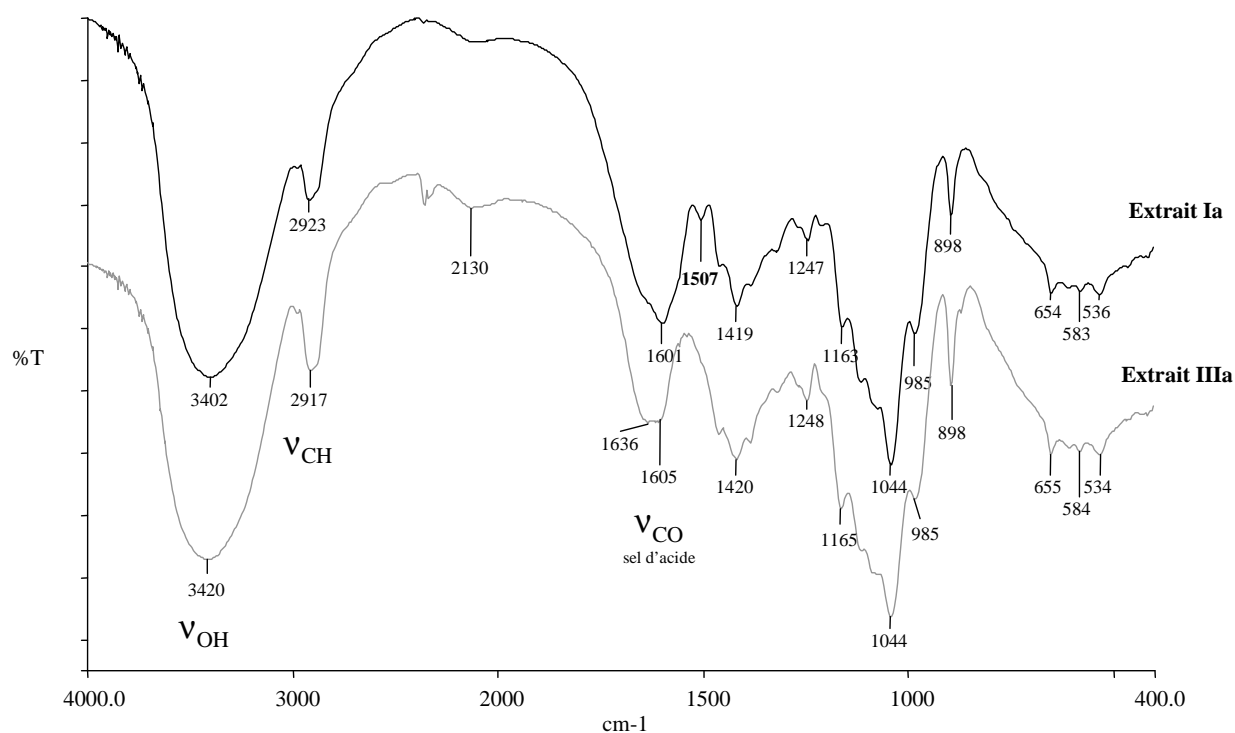


Figure 57 : Spectres IR des extraits Ia (protocole sans délignification) et IIIa (protocole avec délignification).

Tableau 16 : Bandes d'absorption caractéristiques des glucuronoxylanes (Marchessault et Liang, 1962 ; Gupta et coll., 1987 ; Bartolomé et Rupérez, 1995 ; Kacurakova et coll., 1999).

Absorptions (cm <sup>-1</sup> )	Intensité relative	Type de vibration
3400	l	ν(O-H)
2920	m	ν(C-H)
1735	m	ν(C=O)acide uronique
1605	e	ν(C=O)sel d'acide, vibration antisymétrique
1465	f	δ(CH <sub>2</sub> )symétrique
1425	f	ν(C=O)sel d'acide, vibration symétrique
1254	f	δ(CH <sub>2</sub> )
1169-1149	m	ν(C-O-C), ν(C-C)
1131-1121	e	ν(C-O-C), ν(C-C)
1096	F	ν(C-O), cycle, ν(C-C)
1044	F	ν(C-O), ν(C-C)
985	m	ν(C-O), δ(OH), vibrations du cycle
897	m	δ(CH)glycosidique (β), vibrations du cycle

l : large, m : moyenne, f : faible, F : forte, e : épaulement ; ν : vibrations de valence ; δ : vibrations de déformation.

On observe vers  $1605\text{ cm}^{-1}$ , une bande d'absorption indiquant la présence d'acides uroniques, sous forme de sels d'acides, partiellement recouverte par une bande d'absorption à  $1645\text{ cm}^{-1}$ , signalant la présence d'eau résiduelle. De façon plus précise, il est possible de noter la présence d'une bande supplémentaire dans l'extrait Ia à  $1507\text{ cm}^{-1}$ , vibrations caractéristiques des liaisons C=C aromatiques : le xylane Ia est contaminé par des traces de lignine, ce qui n'est pas le cas du xylane IIIa, extrait après délignification des sciures.

La spectroscopie IR paraît tout à fait adaptée à un suivi qualitatif des différentes étapes de l'extraction. La figure 58 présente les spectres IR de trois résidus d'extraction ( $R_{\text{dépect}}$ ,  $R_{\text{del}}$ , et Résidu IVb) comparés au spectre de la sciure brute ( $R_b$ ). Au cours des prétraitements et de l'extraction des xylanes, il est possible de suivre l'évolution de certaines bandes caractéristiques des polymères pariétaux. C'est par exemple le cas de la disparition après délignification des bandes  $\nu(\text{C}=\text{C})$  à  $1508\text{ cm}^{-1}$  et  $1596\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques des cycles aromatiques. C'est aussi le cas de la disparition de la bande d'absorption à  $1736\text{ cm}^{-1}$ , témoin de la présence d'acides uroniques, ou des bandes  $\delta(\text{CH}_2)$  à  $1253$  et  $1464\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques des xylanes, dans le résidu cellulosique.

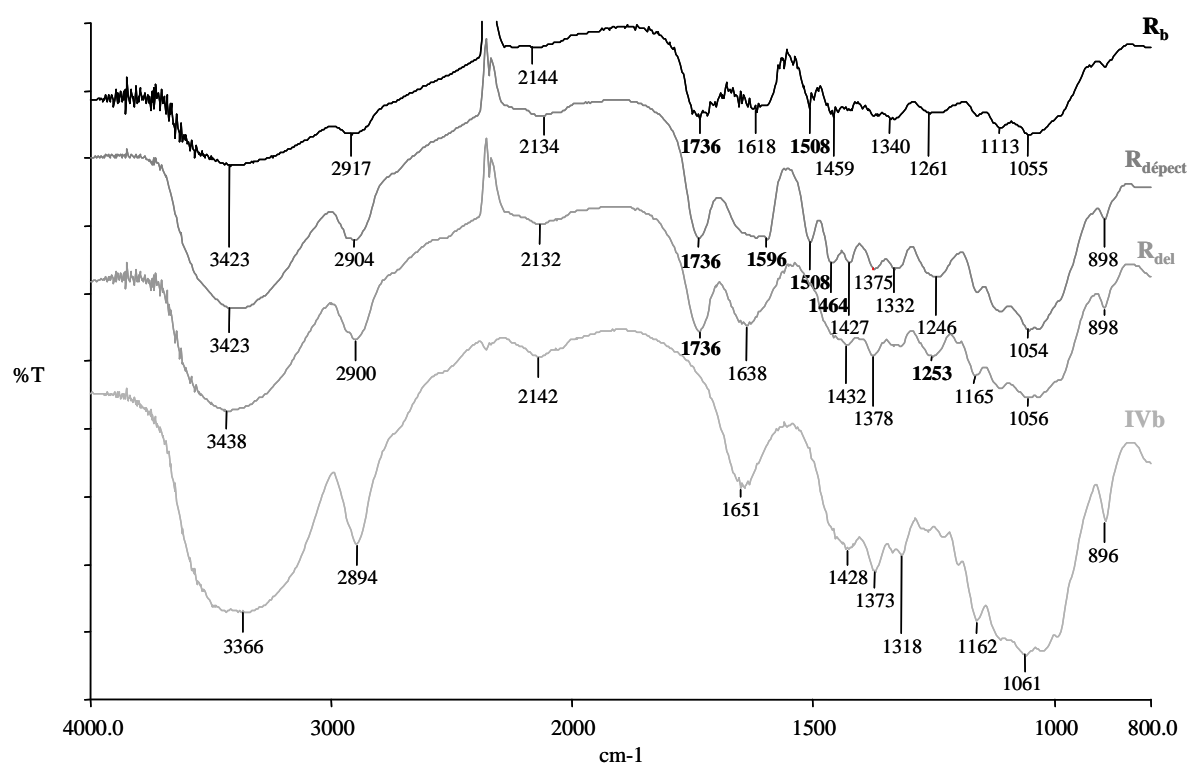


Figure 58 : Spectres IR des résidus après différentes étapes d'extraction.

Les absorptions à 1428 (déformation des liaisons CH<sub>2</sub>), 1373 (déformation des liaisons CH), 1318 (déformation des liaisons OH ou CH<sub>2</sub>), 1162, 1120, 1061, 1033 (élongation des liaisons C-OH, C-O-C, C-C et des liaisons du cycle), 930 et 897 cm<sup>-1</sup> (déformations du cycle et de la liaison CH glycosidique) correspondent quant à elles à des vibrations typiques de la cellulose (Liang et Marchessault, 1959).

#### **II.3.4. Polydispersité des polysaccharides extraits**

Après avoir dressé le bilan quantitatif et qualitatif des différents xylanes extraits, ainsi qu'une analyse de composition, nous avons voulu évaluer leur polydispersité, c'est à dire leur dispersion en masse. Un fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique (CES) a été réalisé à cette fin pour déterminer la distribution en masse des extraits hémicellulosiques. L'élution a été suivie par dosage colorimétrique au phénol (méthode de Dubois, 1956). La CES est fondée sur la rétention sélective des molécules pénétrant dans les pores d'une phase stationnaire, en fonction de leur taille, ou plus exactement en fonction de leur volume hydrodynamique qui rend compte également de la conformation de la molécule. Les molécules de masse moléculaire élevée sont exclues des pores et migrent donc plus rapidement que les petites molécules qui peuvent pénétrer dans les pores. Il existe une relation directe entre le volume d'élution et la masse moléculaire des molécules éluées, dans les limites de séparation caractéristiques de chaque matrice chromatographique.

Considérées comme les plus représentatives, les fractions KOH 4,3M du protocole (figure 56 p 124) ont été soumises à un tri moléculaire sur colonne d'exclusion stérique de type Sepharose CL4B. Les profils de séparation recueillis à cette occasion présentent pour chacun des quatre extraits un même pic majoritaire pour un volume  $V_{\text{élution}} \approx 110$  mL (figure 59 a et b). Comparés aux extraits IIb et IVb qui n'ont pas subi d'imprégnation, les extraits Ib et IIIb apparaissent plus hétérogènes, présentant d'un spectre d'élution beaucoup plus large. Une telle observation confirme que les glucuronoxylanes sont une catégorie d'hémicelluloses très facilement extractibles, qui ne nécessitent pas d'imprégnation préalable des parois cellulaires. En facilitant l'extraction d'autres catégories d'hémicelluloses, l'imprégnation des parois conduit par ailleurs à la contamination des xylanes recueillis de la fraction KOH 4,3M. Enfin la délignification préalable des sciures, pourtant réalisée en conditions acide et oxydante, n'a aucune conséquence sur la qualité des glucuronoxylanes

extraits. En effet, en présentant des volumes d'élution identiques quel que soit le protocole utilisé, les profils de séparation chromatographiques de la figure 59 confirment que la structure des molécules extraites est préservée et ce malgré le caractère acido-labile des xylanes.

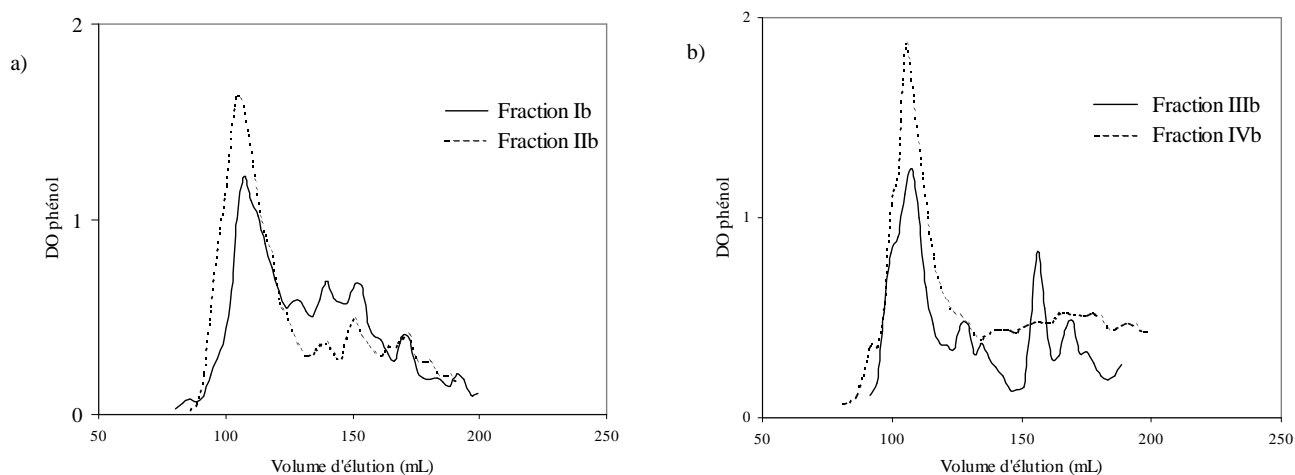


Figure 59 : profils obtenus par chromatographie d'exclusion stérique ; a) Extraits obtenus par les protocoles I et II sans délignification ; b) Extraits obtenus par les protocoles III et IV avec délignification.

En conclusion, nos travaux montrent que les glucuronoxylanes sont des molécules facilement extractibles. Les protocoles utilisés pour l'extraction des polysaccharides pariétaux non cellulotiques à partir de sciures de châtaignier ont permis d'isoler des xylanes relativement purs et en quantité (jusqu'à 19% de la masse sèche de bois). L'analyse de composition a montré, grâce à l'identification de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, qu'il s'agit de 4-*O*-méthylglucuronoxylanes, typiques des bois de feuillus. Nos résultats montrent que l'imprégnation des parois cellulaires ne se révèle pas nécessaire, ce qui n'est pas le cas pour d'autres hémicelluloses plus internes à la paroi. En revanche les xylanes sont d'autant mieux extraits si la paroi a été délignifiée au préalable, ce qui témoigne de la complexité et des associations entre les molécules constituant le réseau tridimensionnel de la paroi végétale. En effet si la délignification ne semble pas avoir de conséquence sur la nature chimique des hémicelluloses extraites, en favorisant leur extractibilité, elle influe de façon positive et significative sur les rendements d'extraction.

## **II.4. Analyse structurale d'un 4-O-méthylglucuronoxylane**

Comme nous l'avons rappelé dans le premier chapitre, l'analyse de la structure d'un polysaccharide repose sur l'obtention d'oligosaccharides plus faciles à caractériser. Ils doivent être de DP intermédiaires, suffisamment faibles pour être simples à caractériser mais en même temps, suffisamment importants pour qu'ils soient représentatifs de la structure du polysaccharide. La libération d'oligosaccharides à partir d'un polymère peut être envisagée de plusieurs façons. L'hydrolyse acide ménagée est une méthode non sélective, qui, de par son mode de rupture aléatoire, permet d'obtenir une large gamme d'oligosaccharides. Ceux-ci, une fois associés, peuvent faire apparaître un motif commun qui permettra de donner une image la plus fidèle possible de la structure du polymère. De manière complémentaire, on peut également faire appel aux techniques d'hydrolyse sélective. De telles méthodes existent, mais leur utilisation se limite à quelques cas particuliers. C'est le cas par exemple de la dégradation par le lithium dans l'éthylène diamine des acides uroniques décrite par Mort et Bauer (1982) et Lau et *coll.* (1987). Les méthodes d'hydrolyse sélective les plus efficaces sont celles qui font appel aux enzymes spécifiques.

### **II.4.1. Obtention d'oligosaccharides par différents protocoles d'hydrolyse**

Nous avons choisi d'étudier différents protocoles d'hydrolyse d'un 4-O-méthylglucuronoxylane commercial extrait du hêtre (xylane commercial SIGMA). La composition de ce xylane modèle a été caractérisé par dosage colorimétrique ; il contient 92,5% d'oses neutres et 7,5% d'acides uroniques. Le dosage des sucres réducteurs a permis de calculer un DP moyen de 208 (rapport entre la quantité de sucres totaux et la quantité de sucres réducteurs).

Les méthodes chimiques et enzymatiques mises en œuvre ont conduit à l'obtention de mélanges d'oligosaccharides, que nous avons caractérisé soit en mélange par spectrométrie de masse MALDI, soit par RMN après purification chromatographique.

#### ***II.4.1.a. Hydrolyse enzymatique***

Le système xylanolytique comprend toutes les enzymes participant à l'hydrolyse des xylanes substitués ou non. De ce fait, ce système xylanolytique comprend deux types

d'enzymes : les enzymes hydrolysant la chaîne principale et celles libérant les substituants (figure 33, chapitre I). Si on considère les xylanases hydrolysant la chaîne principale, il est possible d'identifier à nouveau deux types d'enzymes : les exoxylosidases ou  $\beta$ -xylosidases (EC 3.2.1.37) et les endoxylanases (EC 3.2.1.8). Les  $\beta$ -xylosidases hydrolysent les xylo-oligosaccharides et le xylobiose en xylose. Elles permettent une dégradation résidu par résidu à partir de l'unité terminale non réductrice de la chaîne de xylane. Les endo- $\beta$ -1,4-xylanases catalysent l'hydrolyse d'une liaison glycosidique au milieu d'une chaîne et sont spécifiques des liaisons  $\beta$ -1,4 entre les résidus xylose de la chaîne principale des xylanes.

Dans notre cas, l'obtention d'oligosaccharides à partir du xylane, nécessite l'utilisation d'une endo- $\beta$ -1,4-xylanase. Les endo- $\beta$ -1,4-xylanases microbiennes peuvent être d'origine fongique ou bactérienne, les plus étudiées étant d'origine fongique, parmi lesquelles celles d'*Aspergillus niger*. Elles sont également produites par différentes espèces de *Trichoderma* ainsi que par de nombreux autres champignons. L'enzyme que nous avons utilisée pour ce travail est une endoxylanase commerciale d'*Aspergillus niger* utilisée dans l'industrie de la panification.

Le protocole d'hydrolyse enzymatique que nous avons choisi consiste à mettre le xylane, préalablement dissous dans de l'eau, en contact avec l'enzyme (0,25%). Nous avons préféré opérer en milieu aqueux plutôt qu'en milieu tamponné, afin d'éviter la présence de sels. La digestion enzymatique est réalisée sous agitation dans un bain-marie thermostaté à 35°C. Une cinétique de l'hydrolyse a permis de montrer qu'un temps de 5 minutes d'incubation était suffisant pour obtenir des oligosaccharides de taille intermédiaire ; le xylose devient très vite le produit majoritaire pour des temps plus longs. Après séparation sur colonne d'exclusion stérique de Biogel P2, les produits issus de l'hydrolyse du xylane ont été analysés par CCM. Le profil chromatographique, présenté figure 60, révèle la présence d'une série d'oligosaccharides de tailles variables.

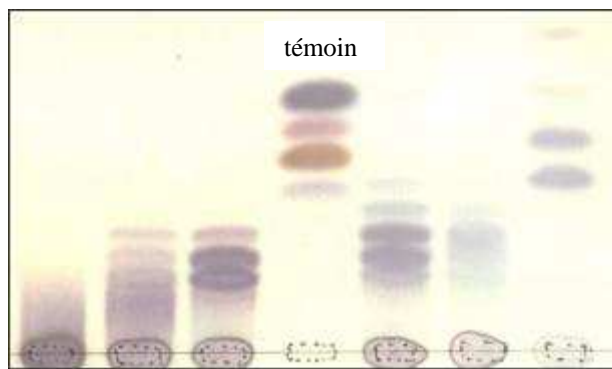


Figure 60 : Suivi de l'élution par CCM des xylo-oligosaccharides issus de l'hydrolyse enzymatique du xylane ;  
témoin : acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose (de bas en haut),  
éluant : Butanol/acide acétique/eau 2:1:1, révélation à l'orcinol sulfurique.

Les poids moléculaires et les DP des xylo-oligosaccharides constituant l'hydrolysats ont été déterminés par spectrométrie de masse de type MALDI. Les échantillons ont été étudiés sous forme native. Le spectre de masse obtenu est représenté figure 61. Les ions pseudo-moléculaires formés sont de type  $[M+Na]^+$ .

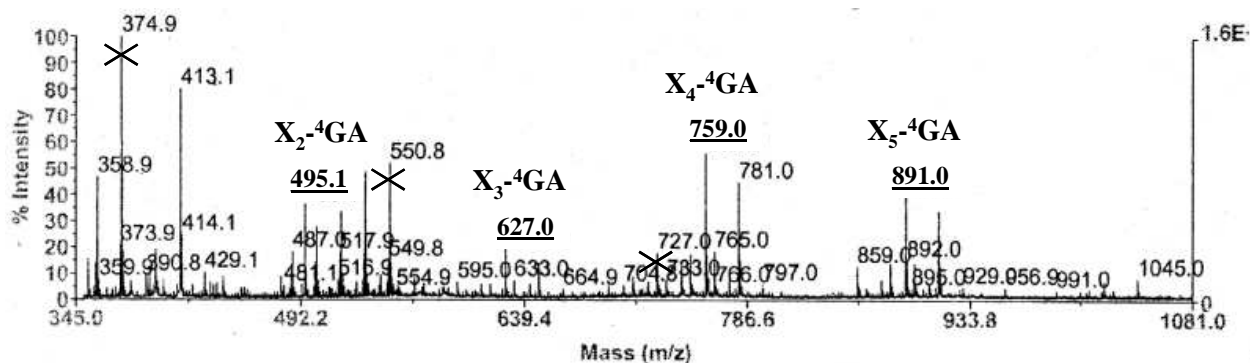


Figure 61 : Spectre de masse MALDI des xylo-oligosaccharides issus de l'hydrolyse enzymatique du xylane ; X = xylose ; <sup>4</sup>GA = acide 4-O-méthylglucuronique.

Les produits d'hydrolyse sont ici exclusivement des xylo-oligosaccharides acides substitués par une unité d'acide 4-O-méthylglucuronique, avec des DP compris entre 3 et 6. La présence d'une unité d'acide 4-O-méthylglucuronique dans chacun des oligosaccharides obtenus suggère que ce substituant est directement impliqué dans le mode d'action de l'enzyme. Les endoxylanases d'*Aspergillus niger* sont connues pour avoir une forte affinité pour les liaisons situées près des points de branchement de la chaîne principale (Takenishi et Tsujisaka, 1973). Nishitani et Nevins (1991) ont montré l'existence d'un type de  $\beta$ -1,4-xylanohydrolase spécifique des glucuronoxylanes, où les résidus glucuronosyle sont indispensables à l'action de cette enzyme. Il semblerait que l'enzyme reconnaisse les



substituants glucuronosyle et hydrolyse la liaison  $\beta$ -1,4-xylosyle adjacente au résidu xylosyle non substitué des glucuronoxylanes. Ce mode d'action semble être en accord avec nos résultats et pourrait expliquer le caractère spécifique de cette hydrolyse enzymatique qui ne fournit que des oligosaccharides acides.

#### ***II.4.1.b. Hydrolyse acide***

Nous avons tout d'abord effectué des cinétiques d'hydrolyse en faisant varier la nature et la concentration de l'acide, la durée et la température de la réaction d'hydrolyse, pour une même quantité de polysaccharide, dans le but de déterminer les conditions optimales de libération d'oligosaccharides de taille intermédiaire.

Sur la base de ces manipulations, nous avons choisi l'hydrolyse par l'acide sulfurique 50 mM. Le xylane est mis en présence d'acide sulfurique 50 mM et placé à l'étuve à 110°C pendant deux heures. A la fin de la réaction, l'hydrolysats est neutralisé. On ajoute ensuite trois volumes d'éthanol pour précipiter la fraction macromoléculaire non dégradée. Les oligosaccharides obtenus sont alors déposés sur colonne de Biogel P2, équilibrée dans une solution de NaCl 50 mM, et les fractions collectées sont contrôlées par CCM. Le profil chromatographique (figure 62) des produits d'hydrolyse révèle la présence de deux séries d'oligosaccharides, l'une acide en raison de la présence de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique et l'autre neutre. En effet, dans un même système d'éluant, la migration des oligosaccharides est d'une part liée à la masse moléculaire de l'oligosaccharide, mais elle est également fonction de la charge de l'oligosaccharide.

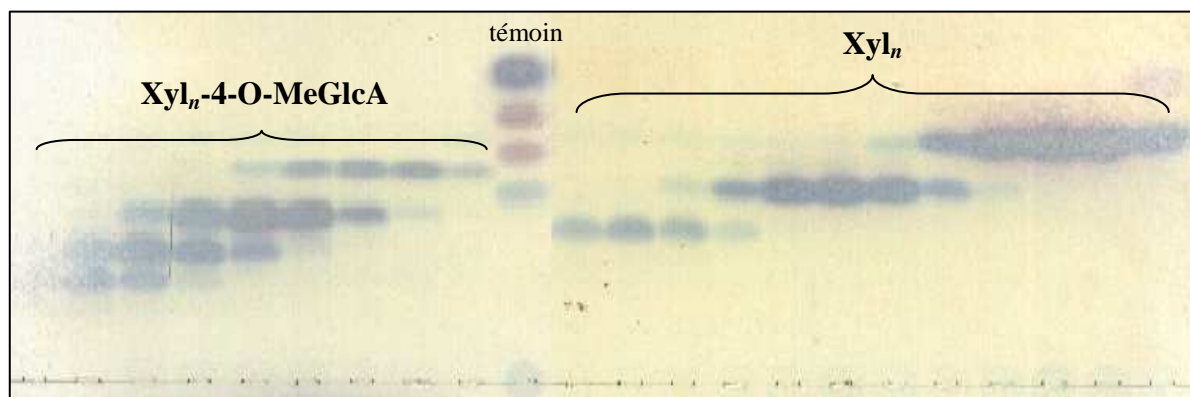


Figure 62 : Suivi de l'élution par CCM des xylo-oligosaccharides issus de l'hydrolyse acide du xylane ;  
témoin : acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose (de bas en haut),  
éluant : Butanol/acide acétique/eau 2:1:1, révélation à l'orcinol sulfurique.

Cette observation a été confirmée par une analyse par spectrométrie de masse MALDI des deux fractions identifiées par CCM. Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Oligosaccharides identifiés par spectrométrie de masse MALDI dans les fractions acide et neutre obtenues par hydrolyse acide du xylane.

Fraction neutre		Fraction acide	
Oligosaccharides	[M+Na] <sup>+</sup>	Oligosaccharides	[M+Na] <sup>+</sup>
(pentose) <sub>2</sub>		(pentose)-(4- <i>O</i> -MeGlcA)	363,0
(pentose) <sub>3</sub>	437,0	(pentose) <sub>2</sub> -(4- <i>O</i> -MeGlcA)	495,2
(pentose) <sub>4</sub>	569,0	(pentose) <sub>3</sub> -(4- <i>O</i> -MeGlcA)	627,0
(pentose) <sub>5</sub>	701,0	(pentose) <sub>4</sub> -(4- <i>O</i> -MeGlcA)	759,1
(pentose) <sub>6</sub>	833,1	(pentose) <sub>5</sub> -(4- <i>O</i> -MeGlcA)	891,1
(pentose) <sub>7</sub>	965,1	(pentose) <sub>6</sub> -(4- <i>O</i> -MeGlcA)	1022,9

La fraction neutre est composée d'oligosaccharides comportant 3 à 7 unités xylose et la fraction acide révèle la présence d'une série de xylo-oligosaccharides, de DP compris entre 2 et 7, substitués par une unité d'acide 4-*O*-méthylglucuronique.

#### ***II.4.1.c. Autohydrolyse***

Cette méthode (chapitre I) consiste à hydrolyser le polysaccharide en utilisant sa propre acidité, due à la présence de fonctions carboxyliques ou sulfates portées par les sucres constitutifs du polymère.

Par simple chauffage à l'étuve et sous l'effet de l'acidité apportée par les fonctions carboxyliques, le polymère est hydrolysé. Un passage sur colonne échangeuse d'ions permet de séparer les produits d'hydrolyse en deux fractions, l'une acide, l'autre neutre (figures 63 et 64). L'analyse de la fraction acide par spectrométrie de masse MALDI, illustrée par le profil présenté figure 65, fait apparaître une série d'oligosaccharides ne comportant qu'une seule unité d'acide 4-*O*-méthylglucuronique, et comportant 4 à 12 xylose. Cette technique d'hydrolyse douce permet l'obtention de fragments relativement importants, plus caractéristiques de la structure du polymère.

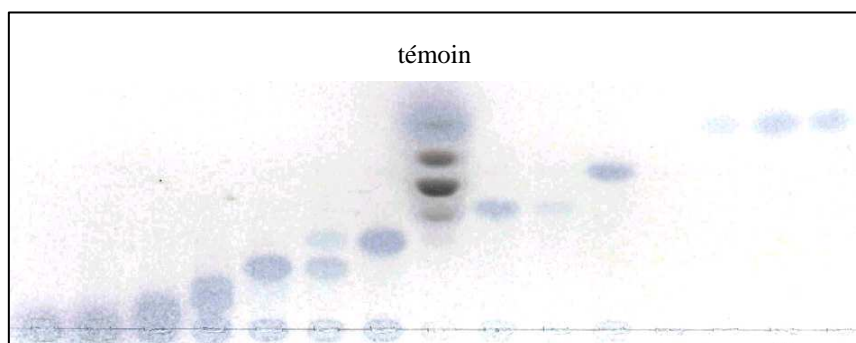


Figure 63 : Séparation de la fraction oligosaccharidique neutre sur colonne de Biogel P4, éluée par une solution de NaCl 50 mM ; témoin : acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose (de bas en haut), éluant : Butanol/acide acétique/eau 2:1:1, révélation à l'orcinol sulfurique.

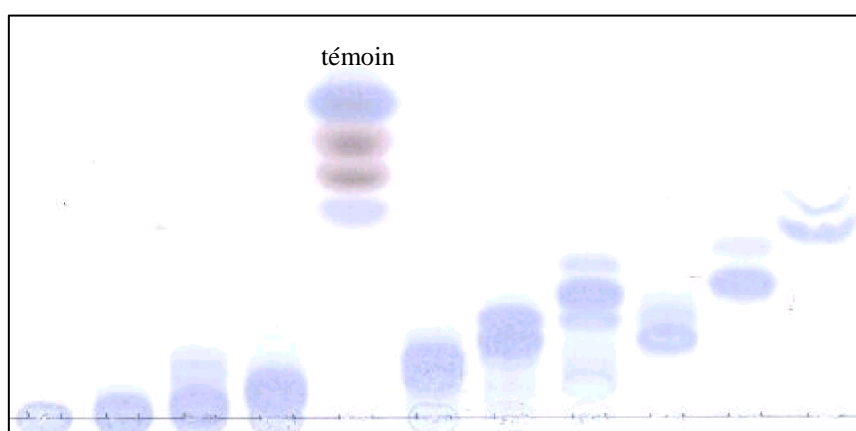


Figure 64 : Séparation de la fraction oligosaccharidique acide sur colonne de Biogel P4, éluée par une solution de NaCl 50 mM ; témoin : acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose (de bas en haut), éluant : Butanol/acide acétique/eau 2:1:1, révélation à l'orcinol sulfurique.

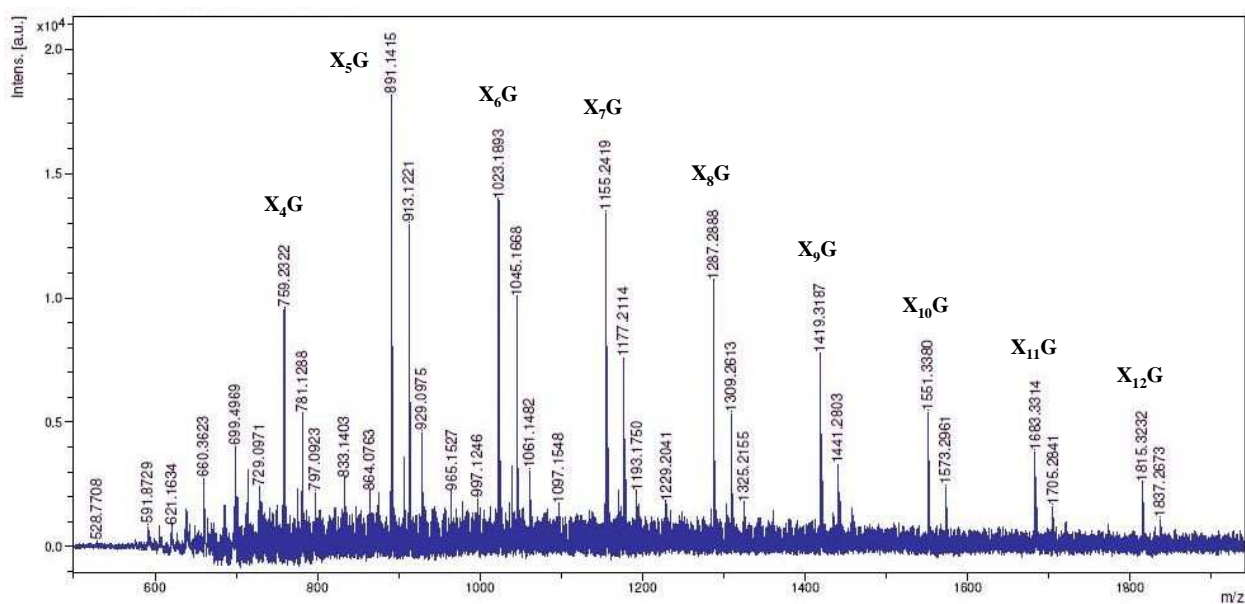


Figure 65 : Spectre de masse MALDI des xylo-oligosaccharides issus de l'autohydrolyse du xylane ;  $X_nG$  = oligosaccharides acides (xylose/acide 4-O-méthylglucuronique) de type  $[M+Na]^+$  et  $[M-H+2Na]^+$ .

## II.4.2. Séparation et caractérisation des xylo-oligosaccharides obtenus par hydrolyse acide

Les produits issus de l'hydrolyse acide ont été séparés sur colonne de Biogel P2 éluée dans l'eau. La purification des différentes fractions a été effectuée par plusieurs chromatographies successives sur P2. Ainsi quatre oligosaccharides acides et trois xylo-oligosaccharides neutres ont pu être purifiés, comme le montre la CCM de la figure 66.

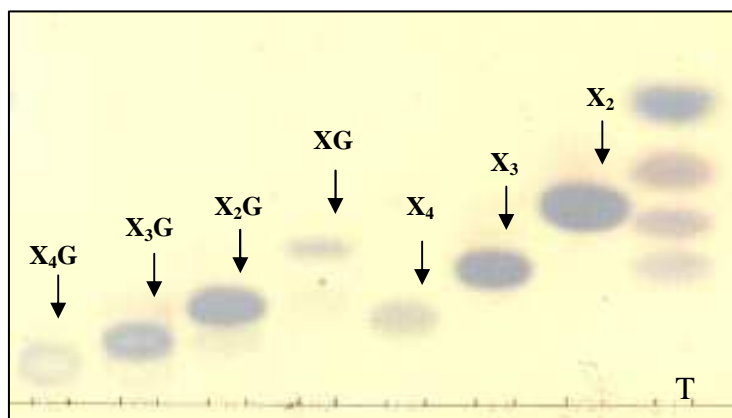


Figure 66 : Oligosaccharides purifiés issus de l'hydrolyse acide du xylane ;  $X_nG$  = oligosaccharides acides ;  $X_n$  = oligosaccharides neutres ; T = oligosaccharides témoins (acide glucuronique, saccharose, glucose, xylose).

Une analyse par spectroscopie RMN a été réalisée pour les oligosaccharides majoritaires recueillis en quantité suffisante pour l'analyse, les fractions  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_2G$ , afin de confirmer leurs structures.

L'analyse des spectres RMN  $^1H$  des oligosaccharides  $X_2$  et  $X_3$  (Tableau 18) montre qu'ils renferment uniquement du xylose, et correspondent respectivement au xylobiose et xylotriose. Les signaux dus aux protons anomères sont facilement caractérisés pour des champs faibles ( $\delta_{H1\alpha} = 5,22-5,26$  et  $\delta_{H1\beta} = 4,62$  ppm). Par ailleurs, l'unité réductrice de xylose, dans chacune des fractions, existe sous les deux formes anomères  $\alpha$  et  $\beta$ , que l'on identifie par la valeur des constantes de couplage ( $J_{H1\alpha} = 3,6$  et  $J_{H1\beta} = 7,8-7,9$  Hz). A partir de ces signaux, la technique 2D-COSY, permet d'attribuer les protons  $H2\alpha$  et  $\beta$ , via les couplages scalaires  $^1H-^1H$ , ainsi que les autres protons de cette unité. L'unité terminale non réductrice est caractérisée par son proton H4 à  $\delta = 3,66$  ppm, alors que ce signal est observé aux environ de 3,80 ppm dans le cas d'une unité xylose substituée en position 4. L'analyse du spectre RMN  $^{13}C$  montre également que certains signaux sont affectés par l'équilibre de mutarotation, ce qui facilite leur identification (tableau 19). Tous les signaux ont été attribués

par RMN 2D hétéronucléaire. Ainsi, l'analyse RMN de ces xylo-oligosaccharides confirme les structures suivantes (figure 67) :

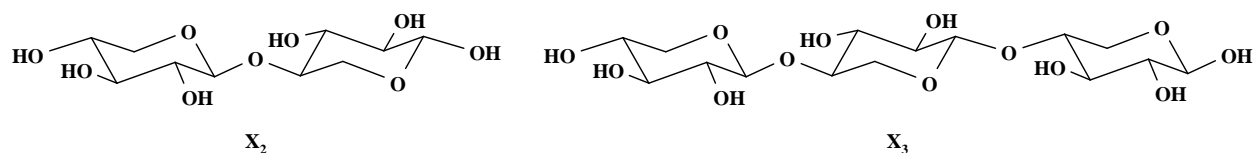


Figure 67 : Structures du xylobiose ( $X_2$ ) et du xylotriose ( $X_3$ ).

Concernant la fraction oligosaccharidique  $X_2G$ , l'analyse du spectre  $^1H$  conduit à identifier un acide aldotriuronique. Dans ce cas se pose le problème du site de ramification de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, qui peut être lié sur l'une des unités xylose, réductrice ou terminale. L'effet anomère, que l'on retrouve au niveau de l'unité réductrice, se manifeste également pour l'unité d'acide uronique porté par l'oligosaccharide  $X_2G$ . Parmi les signaux dus aux protons anomères, on peut facilement identifier le proton H1 de l'unité d'acide uronique ; celui-ci présente un couplage d'intensité moyenne avec H2 ( $J = 3,8-3,9$  Hz,  $\delta = 5,47-5,50$  ppm), caractérisant une liaison  $\alpha$  avec le xylose. Parallèlement, on remarque que le H2 de l'unité terminale non réductrice est déblindé à  $\delta = 3,58$  ppm, au lieu de 3,29 ppm dans le cas du xylobiose, ceci indiquant que l'unité d'acide uronique est portée par cette unité xylose terminale, en O-2. Ce résultat est plus marqué dans le spectre carbone, dans lequel l'unité terminale montre un déblindage important du C2 à  $\delta = 76,89$  ppm au lieu de 73,18 ppm, quand cette position n'est pas substituée. Des expériences d'effet Overhauser nucléaire (nOe) à travers les liaisons glycosidiques permettraient de confirmer le site de ramification et de l'enchaînement des résidus (Excoffier et *coll.*, 1986). La structure de l'oligosaccharide  $X_2G$  est donnée figure 68, les données RMN (tableau 18 et 19) étant confirmées par les données de la littérature (Cavagna et *coll.*, 1984).

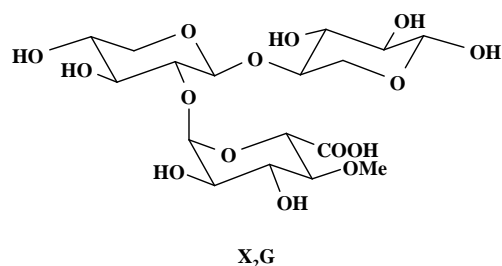


Figure 68 : Structure de l'acide 2'-*O*-(4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucurono)xylobiose ( $X_2G$ ).

Tableau 18 : Déplacements chimiques des protons des xylo-oligosaccharides des fractions X2, X3 et XG3 (D<sub>2</sub>O).

Fraction	Résidu	Déplacements chimiques en ppm (J en Hz)					
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5ax	H-5éq
<b>X<sub>2</sub></b>	Xyl red α	5,26 (d, 3,6)	3,58 (dd, 3,4 ; 9,2)	3,78	3,77	3,78*	3,85*
	β	4,62 (d, 7,9)	3,28	3,59 (t, 9,2)	3,80	3,41 (tap, 10,8)	4,09 (dd, 5,3 ; 11,7)
	Xyl term	4,49 (d, 7,8)	3,29	3,47 (t, 9,2)	3,66	3,35 (tap, 11,3)	4,00 (dd, 5,4 ; 11,5)
<b>X<sub>3</sub></b>	Xyl red α	5,22 (d, 3,6)	3,58	3,82	3,78	3,78	3,83
	β	4,62 (d, 7,9)	3,29	3,58 (t, 9,3)	3,82	3,42	4,09 (dd, 5,3 ; 11,7)
	Xyl int	4,51 (d, 6,8)	3,33	3,59 (t, 9,2)	3,83	3,42	4,14 (dd, 5,3 ; 11,7)
	Xyl term	4,50 (d, 7,5)	3,29	3,47 (t, 9,3)	3,66 (dtap, 5,5 ; 9,6)	3,35	4,01 (dd, 5,4 ; 11,6)
<b>X<sub>2</sub>G</b>	Xyl red α	5,33 (d, 3,6)	3,69	3,90	3,92	3,59	3,90
	β	4,74 (d, 7,8)	3,41	3,73	3,97	3,59	4,27 (dd, 5,3 ; 11,7)
	Xyl term	4,77	3,58 (t, 9,2)	3,67 (t, 9,1)	3,82 (dt, 5,6 ; 9,4)	3,50	4,15 (dd, 5,4 ; 11,5)
	(Xylred α) – MeGlcA	5,50 (d, 3,8)	3,75	3,94 (t, 9,4)	3,41 (t, 10,1)	4,46 (d, 9,9)	
	(Xylred β) – MeGlcA	5,47 (d, 3,9)	3,74			4,45 (d, 10,0)	
					(s, 3,64, OCH <sub>3</sub> )		

s (singulet), sél. (singulet élargi), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), dt (double triplet), tap (triplet apparent), dtap (double triplet apparent), ddd (double double doublet), m (multiplet).

Tableau 19 : Déplacements chimiques des carbones des xylo-oligosaccharides des fractions X2, X3 et XG3 (D<sub>2</sub>O)

Fraction	Résidu	Déplacements chimiques en ppm						
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	OMe	COOH
X <sub>2</sub>	Xyl red α	92,42	71,79	71,36	77,01	59,26		
		96,93	74,40	74,34	76,86	63,39		
	Xyl term	102,26	73,18	76,01	69,60	65,62		
X <sub>3</sub>	Xyl red α	92,42	71,79	71,36	76,97	59,23		
		96,93	74,41	74,32	76,80	63,45		
	Xyl int	102,07	73,09	74,07	76,80	63,37		
	Xyl term	102,26	73,18	76,01	69,59	65,62		
X <sub>2</sub> G	Xyl red α	92,41	71,79	71,43	76,82	59,14		
		96,98	74,41	74,41	76,70	63,28		
	Xyl term	102,04	76,89	74,80	69,83	65,36		
	(Xylred α) – MeGlcA	97,93	71,75	72,72	82,86	72,72*	60,22	176,97
	(Xylred β) – MeGlcA	97,87				72,67*		

\* valeurs interchangeables.

### II.4.3. Etude du xylane natif

#### II.4.3.a. Analyse par RMN

A la caractérisation fastidieuse des oligosaccharides obtenus par hydrolyse des polymères, se substitue de plus en plus l'analyse directe du polysaccharide sous forme native. Ceci est d'autant plus facile que le polymère présente une structure homogène et répétitive comme c'est le cas pour les xylanes que nous avons extraits. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de caractériser les fractions polysaccharidiques extraites au cours de ce travail à l'aide de la RMN 1D et 2D. Les spectres ont été enregistrés dans l'eau lourde ( $D_2O$ ) et les figures 69 et 70 présentent à titre d'exemple, les spectres  $^1H$  et  $^{13}C$  obtenus pour le 4-*O*-méthylglucuronoxylane commercial extrait du hêtre. Des données bibliographiques ainsi que l'interprétation des spectres 2D (COSY et HMQC) ont permis d'attribuer les différents signaux (tableau 20).

Le spectre RMN  $^1H$  fait apparaître des signaux intenses correspondant aux protons des unités xylose de la chaîne principale non substitués, ainsi que des signaux moins intenses attribués aux unités d'acide uronique et aux unités xylose qui les portent en position 2. L'intensité de ces signaux dépend du taux de substitution par l'acide uronique. Les doublets attribués aux protons anomériques des unités xylose, substituées (4,5 ppm) ou non (4,6 ppm), sont associés à une constante de couplage d'environ 7 Hz, caractéristique d'une liaison osidique de type  $\beta$ . La constante de couplage du doublet correspondant aux protons anomériques de l'acide uronique, à 5,3 ppm, est quant à elle de l'ordre de 2 Hz, ce qui caractérise une liaison osidique de type  $\alpha$ . Il est par ailleurs possible d'observer sur les différents spectres  $^1H$  des xylanes, un singulet fin vers 3,4 ppm, qui est à associer à l'existence de groupements méthyle portés, compte-tenu de l'intégration, par l'acide uronique. Cette dernière remarque confirme la présence de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique. Celui-ci est fixé en position 2 du xylose, ce qui se traduit par un déblindage plus important du H2 par rapport aux unités xylose non substitués.

Le spectre  $^{13}C$  montre également deux groupes de signaux ; certains, de forte intensité, correspondent aux carbones des résidus xylose non substitués, les autres étant attribués aux xyloses substitués et aux résidus 4-*O*-MeGlcA. La présence de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique est là aussi confirmée par la présence d'un signal à 177 ppm



correspondant au groupement carboxyle et celle vers 60 ppm d'un signal d'un groupement méthyle.

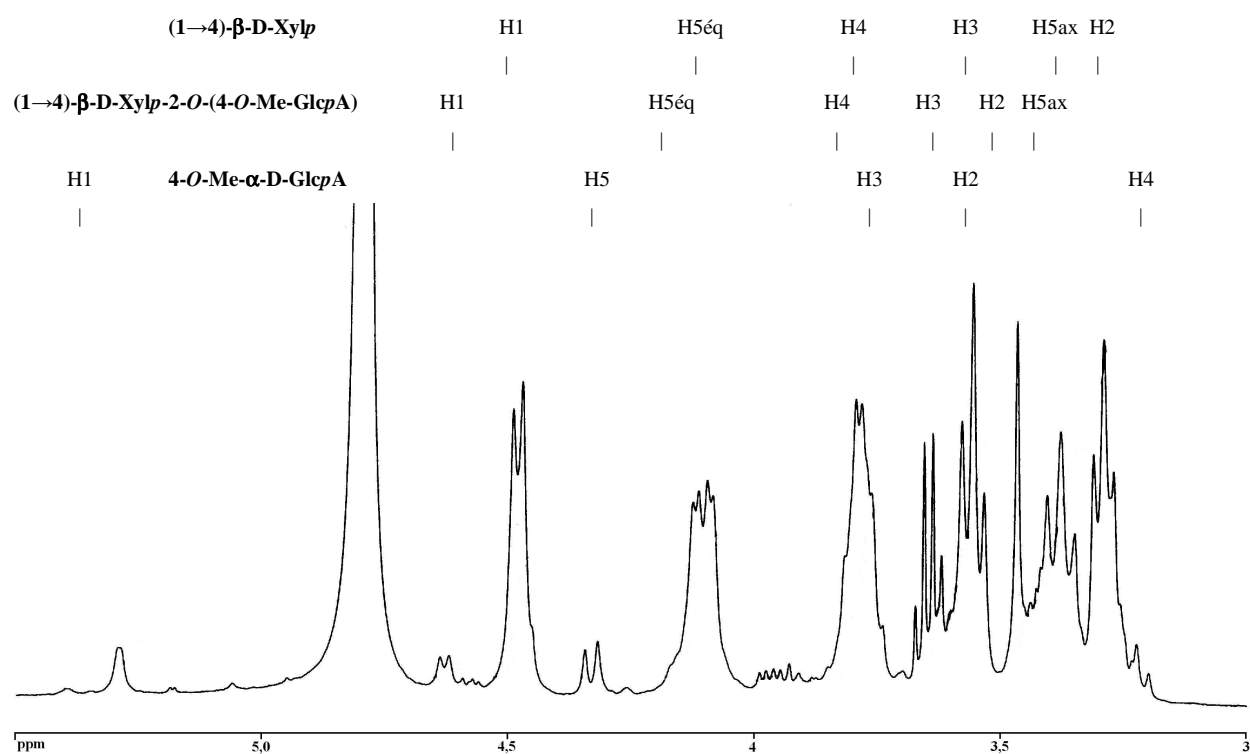


Figure 69 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du 4-*O*-méthylglucuronoxylane commercial dans  $\text{D}_2\text{O}$ , mettant en évidence les signaux attribués aux protons des xyloses internes non substitués, des xyloses substitués par l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, et des unités d'acide 4-*O*-méthylglucuronique.

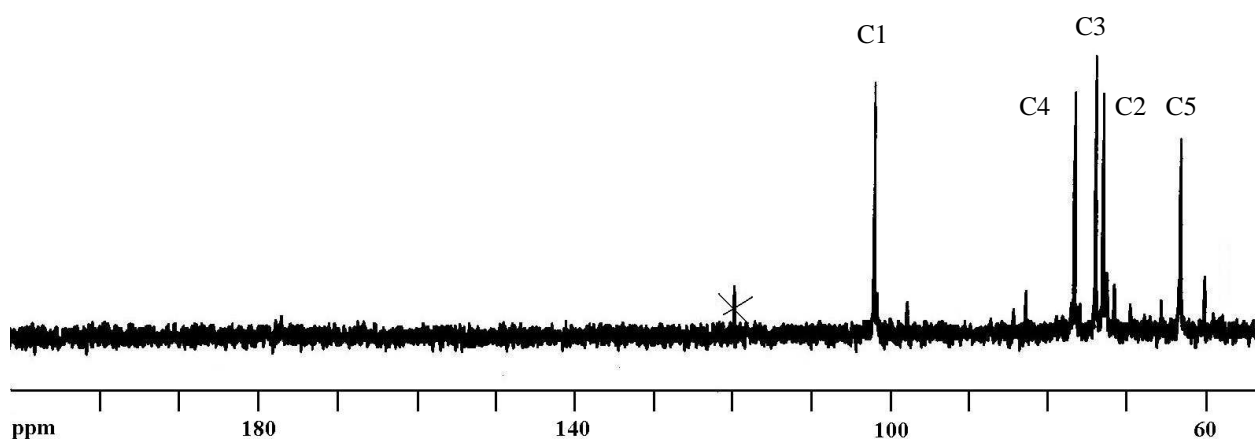


Figure 70 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du 4-*O*-méthylglucuronoxylane commercial dans  $\text{D}_2\text{O}$  ; seules les attributions correspondant aux carbones des unités de xylose non substituées sont indiquées.

Tableau 20 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques du xylane (D<sub>2</sub>O).

Résidus glycosidiques	Déplacements chimiques en ppm (J en Hz)					
		1	2	3	4	5
(1→4)-β-D-Xylp	<sup>1</sup> H	4,48 (7,5)	3,29 (8,2)	3,55 (9,0)	3,79	4,10 (4,5 ; 11,5) ; 3,38 (11,0)
	<sup>13</sup> C	102,09	73,11	74,07	76,76	63,38
(1→4)-β-D-Xylp-2-O-(4-O-Me-GlcpA)	<sup>1</sup> H	4,63 (7,2)	3,44	3,62	3,81	4,15 ; 3,42
	<sup>13</sup> C	101,79	76,03	71,67*	74,21	63,20
4-O-Me-α-D-GlcpA	<sup>1</sup> H	5,29 (2,0)	3,60	3,76	3,22 (9,7)	4,33 (10,1)
					(3,46, OCH <sub>3</sub> )	
	<sup>13</sup> C	97,94	72,64*	77,22	82,89	72,76*
				(60,29, OCH <sub>3</sub> )	(177,21, COOH)	

\*valeurs interchangeable

Les spectres présentés et leur interprétation, ainsi que l'ensemble des spectres obtenus pour les différentes fractions extraites, confirment que les polysaccharides étudiés appartiennent à la classe des xylanes de type β(1→4), et plus précisément des 4-*O*-méthylglucuronoxylanes.

Dans ce cas, l'utilisation de la RMN est d'autant plus intéressante que sur la base des spectres <sup>1</sup>H réalisés, il est possible de déterminer le taux de substitution de la chaîne principale par l'acide 4-*O*-méthylglucuronique dans chaque échantillon. La composition molaire peut en effet être calculée en comparant l'intégration correspondant à l'ensemble des protons anomériques des unités xylose et l'intégration des protons anomériques des acides uroniques. C'est ainsi, que sur la base du spectre présenté figure 69, nous avons pu déterminer le taux de substitution du xylane commercial, qui est d'environ 1/10. Les rapports molaires Xyl/4-*O*-MeGlcA sont présentés dans le tableau 21.

Dans le cas des fractions non délignifiées (extraits Ia, Ib et IIb), les spectres obtenus ne permettent pas toujours de déterminer le taux Xyl/4-*O*-MeGlcA par manque de résolution. Ces xylanes, associés à la lignine résiduelle sont en effet moins solubles dans D<sub>2</sub>O. Les fractions qui ont pu être analysées par RMN <sup>1</sup>H montrent une très faible variabilité du taux d'acide uronique présent, qui est environ d'une unité d'acide 4-*O*-méthylglucuronique pour six unités xylose (tableau 21). Les différents protocoles d'extraction mis en oeuvre, mènent donc qualitativement aux mêmes molécules de xylanes.

Tableau 21 : Rapports molaires Xylose / acide 4-*O*-méthylglucuronique des différentes fractions extraites déterminés par RMN <sup>1</sup>H.

<b>Fraction</b>	<b>Xyl/4-<i>O</i>-MeGlcA</b>
Xylane commercial	9,8
Extrait Ia	5,9
Extrait Ib	nd
Extrait IIb	nd
Extrait IIIa	5,3
Extrait IIIb	6,2
Extrait IVb	5,9

nd : non déterminé.

## II.5. Conclusion

Les différentes analyses présentées permettent de présenter un modèle structural du xylane de châtaignier (figure 71), sur la base des compositions chimiques obtenues par analyse CPG et de l'analyse RMN des xylanes extraits des sciures de châtaignier.

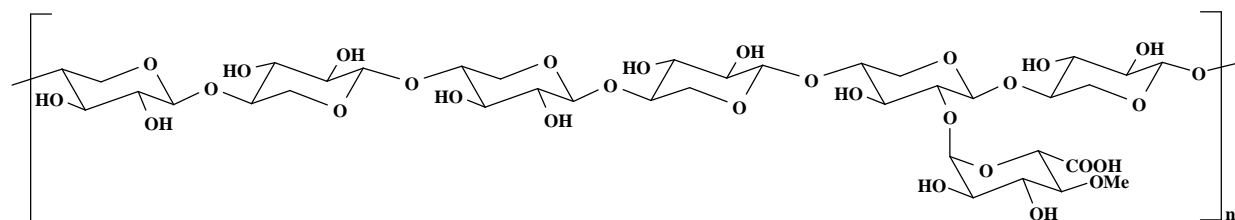


Figure 71 : Modèle structural du xylane de châtaignier.

Ils sont constitués d'une chaîne de xylopyranose liés en  $\beta(1\rightarrow4)$  et substitués en position 2 des unités xylose par des unités d'acide 4-O-méthylglucuronique. Ce dernier a été formellement identifié comme le seul acide présent dans les xylanes de châtaignier, ce qui est généralement le cas pour la plupart des xylanes isolés de végétaux, qui peuvent cependant être substitués pour certains par l'acide glucuronique, et plus rarement par les deux acides à la fois (Wilkie, 1979). Les xylanes de châtaignier sont des polysaccharides acides comme en témoigne leur fort taux de substitution par les fonctions carboxylates (une unité d'acide uronique pour 6 unités xylose), et sont de ce fait très solubles dans l'eau. Il est en effet connu qu'au-delà d'une proportion d'environ 15 unités xylose pour une unité d'acide, les glucuronoxylanes sont insolubles dans l'eau (Habibi, 2004).

Une question reste cependant en suspens concernant la structure de ces xylanes, à savoir le mode de répartition des acides uroniques le long de la chaîne principale de xylose. Sont-ils répartis de manière régulière ou distribués aléatoirement ? L'analyse des oligosaccharides obtenus après hydrolyse du xylane de hêtre peut constituer un élément de réponse. En effet l'autohydrolyse conduit notamment à des fragments de 12 xyloses comprenant une seule unité d'acide uronique, et aucune des techniques d'hydrolyse employée n'a mis en évidence la présence d'oligosaccharides comportant plus d'une unité d'acide uronique. Or ce xylane est caractérisé par un taux de substitution Xyl/4-O-MeGlcA de 9:1, les substituants sont donc répartis de manière irrégulière sur le polymère, ce qui est conforme aux structures décrites dans la littérature pour les xylanes de feuillus (Shimizu, 1991). Certaines

techniques ont été développées pour répondre à la question de la répartition des acides uroniques le long des chaînes de xylane. Kohn et *coll.* (1986) utilisent notamment une technique potentiométrique basée sur l'étude du coefficient d'activité des ions calcium, à partir d'une solution de sel de glucuronoxylane. Nous avons envisagé une autre méthode plus simple à appliquer en théorie, l'analyse MALDI du polysaccharide natif. Le spectre obtenu se présente sous la forme d'une courbe de Gauss, celle-ci étant liée à la polydispersité du polymère. Une analyse du spectre aurait du permettre d'identifier des pics répartis de manière homogène et d'avoir ainsi une information concernant le motif de répétition du polymère, le cas échéant. La faible résolution du spectre, dans notre cas, ne nous a pas permis d'obtenir ce résultat. Celle-ci peut être causée par la présence de groupements carboxylates (Garozzo, 2000), c'est pourquoi nous avons réalisé un deuxième essai sur le même polymère converti sous sa forme acide après passage sur résine acide. Nous ne voyons toujours pas apparaître d'unité de répétition. L'étude du polymère sous forme perméthylée ou peracétylée serait à envisager pour augmenter la sensibilité de la mesure (Garozzo, 2000). Toutefois ce résultat pourrait provenir d'une distribution complètement aléatoire des unités d'acide sur la chaîne de xylane. L'utilisation de l'analyse MALDI pourrait également permettre de répondre à une autre problématique : la détermination des masses molaires des xylanes extraits, les techniques classiquement utilisées restant très controversées (Vinkx et Delcour, 1996). Cette mesure nécessite cependant une faible polydispersité ( $< 1,1$ ) du polymère et doit donc être couplée à une séparation par exclusion stérique (Garozzo, 2000).

Nous avons montré que ces xylanes de châtaignier pouvaient être extraits facilement et abondamment des sciures de châtaignier par extraction à la potasse 4,3M après délignification. Le protocole mis en œuvre ne nécessite ni étape d'imprégnation, ni extractions successives par des concentrations croissantes de base. Il préserve l'intégrité du polymère, et ce malgré le traitement de délignification, cassant l'image des xylanes comme étant des polysaccharides fragiles. Ce protocole permet d'obtenir des xylanes purs et relativement homogènes en masse. Représentant jusqu'à 25% en masse du bois, les xylanes de châtaignier semblent être de bon candidats pour l'étude des voies de valorisation des co-produits de l'industrie forestière.



# Chapitre III

## Valorisation des xylanes





## **Chapitre III : Valorisation des xylanes**

### **III.1. Obtention de films plastiques par réaction d'acylation d'hémicelluloses**

Des travaux de notre laboratoire ont mis en évidence que la cellulose du bois peut être estérifiée en phase homogène en films plastiques hydrophobes partiellement biodégradables (Satgé, 2002). Néanmoins à notre connaissance, peu de données sont disponibles, concernant l'obtention de tels matériaux à partir des hémicelluloses en général et des xylanes en particulier. En nous appuyant sur les travaux effectués sur la cellulose, nous proposons la synthèse d'une gamme d'esters gras de xylanes aux caractéristiques physico-chimiques variées. Dans le but de proposer des applications industrielles pour les xylanes, une étude mettant en œuvre des outils d'analyse de données et la méthodologie des plans d'expériences a été développée afin d'optimiser la réaction de transformation des xylanes.

#### **III.1.1. Thermoplastiques obtenus par greffage de chaînes grasses sur la cellulose**

L'acétate de cellulose est préparé industriellement à partir de l'anhydride acétique par catalyse acide dans des conditions relativement douces. Si ce procédé est très utilisé pour l'obtention d'esters cellulosiques à courtes chaînes aliphatiques (C2-C4), la réactivité des anhydrides supérieurs reste très limitée.

Depuis une vingtaine d'années, plusieurs équipes ont abordé cette problématique et l'estérification de la cellulose par des acides gras a fait l'objet de nombreux travaux, notamment depuis la découverte par McCormick (1981) d'un système de solvants, constitué de N,N-diméthylacétamide (DMA) et de chlorure de lithium (LiCl), permettant l'obtention d'une solution homogène de cellulose. Le lithium permet, en complexant les groupements hydroxyle de la cellulose, de rompre les liaisons hydrogène qui renforcent sa structure et qui empêchent sa solvation (figure 72). L'estérification en solution de la cellulose a alors permis d'obtenir des esters, homogènes, de degrés de substitutions (DS) variés.

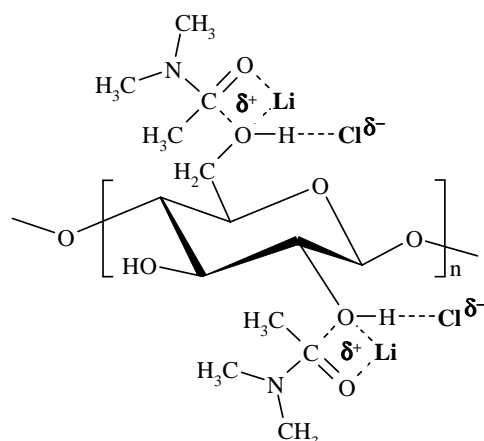


Figure 72 : Interactions entre la cellulose et le système de solvant DMA / LiCl (Tosh et *coll.*, 2000).

L'obtention d'esters à longues chaînes paraît délicate de premier abord, en raison de la difficulté de combiner des réactifs de polarités aussi différentes que la cellulose, le DMA / LiCl, très polaires et les acides gras ou anhydrides correspondants très peu polaires. Plusieurs méthodes ont cependant été décrites (figure 73, Edgar et *coll.*, 2001). L'estérification directe de la cellulose par les acides carboxyliques ne paraît pas aisée. Les acides carboxyliques présentent en effet une très faible réactivité envers les groupements hydroxyle de la cellulose et ceci d'autant plus qu'il s'agit d'acides gras. De tels composés peuvent cependant être employés en présence d'un co-réactif qui transforme *in situ* l'acide carboxylique en une entité plus réactive. Ceci est illustré par les travaux de Samaranayake et Glasser (1993) qui utilisent un acide carboxylique en présence de la N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) comme agent de condensation pour obtenir l'anhydride correspondant ; celui-ci réagira alors avec la 4-pyrrolidinopyridine pour former une espèce très réactive. Une méthode similaire utilise le chlorure de tosyle (TsCl) pour former un anhydride mixte, qui, en présence de pyridine, réagit avec la cellulose pour former des esters de DS proches de 3 (Sealey et *coll.*, 1996). L'acylation de la cellulose par les anhydrides d'acides carboxyliques est réalisée en présence d'un catalyseur basique, par exemple la pyridine (Tosh et *coll.*, 2000). Une autre technique consiste à former des anhydrides mixtes à partir des acides carboxyliques, ceux-ci étant plus réactifs que les anhydrides symétriques. Cette méthode décrite à l'origine par Morooka et *coll.* (1983) emploie l'anhydride trifluoroacétique comme co-réactif. De la même façon, Vaca-Garcia et *coll.* (1998) ont réalisé la synthèse d'esters mixtes de cellulose par

réaction de l'anhydride acétique sur un acide gras, en présence de quantités catalytiques d'acide perchlorique. Enfin les chlorures d'acides carboxyliques sont des agents d'acylation très efficaces, utilisés en présence d'une base telle que la pyridine (Wang et Tao, 1994 ; Gourson et coll., 1999) ou la triéthylamine (McCormick et Callais, 1987) dont le rôle est de neutraliser l'acide chlorhydrique formé lors de la réaction.

Plus récemment, Satgé et *coll.* (2002) ont présenté une méthode d'acylation de la cellulose microcristalline, par le chlorure d'acide laurique, en présence d'une base, la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), permettant l'obtention de films plastiques hydrophobes.

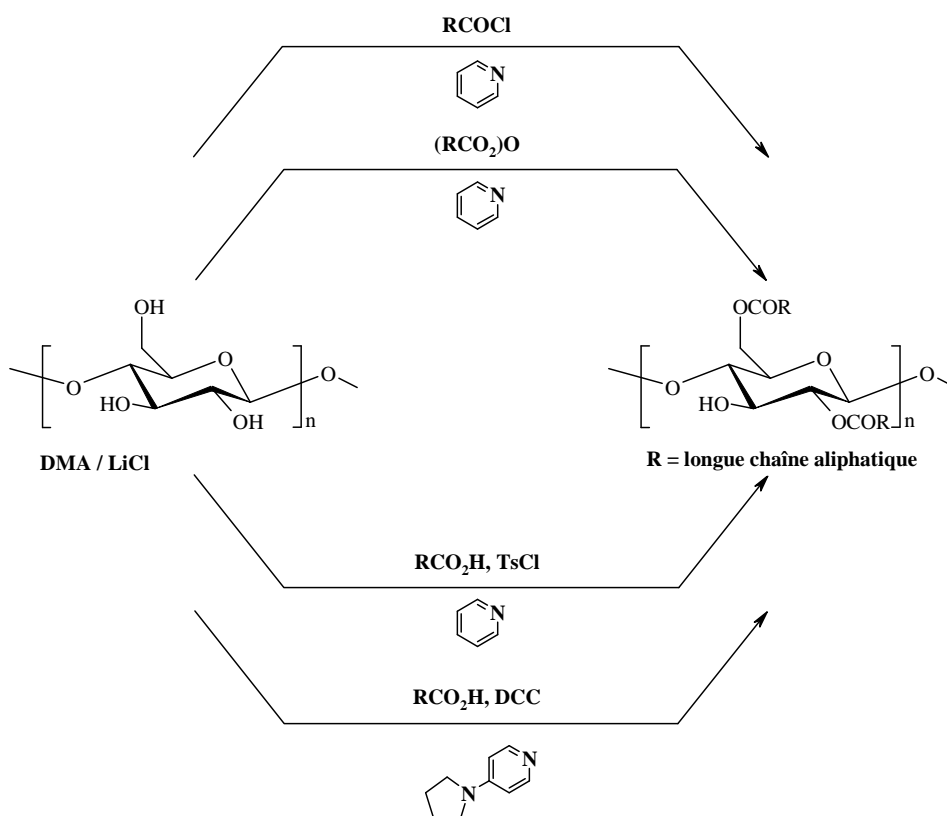


Figure 73 : Synthèses d'esters cellulosiques à chaînes grasses (Edgar et *coll.*, 2001).

Des travaux ont par ailleurs permis d'effectuer cette réaction sans addition de base ni de solvant à condition de soustraire l'acide formé sous forme gazeuse à l'aide d'un courant d'azote anhydre (Thiebaud et Borredon, 1995) ou du vide (Kwatra et *coll.*, 1992). Néanmoins les études cinétiques effectuées lors de ces essais ont montré qu'on ne pouvait atteindre des valeurs maximales de DS par utilisation de ces méthodes. De plus si la dégradation du polymère par l'acide chlorhydrique est ainsi réduite, elle ne peut être évitée. Finalement cette

méthode paraît relativement limitée. D'autres travaux décrivent des réactions d'acylation de la cellulose en phase hétérogène. Des estérifications de cellulose microcristalline par le chlorure d'acide laurique ont été réalisées par réaction sur support solide minéral, en présence de DMAP. Si les DS sont satisfaisants, les rendements restent très faibles, 30% au maximum (Gourson et *coll.*, 1999). Vaca-Garcia et *coll.* (1997) proposent une approche différente qui conduit à la formation d'esters mixtes de cellulose après acylation par les acides gras et l'anhydride acétique et en présence d'acide sulfurique. Toutefois le degré de substitution par les chaînes grasses ne dépasse pas 0,66 ; en outre l'obtention d'esters mixtes de DS total (chaînes grasses et acétate) supérieur à 2 nécessite la mise en œuvre de conditions expérimentales qui conduisent à une dépolymérisation sévère de la cellulose. Ces réactions en phase hétérogène, malgré leur grand intérêt dans la perspective d'une application industrielle, restent peu concluantes. La substitution par les chaînes grasses est souvent limitée et les rendements de réaction faibles. De telles méthodes conduisent à une dégradation parfois importante des polymères.

Une voie alternative pour la formation de matériaux thermoplastiques a été proposée plus récemment par Despré et *coll.* (2001). Elle utilise comme substrat un coproduit de l'industrie céréalière, le son de maïs qui présente la particularité d'être riche en hétéroxylane. La stratégie de synthèse repose ici sur une oxydation *periodique* suivie d'une amination réductrice des aldéhydes formés par la laurylamine en présence d'un agent réducteur, le cyanoborohydrure de sodium. L'intérêt incontestable d'une telle méthode réside dans le fait que l'ensemble des réactions se déroulent dans l'eau. Son inconvénient principal est d'utiliser un réducteur toxique, le  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ .

Cette dernière constatation justifie sans doute l'évolution des protocoles vers l'utilisation de solvants organiques peu toxiques qui soient capables de solubiliser, ou du moins de disperser les polysaccharides, comme le système DMA / LiCl. Pour ces raisons nous avons choisi, dans le cadre de ce travail, d'effectuer les réactions d'acylation des xylanes en phase homogène, d'autant plus que les xylanes sont des polysaccharides fragiles à l'hydrolyse acide. Les sites réactionnels sont alors plus accessibles, favorisant une substitution plus homogène. Ceci permet de mieux contrôler les valeurs des DS et favorise une répartition uniforme des chaînes greffées le long des chaînes de polymère.

### III.1.2. Réaction d'acylation des hémicelluloses – Essais préliminaires

La question à laquelle il nous faut répondre est de savoir si les hémicelluloses, et notamment les xylanes, peuvent être transformées, selon une méthode similaire à la cellulose, en films plastiques hydrophobes.

Nous avons donc cherché à fonctionnaliser les groupements hydroxyle des xylanes à l'aide d'un chlorure d'acide gras, le chlorure d'acide laurique, selon le schéma réactionnel suivant (figure 74).

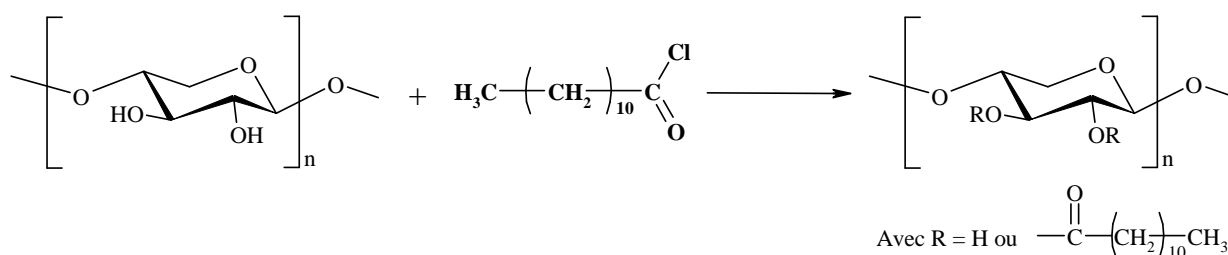


Figure 74 : Estérification d'un xylane par le chlorure d'acide laurique.

Les hémicelluloses sont au préalable solubilisées dans le système de solvant DMA / LiCl. La réaction a lieu en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP), base permettant de limiter l'hydrolyse du polymère par l'acide chlorhydrique formé au cours de la réaction d'estérification. Il permet aussi comme le montre la figure 75, d'activer la réaction par formation d'un complexe acylpyridinium, plus réactif que le chlorure d'acide (Sun et coll., 1999).

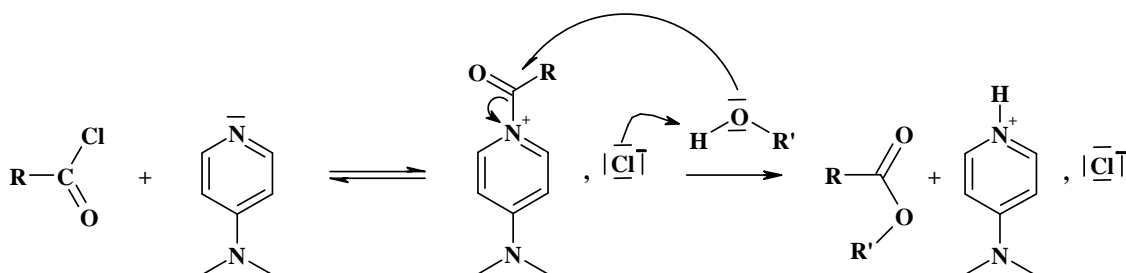


Figure 75 : Rôle du DMAP dans le mécanisme de la réaction d'estérification.



structure. Dans ce domaine, les conditions opératoires qui ont conduit à leur extraction influent sur leurs caractéristiques, et notamment la présence de substituants ou encore l'association avec certaines molécules telles que la lignine. La solubilisation est réalisée dans le DMA à chaud en présence de quantités variables de LiCl, par dissolution de 1 g d'hémicellulose dans 50 mL de solvant.

### ***III.1.2.b. Acylation des hémicelluloses – Purification des esters formés***

En nous appuyant sur les travaux effectués au laboratoire sur la cellulose, nous avons élaboré un protocole d'acylation des hémicelluloses en phase homogène, en présence d'un équivalent de DMAP et de deux équivalents de chlorure d'acide laurique par fonction hydroxyle. Après 15 minutes de réaction à 90°C sous agitation, l'ester est précipité par un volume d'eau et trois volumes d'éthanol. Les esters ainsi obtenus sont ensuite purifiés par la méthode de dissolution-précipitation (Gourson, 1999 ; Satgé, 2002) ; pour cela l'ester gras est dissous dans du chloroforme, puis précipité à nouveau par trois volumes d'éthanol.

### ***III.1.2.c. Caractérisation des esters hémicellulosiques***

#### ***i. Obtention des films plastiques – Aspect des films***

Les esters obtenus sont solubilisés dans le chloroforme et on obtient les films plastiques par coulage et évaporation du solvant (ou « casting ») à l'air libre et à température ambiante. Les films obtenus sont lisses et homogènes, d'aspect plastique (figure 77).



Figure 77 : Photographie d'un film de xylane estérifié par l'acide laurique.

### *ii. Analyse infrarouge*

Dans un premier temps l'analyse par spectroscopie infrarouge permet, grâce à l'apparition sur le spectre de signaux caractéristiques des esters, de confirmer l'acylation des xylanes (figure 78). La forte diminution de la bande large à 3330-3340  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique des vibrations de valence des liaisons OH des groupements hydroxyle, est corrélée à l'apparition d'une bande d'absorption caractéristique des fonctions ester à 1750  $\text{cm}^{-1}$  et des bandes alkyle vers 2900  $\text{cm}^{-1}$ .

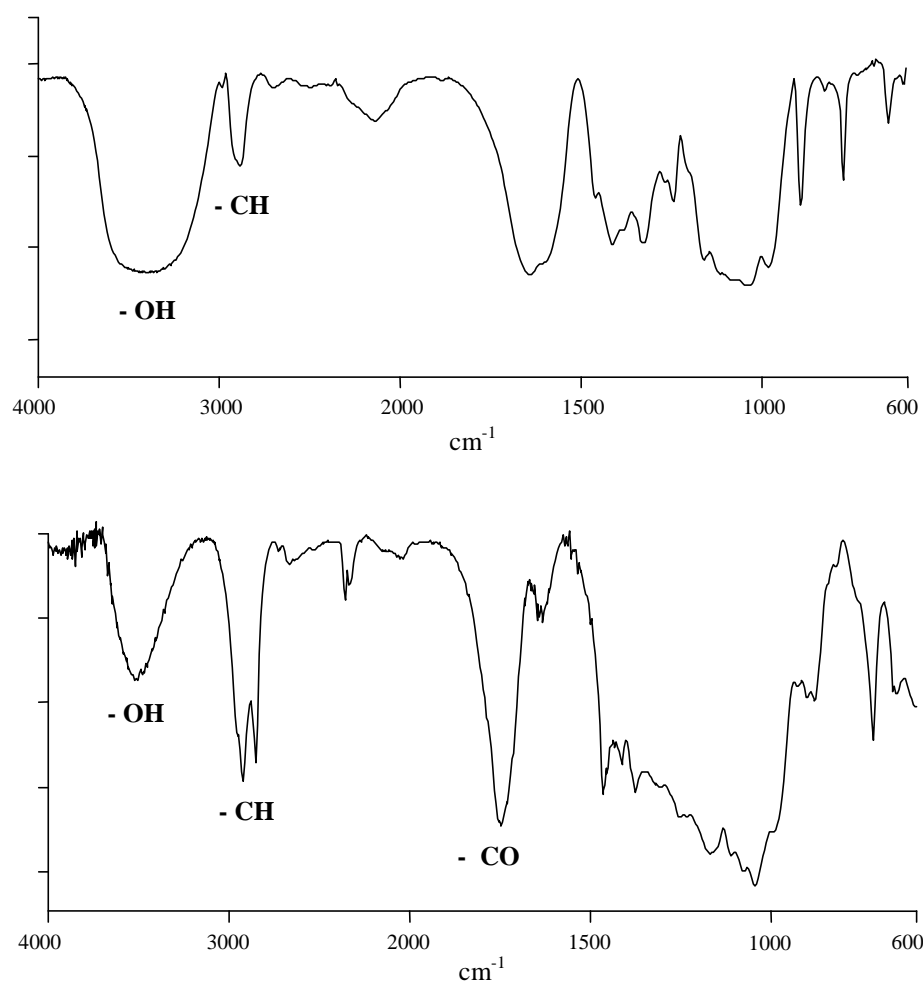


Figure 78 : Spectres IR d'un xylane natif et d'un xylane après acylation par l'acide laurique.

### *iii. Gain de poids et DS*

Pour rendre compte de l'efficacité de la réaction d'estérification, on définit généralement, après greffage des chaînes grasses sur le polysaccharide :



- le gain de poids (GP)

$$\text{GP (\%)} = \frac{\text{masse finale} - \text{masse initiale}}{\text{masse initiale}} \times 100$$

- le degré de substitution (DS), c'est à dire le nombre moyen de chaînes grasses greffées par unité anhydroxylose. Il est au maximum de 2 dans le cas des xylofanes.

Les DS de chacun des films plastiques ont été estimés par l'intermédiaire de deux méthodologies différentes : la RMN  $^1\text{H}$  et l'analyse élémentaire. L'utilisation de la RMN  $^1\text{H}$  est parfaitement adaptée au calcul des DS de polymères linéaires composés exclusivement d'hexoses (mannanes) ou de pentoses (xylofanes). Le spectre présenté figure 79 permet en effet de distinguer deux zones principales qui correspondent d'une part aux protons du cycle xylopyranose et qui résonnent entre 3 et 5 ppm, et, d'autre part, aux protons portés par les chaînes aliphatiques greffées qui résonnent entre 0,5 ppm et 2,5 ppm. Le rapport des intégrations de ces deux types de protons donne le DS (Samaranayake et *coll.*, 1993).

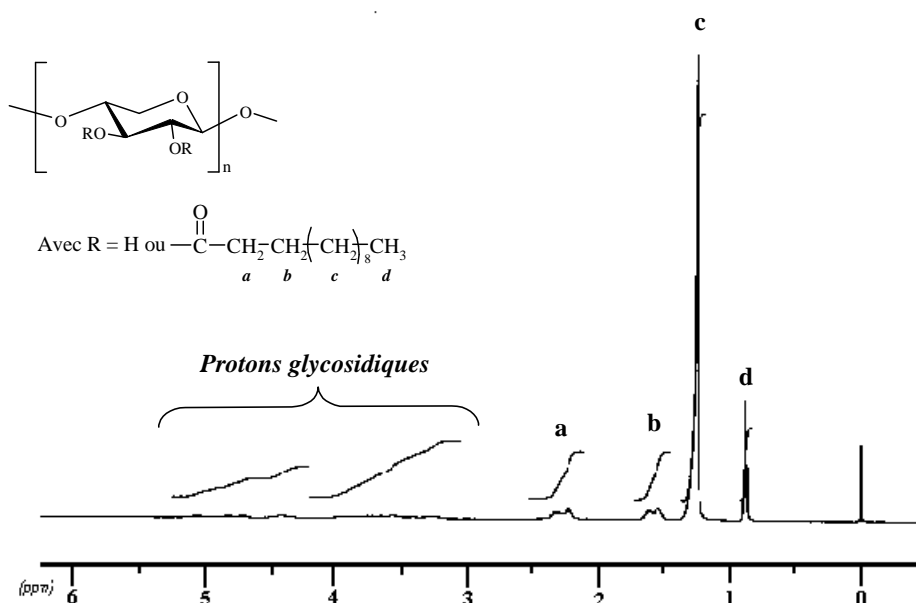


Figure 79 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du xylane estérifié mettant en évidence la présence des chaînes grasses.

Dans le cas des hétéropolymères ramifiés comme les hétéroxylofanes, la diversité des monosaccharides (hexoses, pentoses et d'acides uroniques) entrant dans la composition du polymère, ainsi que l'existence de nombreuses ramifications rendent difficile le calcul du

nombre théorique de fonctions hydroxyle libres et donc l'utilisation de la RMN  $^1\text{H}$ . Le calcul du degré de substitution peut néanmoins être effectué à partir du pourcentage de carbone déterminé par microanalyse (Fredon et *coll.*, 2001). L'expression du DS est donnée par l'équation suivante :

$$\text{DS} = \frac{61,8 - 136,5 \times \% \text{C}}{182,3 \times \% \text{C} - 144,1}$$

### III.1.2.d. Résultats

L'application du protocole précédemment décrit sur les trois hémicelluloses considérées a permis l'obtention de films plastiques hydrophobes. Les données recueillies montrent que le protocole d'acylation utilisé est adapté aux hémicelluloses sur lesquelles il a été testé puisque les DS (tableau 22) sont compris entre 1,2 (cas de l'hétéroxylane,  $\text{DS}_{\text{max}} = 2,1$ ) et 1,7 (cas du xylane,  $\text{DS}_{\text{max}} = 2$ ), correspondant respectivement à des taux de substitution de 57% et 85%.

Tableau 22 : Caractéristiques des hémicelluloses estérifiées.

Hémicellulose	[LiCl] (%)	GP (%)	RR (%)	DS / DS max taux de substitution
Xylane <i>du hêtre</i>	2	118	65	1,7 / 2,0 85%
Hétéroxylane <i>du son de maïs</i>	0	72	66	1,2 / 2,1 57%
Mannane <i>de Saccharomyces cerevisiae</i>	10	- 67	9	2,4 / 3,0 80%

Le gain de poids est variable, négatif (-67 %) dans le cas du mannane et très largement positif (72 et 118 %) si on considère le xylane et l'hétéroxylane (tableau 22). Il semble, à ce stade des expériences, que cette variabilité du rendement de la réaction soit directement liée à la différence de solubilité des hémicelluloses dans le DMA. L'acylation des hétéroxylanes qui sont totalement solubles dans le DMA conduit à un gain de poids satisfaisant (72%), de même que le xylane. A l'inverse, l'estérification des mannanes qui ne sont que partiellement solubles dans le même solvant, y compris en présence de LiCl, aboutit à une perte de poids de l'échantillon de départ. Dans ce dernier cas, la valeur de DS est néanmoins de 2,4. Cette

dernière observation indique que la fraction soluble de la solution DMA/mannane a correctement réagi, conduisant à la formation d'un film plastique de DS élevé. Dans le même temps, la fraction insoluble de cette solution subira peu ou pas l'estérification par le chlorure d'acide laurique, ce qui se répercute sur la valeur du gain de poids.

Ceci est illustré par la valeur du rendement de récupération, noté RR (%) dans le tableau 22. Il est défini comme étant le rapport de la masse de l'ester récupéré en fin de réaction par la masse du polysaccharide estérifié théoriquement récupérable, calculé en fonction du DS de l'ester formé :

$$RR (\%) = \frac{\text{masse finale exp.}}{\text{masse finale th.}} \times 100 = \frac{\% GP + 100}{\% GP_{th} + 100} \times 100 \quad \text{et} \quad GP_{th} (\%) = \frac{DS \times M_{RCO}}{M_{gly}} \times 100$$

où  $GP_{th}$  est le gain de poids théorique dépendant du nombre de chaînes greffées donc du DS,  $M_{RCO}$  est la masse molaire du groupement acyle greffé (=182,3 g.mol<sup>-1</sup> pour le chlorure d'acide laurique) et  $M_{gly}$  correspond à la masse molaire de l'unité anhydroglycosidique.

Bien que le xylane et l'hétéroxylane soient parfaitement solubilisés, le rendement de récupération n'est pas maximal ce qui signifie que nous ne récupérons pas l'ensemble du polysaccharide estérifié. Cette différence entre le gain de poids théorique et le gain de poids réel pourrait être lié à la dépolymérisation d'une fraction du polysaccharide estérifié (Vaca-Garcia, 1997). Le milieu acide et la température élevée favorisent l'hydrolyse du polymère, les xyloxygènes étant naturellement sensibles à l'hydrolyse acide ; ainsi une fraction de l'ester formé se retrouve en phase liquide sous forme d'oligomères estérifiés, de DP trop faibles pour être récupérés par précipitation éthanolique en fin de réaction.

Nos résultats indiquent que la nature chimique ainsi que la complexité structurale des hémicelluloses ne sont pas les facteurs limitants de la réaction d'acylation puisque des films plastiques peuvent être obtenus à partir de xylane, d'hétéroxylane ou de mannane. Les résultats observés dans le cas du mannane mettent en évidence que l'étape de dissolution des polysaccharides en milieu organique est l'étape clef de la transformation.

## **III.2. Optimisation de la réaction d'acylation des xylanes**

Le glucuronoxylane commercial extrait du hêtre a servi de modèle pour cette étude, puisque sa structure est caractéristique des xylanes des bois de feuillus que nous souhaitons valoriser au travers de cette étude.

### **III.2.1. Dissolution du xylane dans le système de solvant DMA / LiCl**

En raison d'une origine et de conditions d'extraction qui peuvent être variables, le xylane de hêtre pourra être plus ou moins soluble dans le système DMA / LiCl. Pour nous affranchir de ce problème, nous avons adapté une méthode de dissolution qui consiste à dissoudre préalablement le polymère dans l'eau, les xylanes étant naturellement solubles dans l'eau, et de l'échanger progressivement par le DMA en évaporant l'eau progressivement (Fang, 2002). L'ajout de 2% de LiCl permet enfin d'obtenir une solution homogène.

### **III.2.2. Définition du domaine expérimental**

Pour chercher à optimiser la réaction d'acylation, nous avons fait varier, dans un domaine expérimental défini, les principaux paramètres de la réaction afin d'apprécier l'influence de ces derniers sur le degré de substitution (DS) et le gain de poids (GP).

Les principaux paramètres retenus sont :

- la température de la réaction, que nous avons fait varier de 70 à 140°C,
- la durée de la réaction pour des temps compris entre 2 minutes et 3 heures,
- et la quantité de chlorure d'acide, de 0,5 à 8 équivalents\*.

Une partie des manipulations a été réalisée en présence d'un équivalent de DMAP, et l'autre partie sans DMAP. La concentration de la solution initiale de xylane reste fixée à 0,02 g/mL. Tous les essais ont été effectués à partir de 1g de xylane soit 50 mL de solution.

---

\* Le nombre d'équivalents sera toujours rapporté au nombre de groupements hydroxyle.

### III.2.3. Etude préliminaire

Dans cette première approche, nous avons modifié les conditions de la réaction en faisant varier un à un les paramètres choisis, les autres restants fixes. Les composés obtenus ont été caractérisés par leur gain de poids et leur DS.

#### III.2.3.a. Influence de la durée de la réaction

Nous avons pour ceci fait varier la durée de la réaction de 2 minutes à 3 heures, pour une température de réaction fixée à 130°C, une quantité de chlorure d'acide fixée à 2 équivalents et en présence d'un équivalent de DMAP.

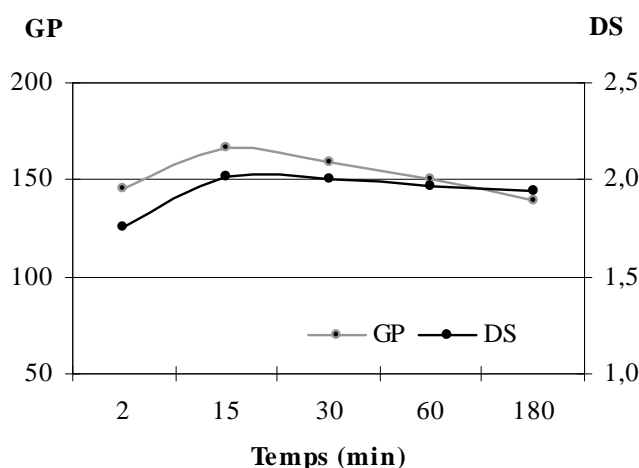


Figure 80 : Influence de la variation de la durée de réaction sur le gain de poids (GP) et le degré de substitution (DS).

Nous constatons d'après les courbes présentées figure 80 que la réaction d'acylation des xylandes, pour les conditions de température et de quantité de réactif fixées, est quasiment spontanée puisqu'un DS maximal de 2 est atteint très rapidement après seulement 15 minutes de réaction. Au-delà de 30 minutes de réaction, si le DS des films obtenus reste égal à 2, le gain de poids diminue légèrement, indiquant qu'une partie du xylane estérifié n'est pas récupéré. Comme nous l'avons précédemment suggéré, ceci est sans doute lié à une dépolymérisation de l'ester formé en milieu acide. Une telle hypothèse est confirmée par les travaux de Vaca-Garcia (1997) sur des esters de cellulose ; ces résultats indiquent bien une diminution du DP au fur et à mesure que la durée de la réaction augmente.

### III.2.3.b. Influence de la température de réaction

Les conditions expérimentales sont toujours identiques à celles fixées antérieurement, à savoir 2 équivalents de chlorure d'acide, 1 équivalent de DMAP, et un temps de réaction de 15 min. Seule la température du milieu réactionnel varie, de 70°C à 140°C, température maximale pouvant être atteinte car elle correspond à la température d'ébullition du milieu réactionnel.

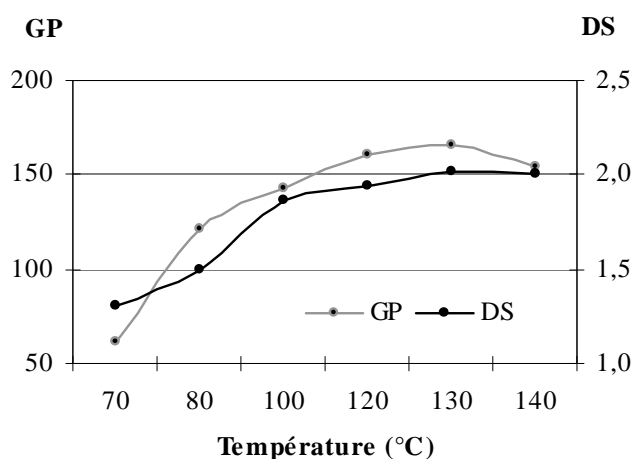


Figure 81 : Influence de la variation de la température de réaction sur le gain de poids (GP) et le degré de substitution (DS).

L'influence de ce paramètre sur l'avancement de la réaction d'acylation est bien visible sur la figure 81. Le DS et le gain de poids augmentent simultanément pour atteindre des valeurs maximales à 130°C (DS = 2 et GP = 166 %). Au-delà de cette valeur de température, une légère diminution du gain de poids s'amorce.

### III.2.3.c. Influence de la quantité de chlorure d'acide laurique

Les conditions expérimentales sont fixées comme suit : une température de 130°C, une durée de réaction de 15 min ; les quantités de chlorure d'acide varient de 0,5 à 8 équivalents. Deux séries d'essais ont été effectués, l'une en présence d'un équivalent de DMAP, l'autre se déroulant sans DMAP.

Les essais réalisés en présence de DMAP (figure 82a) montrent que 1,5 équivalent de chlorure d'acide sont suffisants pour atteindre la valeur maximale du DS ; pour cette même quantité, le gain de poids atteint lui aussi un palier à environ 170%.

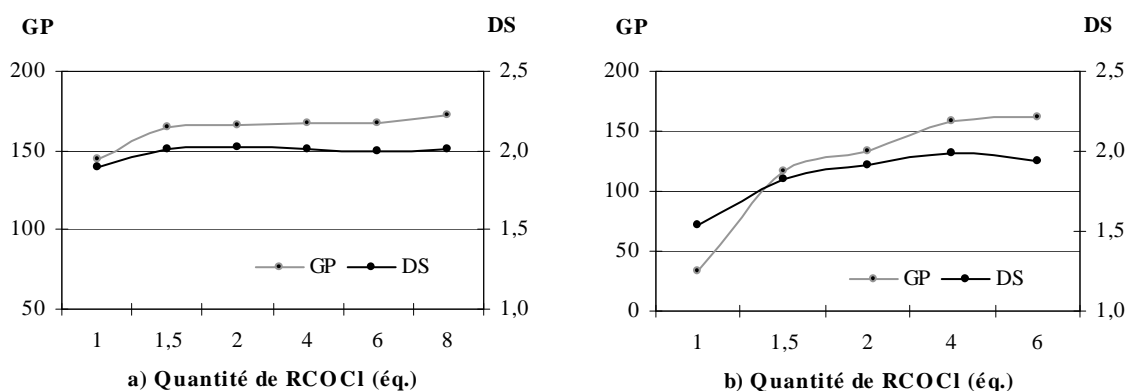


Figure 82 : Influence de la variation de la température de réaction sur le gain de poids (GP) et le degré de substitution (DS) ; a) en présence de DMAP, b) sans DMAP.

En absence de DMAP, des films plastiques sont également obtenus. Leur aspect est semblable à ceux recueillis précédemment, ce qui prouve que la présence de DMAP n'est pas indispensable pour l'acylation des xylanes par le chlorure d'acide laurique. Néanmoins, l'allure des courbes (figure 82b) est différente. Une valeur maximale de DS égale à 2 n'est obtenue qu'après utilisation de 4 équivalents de chlorure d'acide. Le gain de poids, s'il est lui aussi maximal et égal à 140% dans ces conditions, reste néanmoins inférieur à celui obtenu en présence de DMAP. La vitesse de la réaction est donc plus lente en absence de DMAP, ce qui confirme le rôle d'activant de ce dernier. De plus, le phénomène de dépolymérisation est accentué puisqu'il n'y a plus de base dans le milieu pour neutraliser l'acide chlorhydrique formé au cours de la réaction.

Notons que pour 0,5 équivalent de chlorure d'acide laurique, une petite quantité d'ester est recueillie mais ne peut être mise en forme par la méthode de casting, en raison d'un taux de substitution trop faible incompatible avec une solubilisation dans les solvants organiques usuels.

En conclusion, il apparaît nettement que l'augmentation du gain de poids et du DS est directement liée à une augmentation de la température de la réaction ou, en l'absence de DMAP, à une augmentation de la quantité de chlorure d'acide. En revanche, en présence de DMAP, la quantité de chlorure d'acide et la durée de la réaction n'ont que peu d'influence sur l'avancement de la réaction. Néanmoins l'interprétation de ces résultats doit être reliée au choix des domaines de variation des paramètres. De plus, le raisonnement que nous avons

adopté ne permet pas de montrer l'existence des corrélations entre les différents paramètres de la réaction. Celles-ci ne peuvent être mises en évidence qu'en considérant les données dans leur ensemble. En effet, si la quantité de chlorure d'acide, en présence de DMAP, n'a pas d'influence à 130°C et pour un temps de réaction de 15 min, qu'en est-il pour une autre température ou pour un temps de réaction différent ? De même l'influence de la température est-elle toujours aussi importante pour un temps de réaction prolongé ? La multiplication du nombre d'expériences permettrait sans doute de répondre à ces questions. Toutefois, à partir de l'ensemble des résultats obtenus pour tous les essais réalisés précédemment, l'utilisation d'une méthode d'analyse statistique des données doit permettre une meilleure synthèse des résultats.



### III.2.4. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Les méthodes d'analyse de données permettent une étude globale des individus et des variables en utilisant généralement des représentations graphiques.

Toutes les données obtenues lors des essais présentés précédemment sont regroupées dans le tableau suivant (tableau 23). Les *variables* correspondent aux intitulés des colonnes du tableau de données ; elles forment un espace géométrique dans lequel chaque essai, appelé *individu*, est représenté par un point.

Tableau 23 : Tableau de données.

<b>Essai</b>	<b>Qté RCOCl (<i>éq.</i>)</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Temps (<i>min</i>)</b>	<b>Qté DMAP (<i>éq.</i>)</b>	<b>DS</b>	<b>GP (%)</b>
1	1,0	130	15	1	1,90	144
2	1,5	130	15	1	2,01	165
3	2,0	130	15	1	2,02	166
4	4,0	130	15	1	2,01	167
5	6,0	130	15	1	2,00	167
6	8,0	130	15	1	2,01	172
7	2,0	130	2	1	1,76	145
8	2,0	130	30	1	2,00	159
9	2,0	130	60	1	1,97	151
10	2,0	130	180	1	1,94	139
11	1,0	130	15	0	1,54	34
12	1,5	130	15	0	1,83	117
13	2,0	130	15	0	1,91	134
14	4,0	130	15	0	1,99	159
15	6,0	130	15	0	1,94	162
16	2,0	70	15	1	1,30	61
17	2,0	80	15	1	1,50	121
18	2,0	100	15	1	1,86	143
19	2,0	120	15	1	1,94	161
20	2,0	140	15	1	2,01	154

L'analyse en composantes principales (ACP) a pour objet la description des données contenues dans un tableau individus-variables, dont les valeurs sont quantitatives. Elle permet de remplacer un tableau de données complexe, difficile à lire, par un tableau plus simple à lire qui soit une bonne approximation de celui-ci (Cibois,1983).

L'ACP peut être utilisée comme première étape d'investigation pour connaître les liaisons existantes entre les variables. Elle permet de restituer d'une part les distances entre individus, et d'autre part les corrélations entre variables.

Pour cela, on transforme les données pour les projeter dans un plan ou les classer en groupes homogènes, et tout ceci en restituant le maximum d'information.

Lorsqu'il n'y a que deux variables, il est facile de représenter, sur un graphique plan, l'ensemble des données. De même s'il y a 3 variables, une représentation dans l'espace permet de visualiser le nuage des individus. Mais dès que le nombre de variables est supérieur à 3, cela devient impossible. Dans le tableau de données qui nous intéresse, chaque essai représente un individu décrit par 6 variables : les 20 individus (ou essais) forment donc un nuage de points dans un espace à 6 dimensions !

L'ACP est une méthode de traitement de données permettant de réduire les dimensions d'un tableau de données par le biais d'une projection dans un sous-espace.

#### ***III.2.4.a. Principe***

Le tableau de données brutes comprend N lignes et p colonnes. Dans notre cas les lignes correspondent aux expériences et les colonnes aux différents paramètres (température, temps, quantité de chlorure d'acide, DS et GP). Chaque individu i est représenté par p valeurs mesurées :

$$(u_{i1}, u_{i2}, \dots, u_{ip})$$

Le tableau, constitué de N individus, peut être représenté sous forme matricielle :

$$(U) = \begin{bmatrix} u_{11} & \dots & u_{1j} & \dots & u_{1p} \\ u_{21} & \dots & u_{2j} & \dots & u_{2p} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ u_{i1} & \dots & u_{ij} & \dots & u_{ip} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ u_{N1} & \dots & u_{Nj} & \dots & u_{Np} \end{bmatrix}$$

Dans un espace de dimensions  $p$ , on place les points  $u_i = (u_{i1}, u_{i2}, \dots, u_{ip})$ . On obtient ainsi une représentation graphique des données : le nuage de points.

Le principe de l'ACP est de déterminer  $q$  vecteurs ( $q < p$ ) tels que la somme des distances euclidiennes des points du nuage au sous-espace engendré par ces  $q$  vecteurs soit minimale. On montre alors que la projection du nuage de points dans ce sous-espace est la meilleure approximation du nuage en dimension  $q$ . C'est donc une méthode de réduction du nombre de variables permettant des représentations géométriques des individus et des variables. C'est une méthode factorielle car la réduction du nombre de variables ne se fait pas par une simple sélection de certaines d'entre elles, mais par la construction de nouvelles variables synthétiques, notées  $CP_k$  et appelées composantes principales, obtenues par combinaisons linéaires des variables initiales (Bouroche et Saporta, 1994).

### ***III.2.4.b. Méthode***

Les principales étapes de la méthode sont décrites dans la partie expérimentale. Ainsi on détermine la matrice des corrélations, les valeurs propres et vecteurs propres qui lui sont associés, puis on calcule les composantes principales.

#### ***i. Matrice des corrélations***

Dans le cas présent, les coefficients de corrélation ( $r$ ) sont regroupés dans le tableau suivant (tableau 24). Il est généralement admis que le coefficient de corrélation entre deux variables est significatif s'il vérifie la relation :

$$|r| \geq \frac{2}{\sqrt{N}}$$

Tableau 24 : Coefficients de corrélations.

	Qté RCOCl	Température	Temps	Qté DMAP	DS	GP
Qté RCOCl	1,00					
Température	0,162	1,00				
Temps	-0,117	0,114	1,00			
Qté DMAP	-0,047	-0,229	0,165	1,00		
DS	0,333	<b>0,785</b>	0,132	0,089	1,00	
GP	<b>0,443</b>	<b>0,463</b>	0,013	0,330	<b>0,864</b>	1,00

L'analyse de la matrice de corrélation montre que le DS et le gain de poids GP sont des variables très fortement corrélées entre elles. A priori ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où une forte substitution entraîne nécessairement un gain de poids élevé. Pourtant le coefficient de corrélation observé (0,864 inférieur à 1, tableau 24) ne traduit pas une relation linéaire entre ces deux variables. Ceci, comme nous l'avons indiqué précédemment, est à relier à un phénomène de dépolymérisation. Le coefficient de corrélation positif observé entre le gain de poids et la quantité de DMAP semble confirmer cette hypothèse. Le tableau indique par ailleurs que le gain de poids et le DS sont corrélés positivement à la température, et ce quel que soit le temps de réaction, qui n'a aucune influence significative sur ces valeurs.

### *ii. Projection des variables*

Les axes associés aux composantes principales, pris deux à deux, constituent la base des plans factoriels utilisés pour les projections du nuage des individus et du nuage des variables.

Chaque variable est représentée par un vecteur dont l'origine est confondue avec l'origine des axes et dont l'extrémité est donnée par ses corrélations avec CP<sub>1</sub> et CP<sub>2</sub> ; les variables initiales s'inscrivent alors dans un cercle de rayon 1 appelé cercle des corrélations (figure 83). L'examen de cette figure permet d'interpréter les corrélations entre les variables entre elles et les corrélations entre les variables et les axes de projection. En effet la proximité entre l'extrémité des vecteurs et le cercle des corrélations traduit une projection satisfaisante et donc interprétable, dans le plan factoriel considéré. On visualise ainsi les conclusions apportées par l'analyse de la matrice des corrélations.

Ci-dessous sont présentées les projections des variables dans les plans factoriels (1,2) et (1,3).

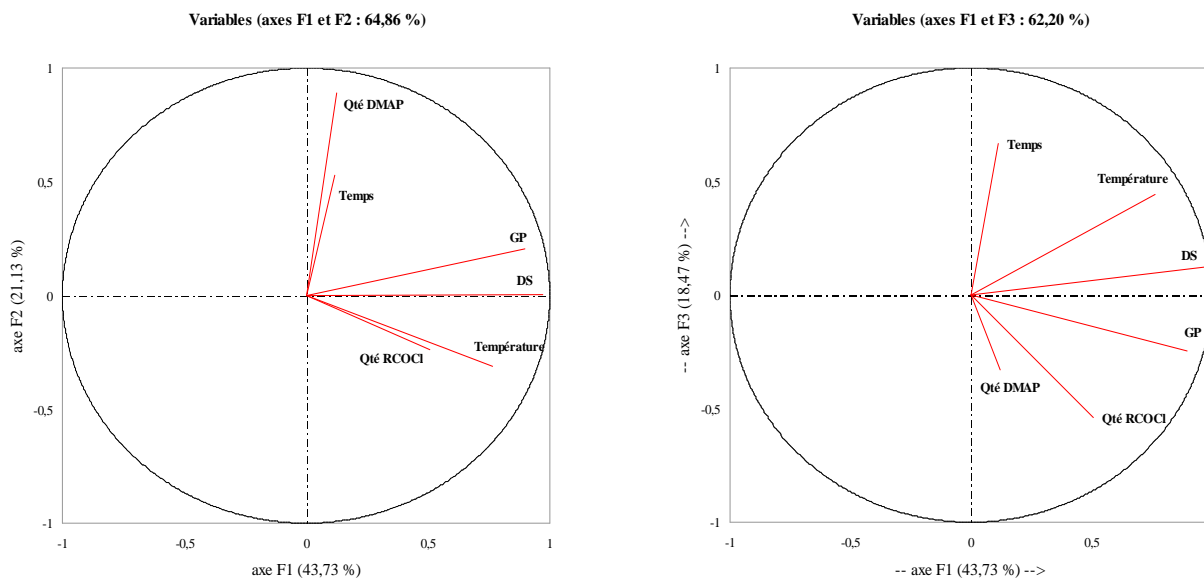


Figure 83 : Projection des variables dans les plans factoriels (1,2) et (1,3).

Ces représentations graphiques permettent de donner une signification concrète aux composantes principales. La première composante principale est très corrélée positivement au DS, au gain de poids et dans une moindre mesure à la température. La deuxième composante principale, dont l'importance est deux fois moindre, traduit essentiellement l'influence du DMAP.

Dans ces deux plans, qui représentent chacun plus de 60% de l'information contenue dans le tableau de données, on visualise les relations explicitées précédemment. Toutefois, on remarque tout de suite que le temps et la quantité de chlorure d'acide sont mal projetés (la norme des vecteurs associés est nettement inférieure à 1). Il paraît alors difficile de conclure quant à l'influence de ces paramètres sur la réaction. Ceci peut être très certainement la conséquence d'une exploration partielle du domaine expérimental.

La projection des variables dans le plan factoriel (2,3), qui ne représente que 40% de l'information, est présentée figure 84. On constate que les variables sont moins bien projetées dans ce plan, notamment le DS et le gain de poids. Cette représentation ne peut donc apporter d'informations supplémentaires.

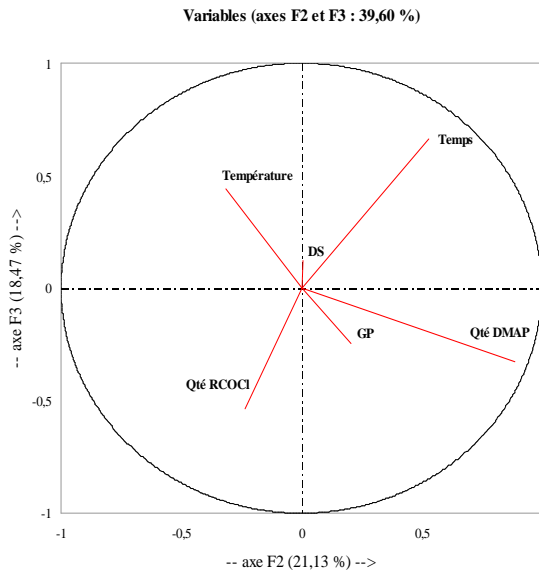


Figure 84 : Projection des variables dans le plan factoriel (2,3).

De même, la projection des individus dans les plans factoriels (1,2) et (1,3) (figure 85) ne permet pas, dans notre cas, d'apporter des informations supplémentaires.

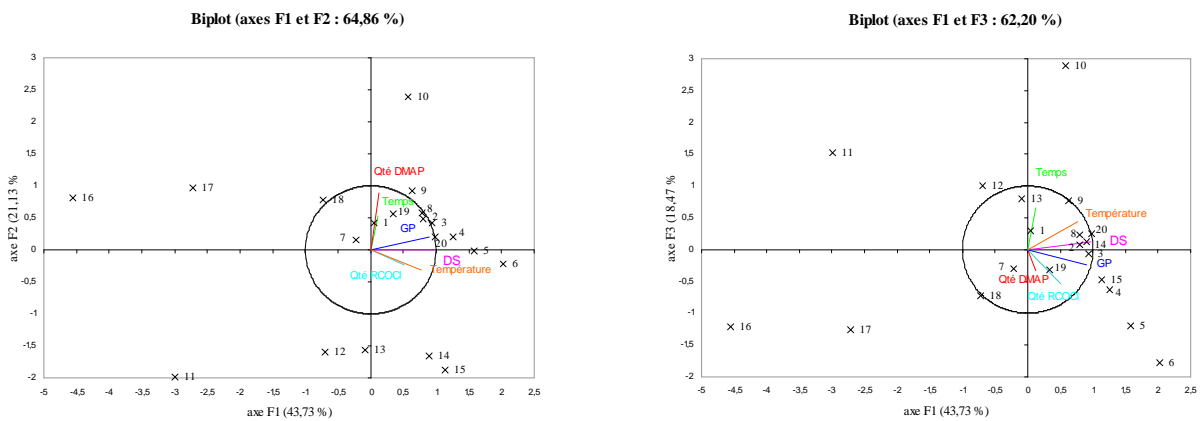


Figure 85 : Projection des individus dans le plan factoriel (1,2) et (1,3).

Compte-tenu de la signification des composantes principales 1 et 2, plus un point se situe à droite sur ce graphique, plus il s'écarte de la moyenne par de fortes valeurs des variables GP, DS et température ; aux points situés à gauche du graphique correspondent les phénomènes inverses.

Si quelques individus apparaissent isolés, la plupart ne présente pas suffisamment d'écart à l'indépendance et restent groupés au centre du graphique. Le choix des domaines de variations des paramètres semble inapproprié à l'étude fine de leur impact sur l'efficacité de la réaction.

L'ensemble de ces résultats obtenus par une première approche de la réaction ne nous a pas permis d'expliquer l'influence des paramètres sur les propriétés des plastiques obtenus, et ceci malgré l'apport d'un outil statistique.

L'utilisation d'un outil statistique d'analyse de données, l'ACP, a permis de mettre en évidence que les essais réalisés ne sont pas suffisants pour explorer l'ensemble du domaine expérimental choisi. De plus les intervalles de variation retenus pour chaque paramètre ne sont pas adaptés à une modélisation de la réaction.

L'établissement des relations entre le DS, le gain de poids et les différents paramètres de la réaction, nécessite donc la réalisation de nouvelles expériences mieux réparties dans un domaine expérimental plus approprié. Pour cela, la mise en place d'un plan d'expériences en rationalisant le choix des essais de façon à en minimiser le nombre, nous est apparue comme une stratégie intéressante.

### **III.2.5. Plan en carré gréco-latin**

Appliquée depuis déjà plusieurs dizaines d'années, dans des domaines aussi variés que l'agronomie, la mécanique, la chimie avec les problèmes de formulation des bétons par exemple, la méthodologie des plans d'expériences devient maintenant un facteur de progrès et d'innovation. Parmi les nombreuses approches proposées, le plan en carré gréco-latin présenté pour la première fois en 1924 par le mathématicien Sir Ronald Aylmer Fisher, apparaît relativement simple dans sa mise en œuvre.

#### ***III.2.5.a. Principe***

L'objectif est de quantifier la contribution de chacun des facteurs sur les caractéristiques des plastiques obtenus, c'est à dire le DS et le gain de poids. La réalisation d'essais correspondant à des réglages particuliers doit nous permettre d'établir, de la meilleure façon possible, un modèle empirique reliant les variables associées à la réponse (DS et GP) aux paramètres de la réaction.

#### ***III.2.5.b. Nouvelle définition du domaine expérimental***

Nous avons choisi de diviser le domaine expérimental en deux sous-ensembles. L'un correspond aux essais réalisés en présence d'un équivalent de DMAP et l'autre aux essais effectués sans DMAP. Les facteurs retenus sont alors : la température de la réaction (notée A), la durée de la réaction (B) ainsi que la quantité de chlorure d'acide (C). Suite aux résultats précédents, les domaines de variations de ces facteurs ont été modifiés. Ainsi nous avons réduit l'intervalle de temps entre 5 et 30 minutes et les quantités de chlorure d'acide varient désormais entre 1 et 2 équivalents.

Pour chacun des facteurs, nous avons sélectionné plusieurs états distincts ou modalités présentés dans le tableau 25. L'ensemble des combinaisons réalisables des facteurs et de leur modalités définit le domaine expérimental, soit un nombre total de combinaisons pour chaque sous-ensemble :

$$N_{\text{total}} = 3^3 = 27 \text{ combinaisons } \textit{ou} \text{ } 54 \text{ combinaisons pour l'ensemble du domaine.}$$



Tableau 25 : Définition des facteurs et des modalités.

<b>Modalités</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Température</b>	90 °C	110 °C	130 °C
<b>Temps</b>	5 min	15 min	30 min
<b>Qté RCOCl</b>	1 éq.	1,5 éq.	2 éq.

La construction du plan d'expériences consiste à extraire, de façon la plus équitable et la plus objective, un sous-ensemble de combinaisons particulières définissant les essais à réaliser. Le nombre minimal d'essais à réaliser est déterminé par le choix d'une forme particulière de modélisation.

Dans notre cas, nous adopterons un modèle additif sans couplage dont la forme générale s'écrit :

$$Y = c^{te} + \sum_{i=1}^k W_i$$

$W_i$  représentant le poids du facteur  $i$  et  $k$  le nombre de facteurs.

L'écriture de la forme générale du modèle ne permet pas de déterminer le nombre  $p$  d'inconnues qui lui est associé. On peut montrer qu'il est donné par la relation :

$$p = 1 + \sum_{i=1}^k (m_i - 1) \text{ soit } p = 7 \text{ inconnues}$$

$m_i$  correspondant au nombre de modalités du facteur  $i$ .

### ***III.2.5.c. Construction du plan d'expériences***

Le nombre minimal  $N$  d'expériences à réaliser doit être nécessairement supérieur ou égal au nombre  $p$  d'inconnues du modèle :

$$p \leq N \leq N_{total}$$

La construction du carré latin, que nous ne détaillerons pas dans cette étude, permet d'isoler neuf combinaisons particulières entre les modalités des facteurs, qui sont présentées dans le tableau 26.

Tableau 26 : Matrice d'expériences et plan d'expérimentation.

	A	B	C	→		Température (°C)	Temps (min)	Qté RCOCl (ég.)
21	A1	B1	C1	→	21	90	5	1
22	A1	B2	C2	→	22	90	15	1,5
23	A1	B3	C3	→	23	90	30	2
24	A2	B1	C2	→	24	110	5	1,5
25	A2	B2	C3	→	25	110	15	2
26	A2	B3	C1	→	26	110	30	1
27	A3	B1	C3	→	27	130	5	2
28	A3	B2	C1	→	28	130	15	1
29	A3	B3	C2	→	29	130	30	1,5

Cet arrangement particulier est appelé arrangement orthogonal. Il consiste à faire intervenir chacun des facteurs un même nombre de fois suivant l'ensemble de ses modalités. Aucune modalité particulière n'est privilégiée : les effets moyens des facteurs sont donc estimés avec la même incertitude, et cette incertitude est minimale. Il est alors possible de matérialiser ces différentes combinaisons sur une représentation graphique simple du domaine expérimental, comme le montre la figure 86.

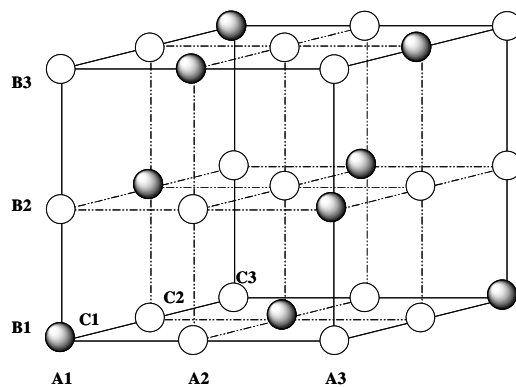


Figure 86 : Disposition des essais définis à partir d'un carré latin dans le domaine expérimental.

On construit alors un cube dont chacun des axes correspond à un des trois facteurs. Il est donc possible d'obtenir une représentation des 27 combinaisons réalisables à partir de trois facteurs à 3 modalités, dans laquelle les combinaisons repérées en noir représentent les essais

définis par le plan d'expériences. Comme on peut le constater, ces essais sont répartis uniformément dans le domaine expérimental.

Pour nous en persuader, visualisons de la même façon la stratégie qui consiste à ne faire varier qu'un seul facteur à la fois et que nous avons appliquée dans notre étude préliminaire (figure 87).

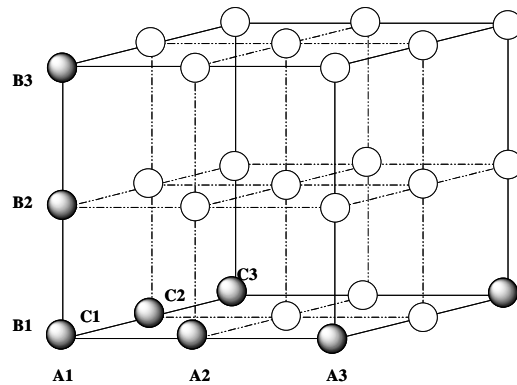


Figure 87 : Illustration de la stratégie consistant à ne faire varier qu'une variable à la fois.

Il apparaît alors clairement que la distribution des essais retenus, dans ce cas, ne permet pas de couvrir l'ensemble du domaine expérimental, à l'inverse du plan en carré latin.

#### ***III.2.5.d. Analyse des résultats***

Les valeurs des réponses DS et GP pour chaque combinaison sont regroupées dans les tableaux 27 et 28, qui correspondent aux essais réalisés respectivement en présence d'un équivalent de DMAP et en l'absence de DMAP.

Tout d'abord, l'analyse globale des résultats confirme que les modifications des modalités des facteurs ont un effet non négligeable sur la variation des réponses mesurées.

Tableau 27 : Résultats d'essais, réalisés en présence d'un équivalent de DMAP.

Essai	Température (°C)	Temps (min)	Qté RCOCl (éq.)	DS	GP
21	90	5	1,0	1,31	50
22	90	15	1,5	1,89	125
23	90	30	2,0	1,81	119
24	110	5	1,5	1,44	70
25	110	15	2,0	1,87	155
26	110	30	1,0	1,80	128
27	130	5	2,0	1,80	135
28	130	15	1,0	1,67	122
29	130	30	1,5	1,94	158

Tableau 28 : Résultats d'essais, réalisés sans DMAP.

Essai	Température (°C)	Temps (min)	Qté RCOCl (éq.)	DS	GP
30	90	5	1,0	1,29	0
31	90	15	1,5	1,55	86
32	90	30	2,0	1,57	63
33	110	5	1,5	1,44	82
34	110	15	2,0	1,85	157
35	110	30	1,0	1,63	114
36	130	5	2,0	1,84	167
37	130	15	1,0	1,71	131
38	130	30	1,5	1,84	153

La dispersion expérimentale a été déterminée au centre du domaine expérimental par trois essais identiques (tableau 29), ce qui permet d'estimer l'incertitude sur le DS et sur le gain de poids :  $EE_{DS} = \pm 0,01$  et  $EE_{GP} = \pm 2$ .

Tableau 29 : Détermination des erreurs expérimentales sur les valeurs de DS et GP,

Essai	RCOCl (éq.)	Temp. (°C)	Temps (min)	DMAP (éq.)	DS	GP (%)
a	1,5	110	10	1	1,63	132
b	1,5	110	10	1	1,64	132
c	1,5	110	10	1	1,62	128

*i. Construction d'une grille de dépouillement*

Les résultats d'essais sont ensuite analysés à l'aide d'une grille de dépouillement, outil pragmatique dans le cas d'un arrangement orthogonal comme c'est le cas dans cette étude. Elle permet une analyse rapide des résultats et ne nécessite pas l'utilisation d'outil informatique spécifique (Lochner et Matar, 1990).

Détaillons la construction de la grille de dépouillement des résultats obtenus pour le DS, dans la première série d'essais (en présence de DMAP). Pour chacune des lignes du tableau 30, on complète les cellules correspondant aux combinaisons particulières des modalités des facteurs retenues dans le plan d'expériences, par les valeurs de la réponse à analyser, en l'occurrence la valeur du DS. La zone de calcul, en bas du tableau, permet d'établir la moyenne arithmétique caractérisant chacune des modalités, pour chaque facteur.

Tableau 30 : Utilisation de la grille de dépouillement pour le DS.

		Température (°C)			Temps (min)			Qté RCOCl (ég.)		
Essai	DS	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
21	1,31	1,31			1,31			1,31		
22	1,89	1,89				1,89			1,89	
23	1,81	1,81					1,81			1,81
24	1,44		1,44		1,44				1,44	
25	1,87		1,87			1,87				1,87
26	1,80		1,80				1,80	1,80		
27	1,80			1,80	1,80					1,80
28	1,67			1,67		1,67		1,67		
29	1,94			1,94			1,94		1,94	
Total	15,93	5,54	4,97	5,42	4,94	5,43	5,56	5,31	5,14	5,48
Nombre	9	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>Moyenne</b>	<b>1,77</b>	<b>1,85</b>	<b>1,66</b>	<b>1,81</b>	<b>1,65</b>	<b>1,81</b>	<b>1,85</b>	<b>1,77</b>	<b>1,71</b>	<b>1,83</b>

Les grilles de dépouillement pour l'analyse du DS de la deuxième série d'essais (sans DMAP), ainsi que les grilles associées à l'analyse du gain de poids sont construites de la même façon.

## ii. Analyse graphique des résultats

La dernière ligne de la grille de dépouillement est utilisée pour la construction du tracé des effets moyens des facteurs, qui constitue l'analyse graphique des résultats. Les figures 88 et 89 présentent les tracés des effets moyens respectivement pour le DS moyen et le GP moyen ; pour chaque modalité, on reporte la valeur de la réponse moyenne calculée, indiquée dans la dernière ligne de la grille de dépouillement.

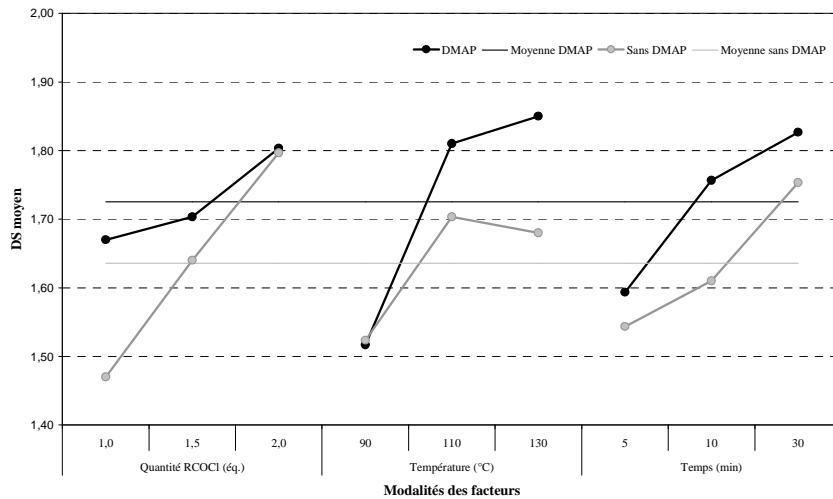


Figure 88 : Tracé des effets moyens des facteurs pour le DS moyen.

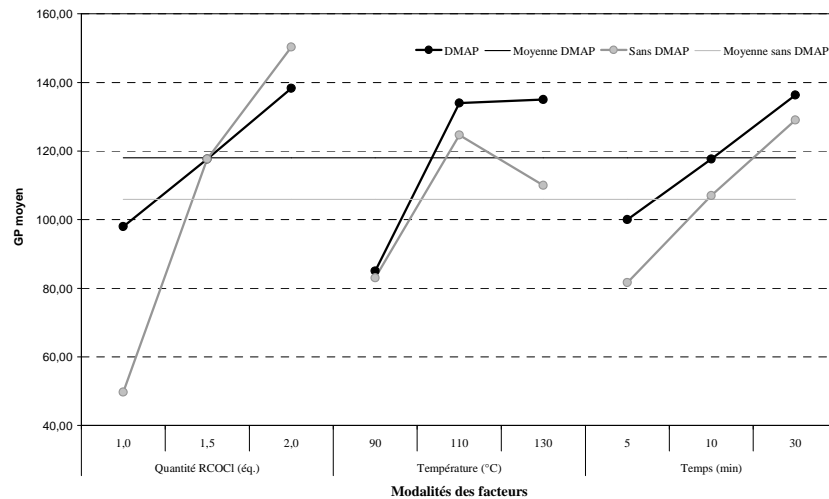


Figure 89 : Tracé des effets moyens des facteurs pour le GP moyen.

Une première analyse de ces figures montre que les trois facteurs de la réaction ont, dans le nouveau domaine choisi, une influence significative sur le DS et le GP. De plus, ces tracés révèlent l'importance de chacun des facteurs lorsqu'on passe de la modalité 1 à la modalité 3, c'est à dire sur l'ensemble du domaine choisi.

Il est ainsi possible de mettre en évidence par exemple, qu'une augmentation du temps de réaction se traduit par des valeurs élevées du DS et du GP moyens, phénomène que nous n'avions pas identifié dans la première partie de cette étude. Il en est de même pour la quantité de chlorure d'acide.

Cette analyse permet également de dégager les facteurs les plus influents, qui sont la température en présence de DMAP, et la quantité de chlorure d'acide en l'absence de DMAP. En effet leur variation, dans le domaine expérimental tel qu'il est défini, entraînent les plus grandes amplitudes de réponses.

### *iii. Validation du modèle*

Dans une dernière étape, les hypothèses formulées quant au choix du modèle doivent être validées. Il est alors nécessaire de définir de nouveaux essais afin de confronter les résultats expérimentaux aux informations obtenues par le modèle mathématique.

A la lecture des tracés des effets moyens (figure 88 et 89), les combinaisons de modalités qui permettent d'obtenir des valeurs maximales ou minimales pour chacune des réponses (DS et GP) peuvent être repérées. Il est à noter que le DS et le gain de poids présentant la même évolution, les combinaisons de modalités qui mènent théoriquement à une valeur maximale du DS, conduisent également à une valeur maximale du GP. De même les valeurs minimales des réponses doivent être obtenues pour un même essai. La validité du modèle est clairement démontrée par les essais particuliers 21 et 39 dans le cas des expériences menées avec un équivalent de DMAP (tableau 31) et par l'essai 30 dans la série des essais sans DMAP (tableau 32). Toutefois dans ce dernier cas, il est à noter qu'il conviendrait d'effectuer un test supplémentaire pour les modalités correspondant aux valeurs de DS et GP maximales afin de valider la forme additive du modèle.

Tableau 31 : Traitements de validation pour la première série d'essais (DMAP).

Essai	Température (°C)	Temps (min)	Qté RCOCl (ég.)		DS	GP
21	90	5	1	→	1,31	50
39	130	30	2	→	1,95	160

Tableau 32 : Traitements de validation pour la seconde série d'essais (sans DMAP).

Essai	Température (°C)	Temps (min)	Qté RCOC1 (ég.)		DS	GP
30	90	5	1	→	1,29	0
-	110	30	2	→	-	-

### III.2.6. Modélisation – Etude des surfaces de réponse

Dans un premier temps, nous avons mis en place un plan d'expériences en carré latin destiné à identifier les facteurs les plus influents et à localiser une zone d'intérêt. Nous souhaitons maintenant, à l'aide de ce plan d'expériences, modéliser les variations des réponses GP et DS, et étudier les surfaces de réponse construites à partir de ce modèle.

L'objectif de cette étude n'est pas de déterminer les conditions optimales permettant d'atteindre des valeurs maximales de DS et GP. Le DS et le gain de poids seront désormais considérées comme des variables de réponse, et leurs variations en fonction des paramètres de la réaction seront modélisées. Les courbes d'isoréponse devraient permettre d'établir des combinaisons des différents paramètres de la réaction pour répondre, de manière optimale, aux exigences d'un cahier des charges en terme de DS et GP, pour envisager des applications diverses de ces plastiques. Il s'agit en quelque sorte d'être en mesure de prédire les conditions expérimentales qui conduiront à la synthèse d'un plastique de qualité déterminée.

#### III.2.6.a. Méthodologie

L'étude des surfaces de réponse est associée à l'utilisation d'un modèle empirique, dont la forme générale est un polynôme de degré 2, généralement bien adapté aux problèmes d'optimisation :

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i x_i + \sum_{i=1}^k a_{ii} x_i^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=j+1}^k a_{ij} x_i x_j \quad \text{où } x_i \text{ représente le facteur } x \text{ à la modalité } i.$$

Dans notre cas, le modèle polynomial s'écrit :

$$\begin{aligned} Y = & a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 \\ & + a_{11} x_1^2 + a_{22} x_2^2 + a_{33} x_3^2 \\ & + a_{12} x_1 x_2 + a_{13} x_1 x_3 + a_{23} x_2 x_3 \end{aligned}$$



La construction d'un plan d'expériences consiste encore une fois à extraire un nombre minimum  $N$  de traitements expérimentaux du domaine expérimental, pour estimer de manière efficace les 10 coefficients  $a_i$  du modèle, avec comme condition  $N \geq 10$ . L'estimation des coefficients du modèle fait appel à la méthode des moindres carrés (Dodge, 1999).

Le nombre de coefficients du modèle augmente rapidement en fonction du nombre de facteurs, mais aussi en fonction du degré choisi pour le polynôme. C'est pourquoi on se limite généralement à une forme polynomiale de degré 2 pour les contraintes économiques de l'étude. De plus, la contribution des monômes de degré élevé est généralement faible dans l'explication de la variation de la réponse.

Si de nombreuses approches ont été proposées pour la construction des plans pour l'étude des surfaces de réponse, il nous a paru intéressant et moins coûteux en manipulations de nous appuyer sur les premiers résultats obtenus à l'aide du plan en carré latin. Une première analyse des résultats effectuée à l'aide d'un logiciel de régression (NemrodW) a suggéré, pour obtenir un modèle, des essais supplémentaires correspondant à des points précis du domaine expérimental.

Les tableaux 33 et 34 rassemblent les coordonnées des traitements expérimentaux nécessaires à la mise en place d'une loi de régression entre les paramètres de la réaction et les réponses observées. Il est nécessaire, avant tout, de définir une relation de codage pour l'analyse des résultats, afin de prendre en compte des facteurs représentant des grandeurs différentes, exprimées dans des unités différentes. On définit alors des variables  $X$ , sans dimension, dont les valeurs particulières appartiennent à l'intervalle  $[-1 ; +1]$ .

Tableau 33 : Plan d'expérimentation et résultats d'essais (en présence de DMAP).

Essais	Température (°C)	Temps (min)	Qté RCOCl (ég.)	DS	GP
21	90	5	1,0	1,31	50
22	90	15	1,5	1,89	125
23	90	30	2,0	1,81	119
24	110	5	1,5	1,44	70
25	110	15	2,0	1,87	155
26	110	30	1,0	1,80	128
27	130	5	2,0	1,80	135
28	130	15	1,0	1,67	122
29	130	30	1,5	1,94	158
<b>Essais supplémentaires</b>					
39	130	30	2,0	1,95	160
40	90	30	1,0	1,84	130
41	130	5	1,0	1,82	101
42	90	5	2,0	1,40	66

Tableau 34 : Plan d'expérimentation et résultats d'essais (sans DMAP).

Essais	Température (°C)	Temps (min)	Qté RCOCl (ég.)	DS	GP
30	90	5	1,0	1,29	0
31	90	15	1,5	1,55	86
32	90	30	2,0	1,57	63
33	110	5	1,5	1,44	82
34	110	15	2,0	1,85	157
35	110	30	1,0	1,63	114
36	130	5	2,0	1,84	167
37	130	15	1,0	1,71	131
38	130	30	1,5	1,84	153
<b>Essais supplémentaires</b>					
43	130	30	2,0	1,63	139
44	90	30	1,0	1,49	105
45	130	5	1,0	1,38	47
46	90	5	2,0	1,39	95

### *III.2.6.b. Analyse mathématique des résultats*

L'objectif est maintenant de déterminer les 10 coefficients de l'équation du modèle et les résidus qui correspondent aux écarts entre les valeurs observées pour les réponses et les valeurs prévues par le modèle pour chaque essai du plan d'expériences.

D'une façon générale, les réponses GP ou DS, notées  $y$ , peuvent être décrites, pour chacun des essais du plan d'expériences, par la forme générale du modèle :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + e$$

où  $e = y - \hat{y}$ , appelé résidu, représente l'écart entre la valeur observée de la réponse, notée  $\hat{y}$ , et sa valeur calculée  $y$ ;  $a_0, a_1, \dots, a_{23}$  sont des coefficients à estimer.

Dans le plan d'expériences, comportant  $N$  points expérimentaux, on peut écrire  $N$  relations identiques à la précédente. Dans cet ensemble de relations, les coefficients  $a_i$  et les résidus  $e_i$  sont à estimer. La méthode des moindres carrés consiste à estimer les coefficients  $a_i$  qui minimisent la somme des carrés de ces résidus (Dodge, 1999).

Si on prend en compte l'ensemble des traitements expérimentaux, on est alors amené à résoudre un système comprenant 13 équations correspondant aux 13 traitements expérimentaux mis en œuvre dans le plan d'expériences. Le système, sous forme matricielle se présente comme suit :

$$(Y) = (X)(A) + (E)$$

Dans cette expression,  $(X)$  représente la matrice du modèle,  $(A)$  la matrice associée aux estimations des coefficients du modèle et  $(E)$  la matrice des résidus.

L'estimation des coefficients du modèle (tableau 35) est effectuée par la méthode des moindres carrés et utilise l'équation matricielle suivante :

$$(A) = ({}^tXX)^{-1}({}^tX)(Y)$$

Tableau 35 : Coefficients associés aux différents modèles.

Coeff.	DS	GP	DS	GP
	DMAP		Sans DMAP	
a <sub>0</sub>	1,90	145,83	1,83	154,18
a <sub>1</sub>	0,01	12,12	0,12	38,70
a <sub>2</sub>	0,14	19,63	0,05	4,30
a <sub>3</sub>	0,13	22,37	0,10	24,25
a <sub>11</sub>	0,08	4,13	-0,04	-11,95
a <sub>22</sub>	-0,11	-23,37	-0,15	-25,83
a <sub>33</sub>	-0,15	-13,00	-0,10	-22,00
a <sub>12</sub>	0,01	8,31	0,00	1,46
a <sub>13</sub>	0,01	-0,95	-0,01	-4,65
a <sub>23</sub>	-0,11	-15,90	-0,08	-21,52

La valeur des estimations des coefficients des monômes de degré 2 est comparable à celle des coefficients des monômes de degré 1. Ils traduisent des courbures de la surface de réponse.

Les réponses données par le modèle sont alors obtenues par l'équation suivante :

$$(\hat{Y}) = (X)(A)$$

Les tableaux 36 et 37 réunissent les valeurs des réponses mesurées et calculées à l'aide du modèle. La comparaison entre ces deux réponses,  $e = y - \hat{y}$ , permet de conclure à une très bonne qualité descriptive du modèle (figures 90 et 91).

Tableau 36 : Comparaison entre les réponses mesurées et les réponses calculées à partir du modèle (en présence de DMAP).

Essais	DS mesuré	DS calculé	GP mesuré	GP calculé
21	1,31	1,35	50	51
22	1,89	1,84	125	119
23	1,81	1,84	119	120
24	1,44	1,46	70	75
25	1,87	1,88	155	155
26	1,80	1,77	128	123
27	1,80	1,83	135	135
28	1,67	1,71	122	128
29	1,94	1,97	158	159
39	1,95	1,91	160	159
40	1,84	1,81	130	129
41	1,82	1,83	101	105
42	1,40	1,34	66	60

Tableau 37 : Comparaison entre les réponses mesurées et calculées à partir du modèle (sans DMAP).

Essais	DS mesuré	DS calculé	GP mesuré	GP calculé
30	1,29	1,19	0	2
31	1,55	1,58	86	78
32	1,57	1,51	63	66
33	1,44	1,49	82	89
34	1,85	1,82	157	156
35	1,63	1,61	114	108
36	1,84	1,77	167	168
37	1,71	1,71	131	139
38	1,84	1,77	153	154
43	1,63	1,72	139	137
44	1,49	1,56	105	103
45	1,38	1,45	47	51
46	1,39	1,44	95	86

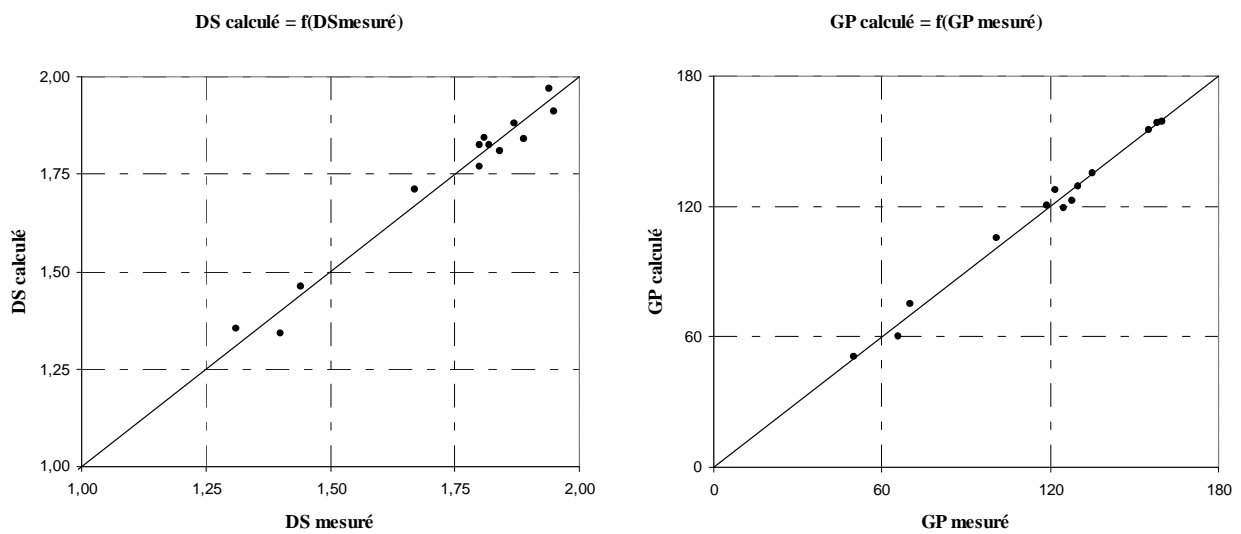


Figure 90 : adéquation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées des réponses (en présence de DMAP).

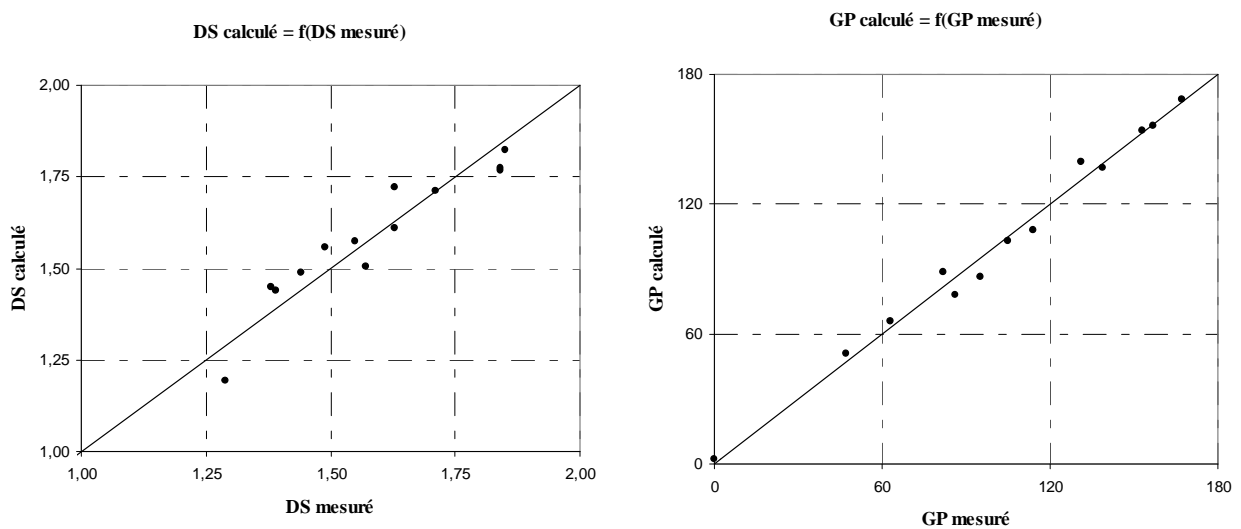


Figure 91 : adéquation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées des réponses (sans DMAP).

### III.2.6.c. Analyse graphique du modèle

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'objet de cette étude n'est pas de déterminer les conditions optimales qui permettent d'obtenir des valeurs maximales de DS et GP. Bien sûr, les modèles mathématiques établis permettent de connaître cette information. Néanmoins, comme les caractéristiques physiques (propriétés mécaniques, thermiques,...) des matériaux plastiques obtenus par estérification des xylanes sont dépendantes du nombre de chaînes greffées, l'expérimentateur peut être amené, en fonction du domaine d'application

souhaité, à préparer des esters de DS variés. Le modèle permet alors de déterminer l'ensemble des conditions opératoires compatibles avec un DS donné (dans le domaine expérimental tel qu'il est défini). Le choix des conditions expérimentales sera guidé par les contraintes qui s'imposent au manipulateur (contraintes matérielles, économiques,...).

Si l'exploitation du modèle à partir de l'équation paraît délicate, la restitution sous forme graphique de l'équation du modèle permet en revanche de visualiser et d'interpréter les variations des résultats d'essais. C'est ainsi qu'en fixant un des paramètres à une valeur particulière, on peut représenter l'équation dans l'espace sous forme d'une surface de réponse (figure 92), ou dans le plan, sous forme de courbes d'isoréponses (figure 93). Les courbes d'isoréponses correspondent à la projection des surfaces de réponse dans le plan et s'interprètent à la manière des courbes de niveaux. Ces représentations graphiques, très largement utilisées dans la méthodologie des plans d'expériences, constituent pour l'expérimentateur, un véritable outil d'aide à la prise de décision (Goupy, 1999).

Dans notre cas, en fixant successivement chacune des trois variables aux trois modalités qui leur sont associées, chacune des réponses DS et GP peut être représentée par 9 graphes en trois dimensions ou 9 courbes d'isoréponses. En considérant les expériences sans DMAP, nous avons finalement établi 36 surfaces de réponse et 36 graphes d'isocontours, afin d'exploiter au mieux le modèle. Nous ne présentons ici que quelques-uns de ces tracés, que nous avons jugé comme étant les plus informatifs.

- Pour l'ensemble des essais effectués en présence de DMAP, l'examen des coefficients du modèle et des surfaces de réponse (figure 92) indique que la variation de la quantité de chlorure d'acide n'a que peu d'effet sur le DS et le gain de poids, par rapport au temps ou à la température de réaction. Ainsi, en fixant la quantité de chlorure d'acide à 2 équivalents, il est possible comme le montrent les graphes de la figure 93, de couvrir une large gamme de DS.

Il est intéressant de noter que des DS forts ( $DS = 2$ ) sont obtenus pour une large gamme de temps et de température de réaction. Il n'en est pas de même pour les DS faibles, qui nécessitent un contrôle strict à la fois de la température et de la durée de réaction.

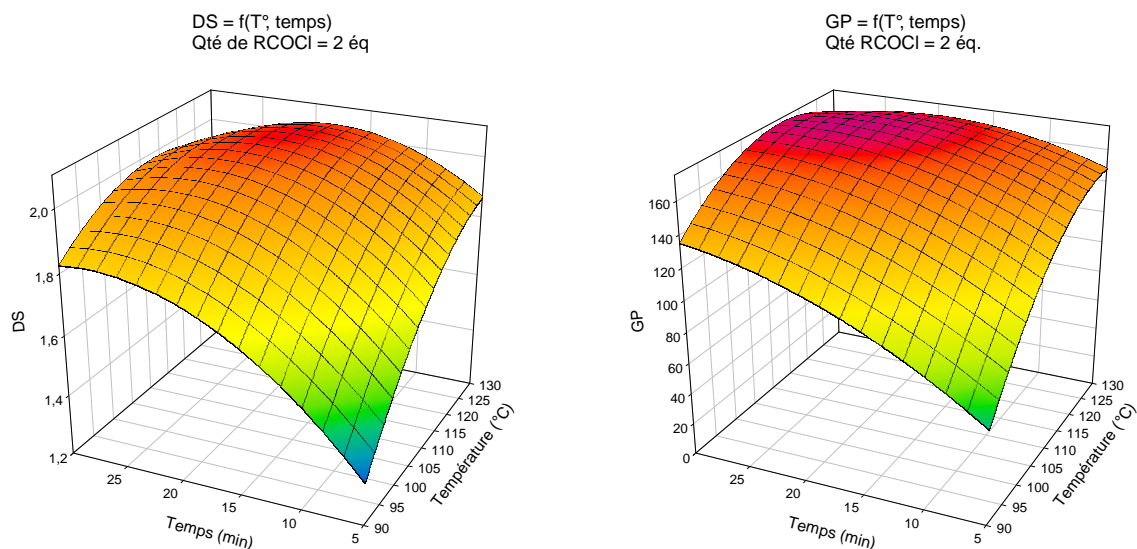


Figure 92 : Surfaces de réponse représentant le DS et le gain de poids en fonction de la température et du temps de réaction, la quantité de RCOCl restant fixée à 2 équivalents.

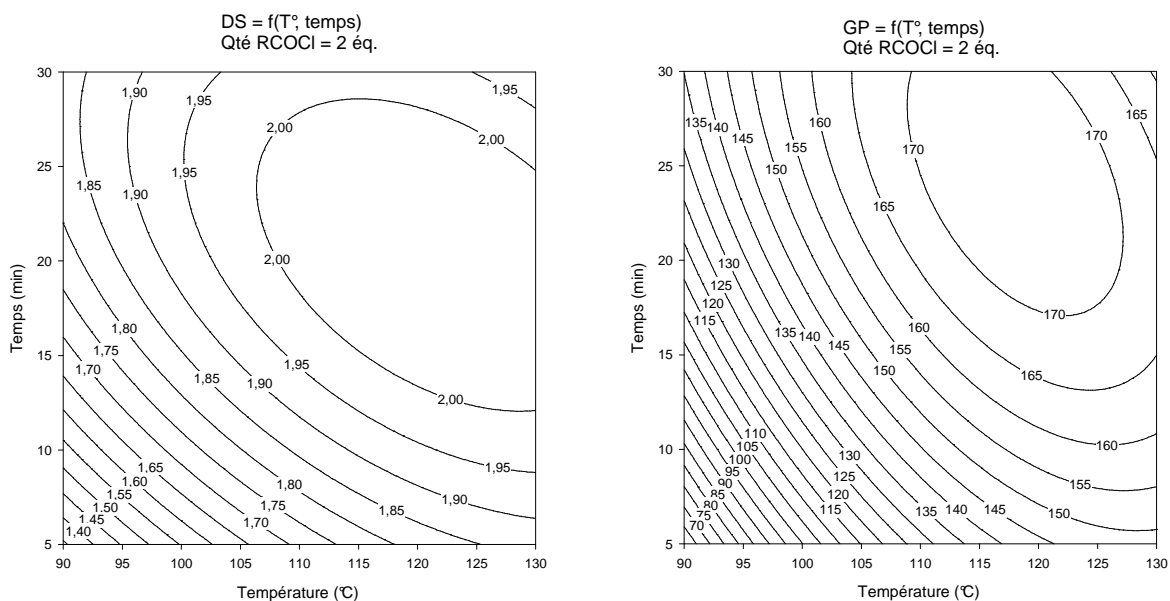


Figure 93 : Courbes d'isoréponses représentant le DS et le gain de poids en fonction de la température et du temps de réaction, la quantité de RCOCl restant fixée à 2 équivalents.

La diminution de la quantité de RCOCl n'a que peu d'effet sur l'allure des surfaces de réponse, et se traduit essentiellement par une légère diminution de la valeur maximale atteinte pour le DS et pour le gain de poids.



- La comparaison entre les profils des surfaces de réponse obtenues avec ou sans DMAP, fait apparaître des différences remarquables. Dans le cas des essais réalisés sans DMAP, la quantité de chlorure d'acide semble être un facteur aussi influent que la durée de la réaction ou la température. C'est ce qu'illustre, par exemple, la figure 94, qui compare les surfaces de réponse obtenues pour une valeur définie du temps de réaction (10 min), avec et sans DMAP.

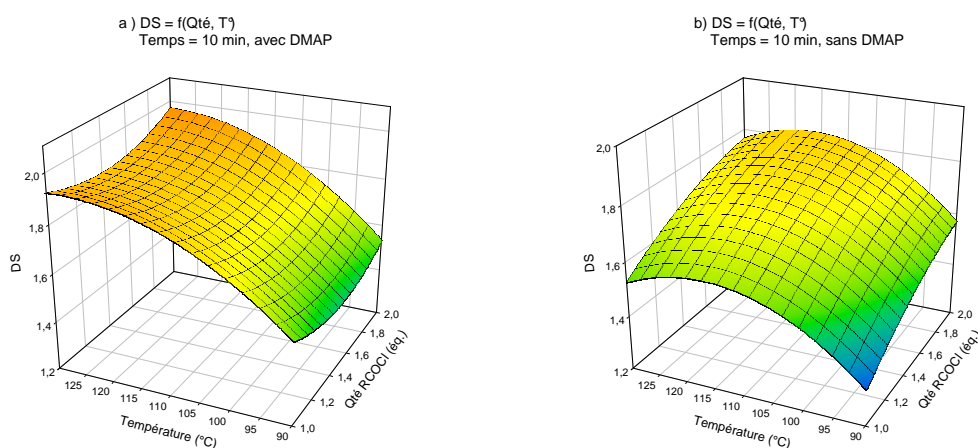


Figure 94 : Surfaces de réponse représentant le DS en fonction de la quantité de RCOCl et de la température de la réaction pour un temps de réaction de 15 min, a) en présence de DMAP, b) sans DMAP.

En effet, pour une température donnée, en présence de DMAP, le DS reste quasiment constant quelle que soit la quantité de chlorure d'acide. A l'inverse, en absence de DMAP, l'augmentation de la quantité de chlorure d'acide laurique conduit à une substitution plus importante. Ce résultat confirme le rôle d'activant joué par le DMAP lors de l'acylation des xylanes.

Par ailleurs, l'examen des surfaces de réponse relatives au gain de poids dans le cas d'une réaction sans DMAP, montre un déplacement des valeurs maximales du gain de poids, des fortes vers les faibles températures quand le temps évolue de 5 à 30 minutes, et inversement (figure 95). Ceci traduit le phénomène de dépolymérisation par hydrolyse des polymères en milieu acide (sans DMAP) et à température élevée ou pour des temps de réaction prolongés. Sans DMAP, les valeurs les plus élevées du gain de poids sont obtenues pour des températures de réaction plus faibles et des temps de réaction plus importants. Le rôle du DMAP en tant que base dans le milieu réactionnel est ainsi confirmé.

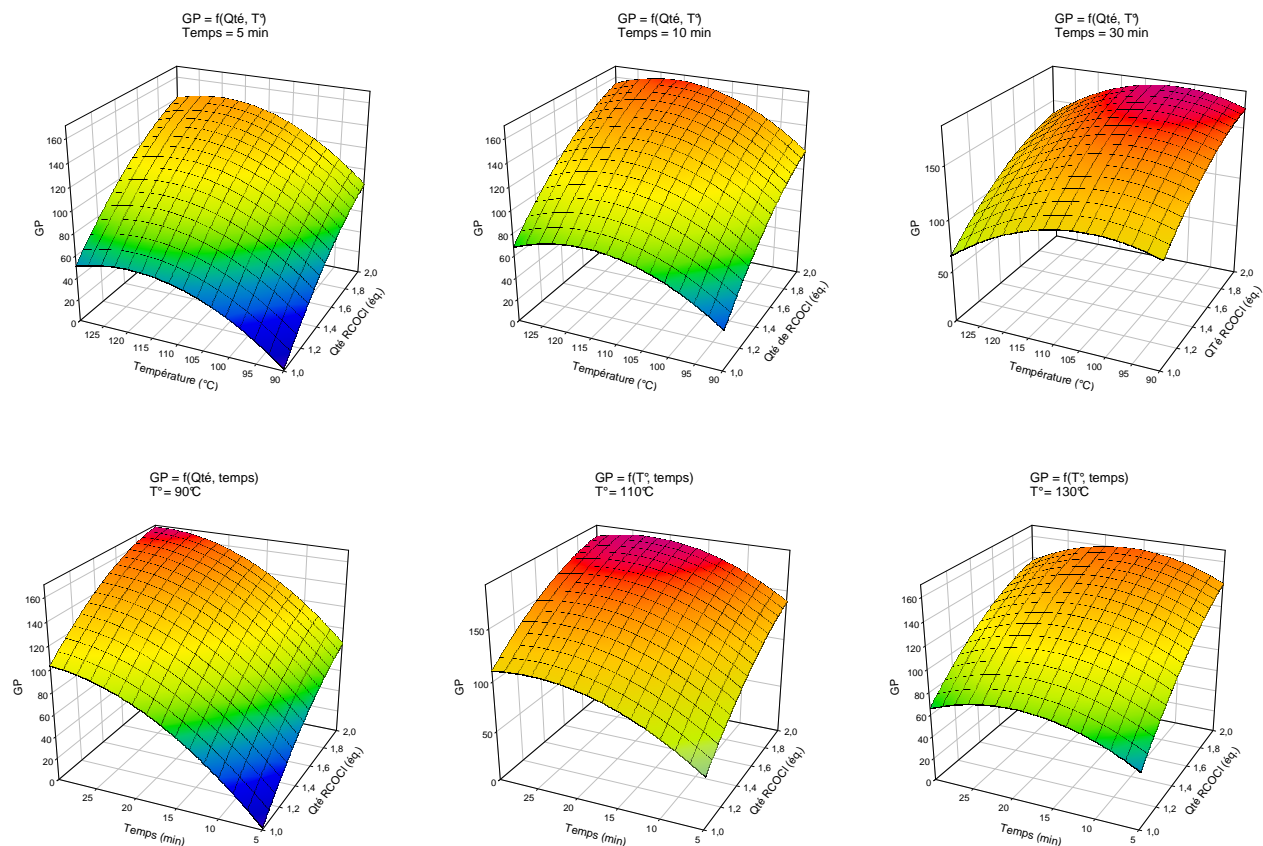


Figure 95 : Surfaces de réponse représentant le GP (sans DMAP) en fixant le temps, puis la température.

Ci-après sont représentées les courbes d'isoréponses relatives à la variation du DS en fonction de la quantité de chlorure d'acide et du temps, en fixant la température à des valeurs moyennes (90 et 110 °C) afin de limiter l'hydrolyse des esters formés (figure 96). Il est alors possible de définir les conditions opératoires conduisant à des films plastiques de DS variant de 1,25 à 1,90 ce qui représente la valeur quasi maximale. Les gains de poids associés restent cependant plus faibles par rapport aux valeurs recueillies pour un plastique de DS équivalent obtenu après acylation en présence de DMAP.

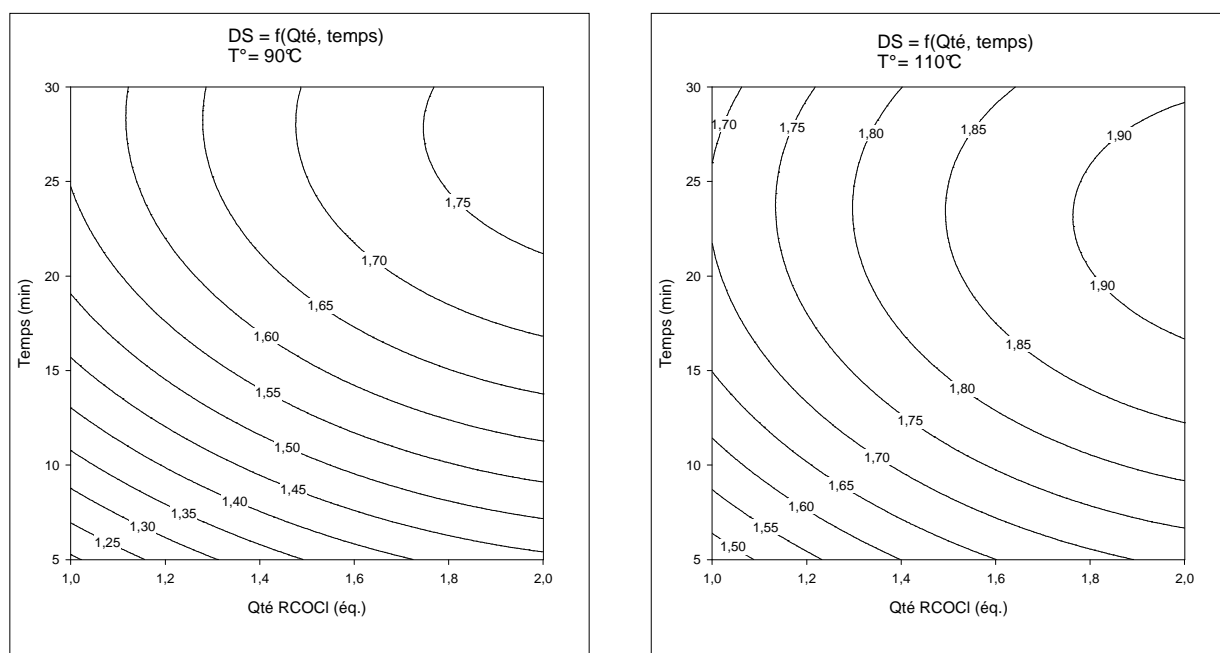


Figure 96 : Isocontours représentant le DS (sans DMAP) en fonction de la quantité de RCOCl et du temps.

Il semble donc plus intéressant de travailler en présence de DMAP, ce qui permet d'obtenir des plastiques avec des DS variés et des gains de poids élevés. Cependant, dans le cadre d'une valorisation des xylanes et en vue de certaines applications, la présence de DMAP peut être rédibitoire en raison de sa toxicité comparable à la plupart des produits dérivés de la pyridine.

Dans tous les cas, que ce soit en présence ou non de DMAP, ce sont les applications envisagées qui doivent guider l'expérimentateur. En effet, il est admis que les propriétés physico-chimiques des plastiques obtenus par acylation des polysaccharides par les acides gras sont directement liées au taux de substitution de ceux-ci, qu'il s'agisse des propriétés mécaniques, thermiques ou encore de la biodégradabilité (Fredon, 2001).

### III.3. Evaluation des propriétés mécaniques et thermiques des esters de xylanes

#### III.3.1. Tests mécaniques

Les tests de traction sont les tests les plus utilisés pour évaluer les propriétés mécaniques des matériaux, et notamment des thermoplastiques. Ils permettent de déterminer si un matériau est fragile ou ductile, rigide ou souple.

Le test de traction uniaxial permet d'étudier le comportement mécanique d'un matériau dans un large domaine (élastique, écoulement, rupture). Il consiste à déformer une éprouvette, de largeur initiale  $b_0$  et d'épaisseur initiale  $e_0$  à vitesse de déplacement constante, le long de son axe principal jusqu'à rupture. La charge supportée par l'éprouvette ainsi que l'allongement d'une zone de référence sont enregistrés.

Lorsqu'on représente la courbe contrainte / déformation pour un thermoplastique, deux types de comportements mécaniques se superposent : la déformation élastique et la déformation visqueuse ou plastique (figure 97). C'est pourquoi on parle de matériaux visco-élastiques. La zone pseudo-élastique se caractérise par la linéarité entre la contrainte et la déformation, les déformations étant instantanées et réversibles, alors que le domaine plastique (ou domaine d'écoulement) correspond à une déformation fonction du temps et irréversible, pour lequel la déformation croît à contrainte constante. Ces deux régions sont séparées par une zone de striction où la contrainte diminue avec la déformation. Physiquement, le domaine de striction s'accompagne d'une diminution locale de la section en un point particulier de l'éprouvette, en même temps qu'un fort allongement local de cette zone. Dans le domaine d'écoulement, la striction s'étend progressivement à la totalité de la partie calibrée de l'éprouvette.

La réponse d'un matériau viscoélastique à une sollicitation mécanique est donc intermédiaire entre celle d'un solide élastique parfait, pour lequel la déformation  $\epsilon$  est proportionnelle à la contrainte  $\sigma$ , et suit la loi de Hooke :

$$\sigma = \epsilon E, E \text{ étant le module d'Young,}$$

et celle d'un liquide visqueux idéal, pour lequel la vitesse de déformation  $d\varepsilon(t)/dt$  est proportionnelle à la contrainte  $\sigma$ , qui suit la loi de Newton :

$$\sigma = \eta \, d\varepsilon(t)/dt, \eta \text{ désignant la viscosité du matériau.}$$

Le tracé de la courbe contrainte / déformation (figure 97) permet alors de quantifier certaines propriétés mécaniques telles que :

- le *module d'élasticité ou module d'Young E* (MPa), déterminé par la pente initiale de la courbe qui est une mesure de la rigidité du matériau. Il correspond au facteur de proportionnalité entre la contrainte et la déformation dans la zone de déformation élastique.
- la *contrainte à la rupture  $\sigma_R$*  (Mpa), soit la contrainte maximale que le matériau peut supporter avant de se rompre, et l'*allongement à la rupture  $\varepsilon_R$*  (%), caractéristiques de la ténacité du matériau.

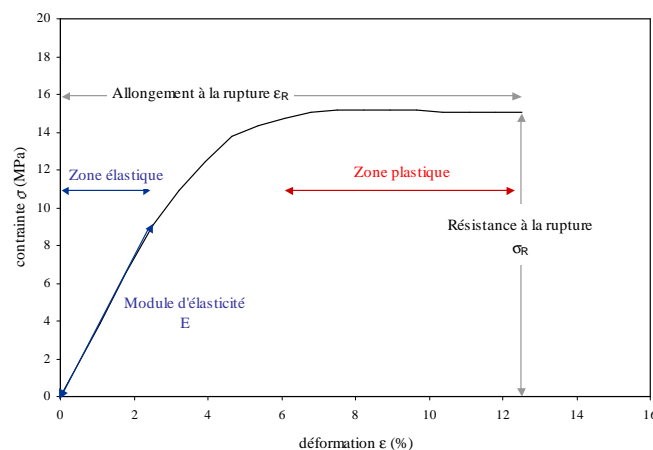


Figure 97 : Courbe contrainte / déformation pour l'ester de xylane de DS = 1,86

Les mesures effectuées sur les plastiques étudiés sont regroupées dans le tableau 38. Le tableau 39 présente quant à lui les caractéristiques mécaniques de films d'applications commerciales, dérivés de biopolymères ou pour les plus communs, de l'industrie pétrochimique. Nos résultats indiquent que d'une manière générale, les films formés se caractérisent par de faibles valeurs de l'élongation à la rupture (de l'ordre de 10%). Les valeurs obtenues pour la résistance à la rupture  $\sigma_R$ , proches de 10 MPa, comparées à celles de matériaux polymères synthétiques comme le polyéthylène téréphtalate par exemple, sont également faibles.

L'évolution des valeurs obtenues indique que le comportement mécanique des films plastiques est affecté par le degré de substitution, mais aussi par l'utilisation de DMAP lors de

leur synthèse. Quand la substitution augmente, les films deviennent moins résistants, la contrainte maximale que le matériau peut supporter avant la rupture diminuant ; ils sont plus fragiles, c'est à dire qu'ils possèdent un domaine plastique moins étendu. Enfin ils sont moins rigides (valeurs de E plus faibles), ces matériaux montrent en effet une déformation élastique plus importante.

Tableau 38 : Propriétés mécaniques des matériaux.

<b>Echantillon</b>	<b>E (MPa)</b>	<b><math>\sigma_R</math> (MPa)</b>	<b><math>\epsilon_R</math> (%)</b>
DS = 1,30	411,7	12,7	15,1
DS = 1,86	366,4	8,4	12,4
DS = 2,04	332,1	7,1	10,5
DS = 2,00 sans DMAP	657,1	5,6	5,2

D'un point de vue structural, les polysaccharides d'une manière générale, et les xylanes en particulier, doivent leur cohésion principalement à l'existence de liaisons hydrogène entre les chaînes de polymère par l'intermédiaire des groupements hydroxyle. Ces liaisons font des matériaux obtenus à partir des polysaccharides natifs des matériaux résistants et peu déformables. A titre indicatif, un film obtenu à partir d'hétéroxylane de son de maïs non modifié ne subit que très peu de déformation plastique ( $\epsilon_R = 2\%$ , tableau 38) et supporte une contrainte à la rupture de l'ordre de 25 MPa. En diminuant le nombre de liaisons hydrogène, l'introduction de chaînes alkyle se traduit par une diminution de la cohésion du matériau, et donc une perte de résistance. Ceci est signifié par l'évolution des valeurs de  $\sigma_R$ , qui prend alors des valeurs plus faibles de l'ordre de 10 MPa. Par contre l'introduction de ces chaînes apporte une plus grande flexibilité et permet donc une déformation plastique plus importante illustrée par les valeurs de  $\epsilon_R$ . Pourtant, si  $\epsilon_R$  voit bien sa valeur augmentée entre le polymère natif et le polymère partiellement substitué (DS = 1,3), quand le taux de substitution augmente, la capacité du matériau à se déformer diminue, probablement pour des raisons d'encombrement des chaînes qui ont alors tendance à adopter une conformation de plus en plus rigide.

Le tableau 38 met en évidence la fragilité des films obtenus sans DMAP, ceux-ci sont moins résistants, moins déformables et plus rigides. Ceci peut être encore une fois relié au phénomène d'hydrolyse partielle du polymère au cours de la réaction en l'absence de base dans le milieu réactionnel. La masse moléculaire des polymères diminuant, on constate une

diminution des performances mécaniques du matériau et une rupture plus fragile. L'influence de la masse moléculaire sur le comportement mécanique des matériaux est par ailleurs déjà connue. Nous pouvons citer l'exemple du polyéthylène qui selon son degré de polymérisation mène à deux types de composés, le polyéthylène haute densité (PEHD) de masse moléculaire de l'ordre de 200 à 500 000 et le polyéthylène ultra haute masse moléculaire (UHMWPE, ultra high molecular weight polyethylene) pour lequel la masse peut atteindre 6 000 000. Ce dernier constitue un matériau extrêmement résistant pouvant être substitué au Kevlar pour certaines applications.

Tableau 39 : Caractéristiques mécaniques de différents films de polymères (d'après <http://www.goodfellow.com>).

Nature du film	Appellations commerciales communes	Module de tension E (GPa)	Résistance à la traction $\sigma_R$ (MPa)	Elongation à la rupture $\epsilon_R$ (%)
Hétéroxylane de son de maïs natif			25	2
Cellulose régénérée	Cellophane <sup>®</sup>	5/3 <sup>a</sup>	120/55 <sup>a</sup>	18/55 <sup>a</sup>
Acétate de cellulose CA	Clarifoil <sup>®</sup> , Dixel <sup>®</sup>	1,0-4,0	12-110	15-55
Esters d'acide gras de cellulose (Wang, Tao, 1994)			2/0,8 <sup>b</sup>	7/17 <sup>b</sup>
Polyhydroxybutyrate PHB		3,5	40	
Polyhydroxybutyrate / polyhydroxyvalérate PHB / PHV		0,6-10/0,8-1,2 <sup>a</sup>	25-30/25-30 <sup>a</sup>	7-15/5-10 <sup>a</sup>
Polyéthylène basse densité PEFD	Alkathene <sup>®</sup> , Carlona <sup>®</sup> , ...	0,1-0,3	5-25	100-700
Polyéthylène haute densité PEHD		0,5-12	15-40	
	Parafilm <sup>®</sup>			300
Polystyrène PS	Polystyrol <sup>®</sup> , Styron <sup>®</sup>	2,3-4,1	30-100	1,6
Polypropylène PP	Appryl <sup>®</sup> , Hostalen PP <sup>®</sup> , ...	2,2-2,4	130-300	50-1000
Polyéthylène téréphtalate PET	Mylar <sup>®</sup> , Melinex <sup>®</sup> , Hostaphan <sup>®</sup>	2-4	190-260	60-165
Polychlorure de vinyle	Corvic <sup>®</sup> , Evipol <sup>®</sup> , ...	2,5-4,0	25-70	60
Polyéthylène naphthalate PEN	Kaladex <sup>®</sup> , Kalidar <sup>®</sup>	5-5,5	200	60

<sup>a</sup>valeurs longitudinales/transversales, <sup>b</sup>DS=0,8/2,7.

Les performances des films obtenus, comparées à celles des films d'origine pétrochimique peuvent paraître faibles. Cependant ils s'insèrent tout à fait dans la gamme des films de biopolymères existants, et en particulier ils présentent une meilleure résistance mécanique que les esters de cellulose.

### **III.3.2. Analyse thermique**

Lorsqu'ils sont soumis à des températures de plus en plus élevées, les matériaux plastiques passent lentement de l'état solide plus ou moins rigide à l'état de liquide très visqueux.

La transition vitreuse ( $T_g$ ) est le passage d'un état vitreux à un état caoutchoutique, caractéristique des matériaux polymériques amorphes. Elle correspond au passage d'une agitation moléculaire locale de faible amplitude, à une agitation importante s'étendant sur l'ensemble des chaînes macromoléculaires. Elle est en relation directe avec différents facteurs structuraux. La  $T_g$  est affectée par la flexibilité des chaînes greffées : lorsque la flexibilité augmente, la  $T_g$  diminue. A l'inverse, sa valeur augmente avec la taille et la polarité des groupes latéraux, et avec la masse moléculaire.

Sur le plan industriel, la  $T_g$  fixe la température à partir de laquelle il y a ramollissement du matériau et donc possibilité de mise en œuvre. Il est important qu'une fluctuation thermique accidentelle ne provoque pas une subite variation des propriétés du matériau. Il faut donc que la  $T_g$  soit suffisamment éloignée de la température d'utilisation.

Dans le cas des matériaux semi-cristallins, une augmentation de la température, au-dessus de la  $T_g$ , peut permettre de mettre en évidence une zone de fusion du matériau. La température de fusion  $T_f$  correspond à la rupture des liaisons faibles dans la zone cristalline du matériau, conduisant à un état liquide désordonné. Le matériau fondu peut alors subir différentes techniques de mise en forme.

#### ***III.3.2.a. Résistance thermique***

Une analyse thermogravimétrique a été réalisée afin d'étudier le domaine de stabilité thermique des plastiques obtenus. Un exemple de thermogramme pour l'ester de DS = 1,3 est



représenté figure 98. Un début de dégradation est observé aux alentours de 250°C pour tous les plastiques étudiés (tableau 40), et la perte de masse associée dépasse 80 % dès 380°C.

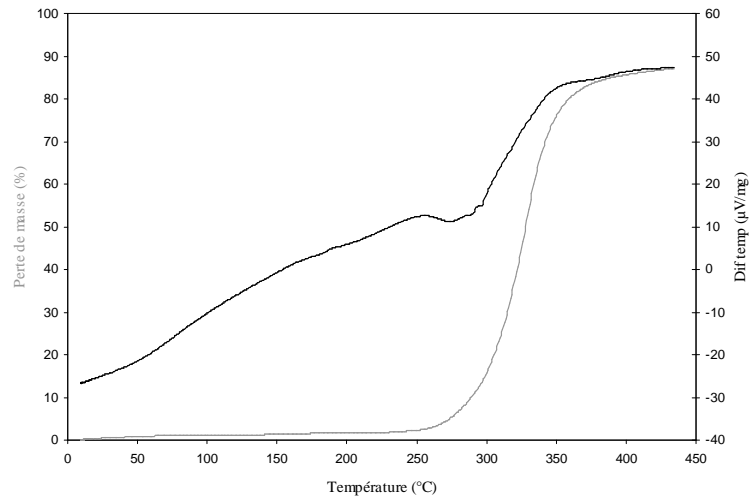


Figure 98 : Thermogramme mettant en évidence la dégradation du matériau, et la perte de masse associée (plastique de DS = 1,3).

La détermination de cette température permet de fixer la limite du domaine d'application du matériau (sa mise en forme et son utilisation).

Tableau 40 : Propriétés thermiques des matériaux.

Echantillon	$T_g$	$T_f$	$T_d$
DS = 1,30	nd	190	260
DS = 1,86	133	220	260
DS = 2,04	nd	225	260
DS = 2,00 sans DMAP	nd	235	260

$T_g$  = Température de transition vitreuse,  $T_f$  = Température de fusion,  $T_d$  = Température de début de dégradation  
nd : valeur non déterminée.

### III.3.2.b. Etude des transitions thermiques

La calorimétrie différentielle (Differential Scanning Calorimetry DSC) permet de détecter les effets thermiques (phénomènes endo ou exothermiques) se produisant lors d'une transformation ou d'une évolution structurale du matériau polymère. Cette technique permet

donc de mettre en évidence les différentes transitions enthalpiques du matériau, telles que la fusion/cristallisation, l'évaporation, la décomposition, etc... La mesure revient à déterminer la quantité  $\Delta H$  (variation d'enthalpie positive ou négative) mise en jeu lorsque le matériau est soumis à une variation de température parfaitement linéaire avec le temps. Lors d'une analyse calorimétrique, le thermogramme enregistré correspond à la variation  $dH/dT$ , c'est à dire celle de  $C_p$  (chaleur spécifique), avec la température. Dans le cas des polymères amorphes, la DSC est couramment utilisée pour déterminer la température de transition vitreuse, laquelle s'accompagne d'une forte variation de chaleur spécifique  $C_p = dH/dT$ .

L'analyse des courbes obtenues indique que les 4 films plastiques étudiés sont des matériaux semi-cristallins, caractérisés par une température de fusion (tableau 40). La température de fusion augmente avec le degré de substitution du film plastique étudié, évoluant de 190°C (DS = 1,3) à 225°C (DS = 2,04) ; la  $T_f$  correspondant au film plastique obtenu sans utilisation du DMAP est légèrement plus élevée (235°C). Il est à noter que le début de la fusion débute sensiblement à la même température, vers 160°C, pour les 4 plastiques.

Cette technique n'a cependant pas permis d'observer la transition vitreuse, et nous suggérons une analyse supplémentaire par DMTA (analyse thermomécanique dynamique), qui semble être plus adaptée pour des matériaux viscoélastiques.

### ***III.3.2.c. Spectrométrie mécanique***

Une des caractéristiques fondamentales d'un polymère, directement liée à sa structure macromoléculaire, est son caractère viscoélastique. Le fait que le comportement mécanique d'un polymère soit sensible à la vitesse de sollicitation signifie que le matériau, ayant subi une perturbation, tend à revenir à l'équilibre avec une cinétique qui lui est propre. C'est le phénomène de relaxation. Les relaxations sont dues aux mouvements moléculaires résultant de l'agitation thermique.

L'analyse thermomécanique dynamique (DMTA) permet d'explorer dans une large gamme de vitesses et de températures les relaxations dans les polymères. On étudie pour cela la réponse d'un matériau à une sollicitation dynamique périodique. Dans la pratique on utilise

des sollicitations de forme sinusoïdale. Il est alors possible d'évaluer les deux modules associés aux matériaux viscoélastiques : le module élastique dynamique ( $E'$ ) et le module visqueux ( $E''$ ). Le premier est analogue au module de Young et caractérise la partie d'énergie accumulée dans l'échantillon sous forme élastique, donc récupérable. Le module visqueux  $E''$  ou module de perte, est quant à lui directement proportionnel à l'énergie dissipée dans le matériau par frottements internes, ceux-ci résultant de la viscosité du milieu. Le tracé de la courbe du rapport  $E''/E'$ , appelé facteur de perte ou  $\tan \delta$ , en fonction de la température permet de repérer les températures de transition du polymère, et notamment la  $T_g$ .

La figure 99 présente le spectre mécanique enregistré pour le film plastique de DS = 1,86. Dans le domaine visco-élastique linéaire,  $\tan \delta$  passe par un maximum lors de la transition vitreuse, et la courbe représentant le module élastique dynamique  $E'$  présente un point d'inflexion pour cette valeur de la température.

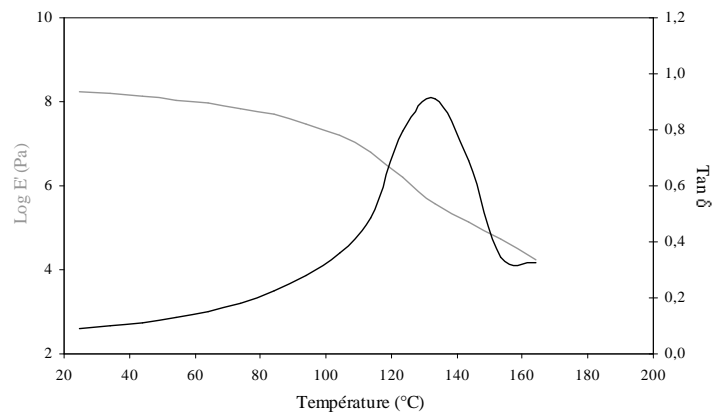


Figure 99 : Spectre mécanique d'un ester de xylane de DS = 1,86 (à 1Hz).

Le matériau considéré présente une transition vitreuse à 133°C. Les transitions vitreuses correspondant aux autres matériaux restent à déterminer. Compte-tenu des résultats décrits dans la littérature pour des esters cellulosiques, on peut cependant penser que la variation des  $T_g$  en fonction du DS doit être faible (Fredon, 2001). Avec une  $T_g$  de l'ordre de 130°C, nos matériaux, à température ambiante, sont dans leur domaine vitreux, cassant, et les valeurs obtenues pour l'allongement à la rupture de ces plastiques, faibles, confirment cette observation. L'ajout d'un plastifiant, comme le glycérol par exemple, en abaissant la  $T_g$ , permettrait d'élargir le champ d'applications pour ces matériaux.

### III.4. Modélisation moléculaire du xylane natif et du xylane substitué

Cette étude a été réalisée au Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales de Grenoble. Les calculs ont été effectués par Karim Mazeau (directeur de recherche), sur une station de calcul Silicon Graphics au Centre d'Expérimentation et de Calcul Intensif (CECIC, Grenoble).

#### III.4.1. Quelques généralités sur la modélisation moléculaire des polymères

La stabilité de la structure tridimensionnelle d'une molécule est déterminée par les interactions intramoléculaires, les interactions intermoléculaires et les interactions avec le milieu extérieur (solvant). La recherche des conformations stables d'une molécule consiste à déterminer les minima de l'énergie globale d'interaction. Cette énergie peut être calculée par des méthodes quantiques, *ab initio* et semi-empiriques, qui rendent compte de l'environnement électronique des atomes, mais qui ne peuvent être utilisées que pour de petites molécules ne comportant que quelques dizaines d'atomes, au plus. Dans le cas des polymères, étant donné le nombre très élevé d'atomes à considérer, la modélisation fait intervenir des méthodes empiriques telles que la mécanique et la dynamique moléculaires. Ces méthodes se basent sur l'utilisation d'un *champ de forces* qui représente l'environnement électronique moyen de chaque type d'atome.

Le champ de forces est une somme de contributions liées d'une part à la géométrie interne de la molécule, tenant compte des longueurs de liaisons, des déformations angulaires et des torsions, et d'autre part aux interactions entre atomes non liés, telles que les interactions électrostatiques, les interactions de Van der Waals et les liaisons hydrogène. L'expression du champ de forces est ainsi décomposée en un terme intramoléculaire ( $V_{\text{intra}}$ ), exprimant les interactions entre atomes liés, et un terme intermoléculaire ( $V_{\text{inter}}$ ) ou non liant :

$$V = V_{\text{intra}} + V_{\text{inter}} = \sum_{\text{liaisons}} V_{\text{élongation}} + \sum_{\text{angles}} V_{\text{courbure}} + \sum_{\text{dièdres}} V_{\text{torsion}} + \sum_{\text{atomes non liés}} V_{\text{électr}} + \sum_{\text{atomes non liés}} V_{\text{vdW}} + \sum_{\text{atomes non liés}} V_{\text{hb}}$$

Chaque terme de cette expression est représenté par une fonction mathématique. La paramétrisation, c'est à dire l'ajustement de ces fonctions mathématiques au moyen de méthodes expérimentales ou quantiques, au type de molécule considérée, varie d'un champ de

forces à l'autre. Dans le cadre de notre étude, nous avons employé un champ de forces de type PCFF (Polymer Consistent Force Field), spécifique à l'étude des polymères.

La *mécanique moléculaire* est l'application directe d'un champ de forces à un système donné. Après avoir généré une conformation donnée et calculé l'énergie associée, la molécule ne se trouvant pas dans son état énergétique le plus stable, il faut optimiser sa structure pour approcher la structure la plus conforme à la réalité. Il faut donc minimiser l'énergie puisque les conformations les plus probables correspondent aux états de plus basse énergie.

Dans le cas des polymères, le minimum global correspond à la configuration de la chaîne au sein du cristal. D'un point de vue entropique, cet état est difficilement accessible pour une longue chaîne de polymère. Il existe en effet un seul minimum global mais un très grand nombre de minima locaux. Plusieurs procédures de recherche de minima existent. Leur point commun est de franchir des barrières de potentiel permettant ainsi d'atteindre plusieurs points de l'espace conformationnel. Pour le traitement des polymères, trois types de méthodes peuvent être employées. La procédure de Ramachandran, que nous avons utilisée et qui est détaillée par la suite, est une recherche systématique de minima. La procédure de Monte-Carlo est une technique stochastique basée sur l'échantillonnage de l'espace conformationnel par génération de structures aléatoires. Enfin la méthode du recuit simulé consiste à porter le système à haute température, l'énergie cinétique fournie permettant ainsi de franchir des barrières d'énergie élevées. On effectue ensuite un refroidissement lent. Les atomes sont alors animés d'un certain mouvement : il s'agit d'une dynamique moléculaire.

#### **III.4.2. Analyse conformationnelle des motifs disaccharidiques**

Dans un premier temps, nous nous attachons à l'étude conformationnelle du disaccharide constituant le motif de répétition de la chaîne principale du polymère, c'est à dire le xylobiose dans le cas du xylane natif, et le xylobiose substitué sur les positions 2 et 3 par l'acide laurique pour le polymère modifié. L'analyse conformationnelle a pour but d'isoler les conformations les plus probables que peuvent adopter ces disaccharides.

Les conformations des disaccharides sont définies par les différentes orientations des deux résidus autour de la liaison glycosidique ainsi que par l'orientation des groupements

exocycliques, et par les fluctuations des cycles pyranose (figure 100). Les orientations relatives de deux monosaccharides sont exprimées en terme d'angles de torsion de liaison glycosidique,  $\phi$  et  $\psi$ . Pour une liaison de type (1 $\rightarrow$ 4) :  $\phi = O_5'-C_1'-O_1'-C_4$  et  $\psi = C_1'-O_1'-C_4-C_5$ .

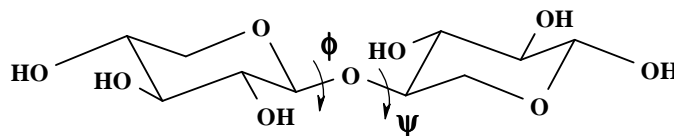


Figure 100 : Schéma du xylobiose avec ses angles de torsion.

Le coût énergétique pour faire varier les principaux degrés de liberté des molécules par rapport à leur position d'équilibre, peut être évalué à environ 100 kcal/mol pour les liaisons, 10 kcal/mol pour les angles de valence et 1 kcal/mol pour les angles de torsion. Le faible coût énergétique de ces derniers indique que les variations des angles de valence et des liaisons sont faibles et qu'elles n'interviendront pas dans une exploration de l'espace conformationnel. Ainsi, les conformations moléculaires seront largement décrites par l'ensemble des angles dièdres. La variation systématique des angles de torsion glycosidique permet d'explorer tout l'espace conformationnel et d'engendrer un panel de structures. L'analyse conformationnelle autour de la liaison glycosidique consiste à faire varier la valeur des angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$  par pas réguliers de 0 à 360°. A chaque paire d'angles dièdres va correspondre une énergie dont la valeur est reportée sur un graphe. Les contours iso-énergétiques ou cartes de Ramachandran ainsi obtenues constituent :

- des cartes rigides lorsque les structures sont établies par incrémentation des angles sans relaxer la géométrie des résidus ;
- des cartes relaxées lorsque pour chaque position des angles dièdres, les paramètres internes de la fonction d'énergie sont optimisés par minimisation d'énergie.
- des cartes adiabatiques lorsque pour chaque point de l'espace ( $\phi$  ;  $\psi$ ), l'orientation des groupements exocycliques a également été optimisée.

Ces cartes d'iso-contours constituent une représentation graphique des variations d'énergie en fonction de l'orientation relative des monosaccharides. Elles localisent les minima d'énergie et indiquent les possibilités d'interconversions entre les différents conformères stables, et la hauteur des barrières d'énergie à franchir.

Les cartes adiabatiques ( $\phi$ ,  $\psi$ ) pour les dimères natif et substitué sont présentées figure 101. L'analyse conformationnelle des disaccharides a été réalisée avec le champ de forces MM3, spécialement conçu pour la modélisation des glucides, prenant en compte l'effet anomérique. La carte du xylobiose fait apparaître quatre zones énergétiquement favorables (tableau 41). Ces régions d'énergie minimale définissent les structures les plus stables représentées figure 102. La zone de plus basse énergie qui désigne les conformations les plus stables correspond à des orientations *gauche-* ( $180^\circ < \phi$  et  $\psi < 360^\circ$ ) des angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$ . Ces conformations sont relativement étendues. Les régions (*gauche-*, *gauche+*) et (*gauche+*, *gauche-*) correspondent à des conformations repliées. Globalement l'énergie converge vers trois domaines angulaires localisés sur une diagonale correspondant aux axes hélicoïdaux, de type  $3_1$  majoritairement, que l'on retrouve dans les structures cristallines des xylanes ou d'autres polysaccharides comparables (Sundararajan et Rao, 1969). Notons que les conformations correspondant aux trois valeurs d'énergie les plus basses sont stabilisées par des liaisons hydrogène O3...O5 pour les deux premières et O3...O2 pour la troisième.

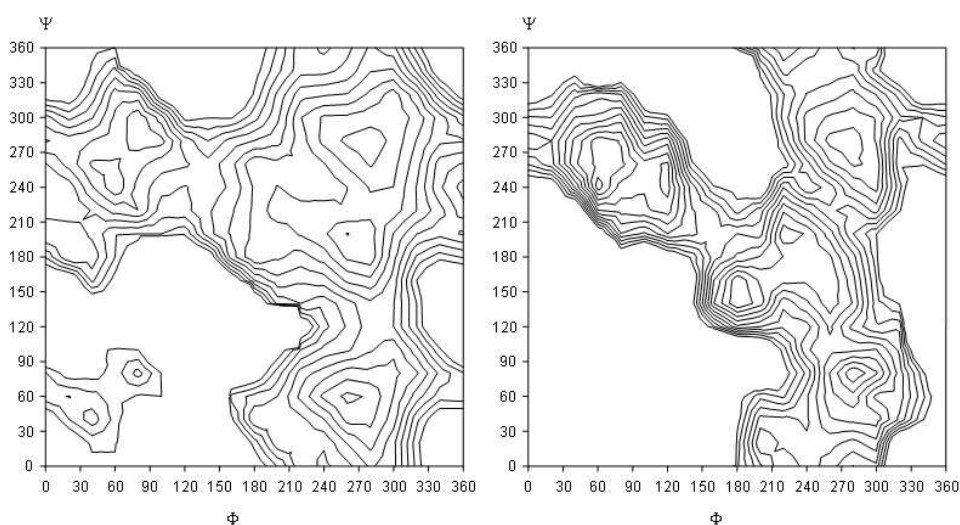


Figure 101 : Cartes d'énergie conformationnelle relaxées du xylobiose (à gauche) et du xylobiose substitué (à droite). Les différents contours correspondent à des énergies comprises entre 1 et 10 kcal.mol<sup>-1</sup> et sont séparés par 1 kcal.mol<sup>-1</sup> (en énergie relative).

La carte du xylobiose est similaire à celles décrites pour des disaccharides liés par une liaison glycosidique de type  $\beta(1\rightarrow4)$  tels que le cellobiose (Rees et Skerrett, 1968) et le mannobiose (Petkowicz et *coll.*, 1998). Les différences constatées, notamment des domaines d'énergie accessibles moins étendus pour les conformations repliées, sont à attribuer à l'absence de groupement hydroxyméthyle en position 5 dans le cas du xylobiose. En effet ce groupement contraint la structure en augmentant la gêne stérique et en permettant

l'établissement de liaisons hydrogène inter-résidus comme dans le cas du cellobiose notamment).

Tableau 41 : Valeurs des angles de torsion et énergies relatives des conformations d'énergie minimale des disaccharides.

	Conformation	$\phi$ (°)	$\psi$ (°)	dE (kcal.mol <sup>-1</sup> )
<b>Xylobiose</b>	<b>1</b>	280	280	0,00
	<b>2</b>	260	200	0,51
	<b>3</b>	260	60	1,28
	<b>4</b>	60	240	2,81
	<b>5</b>	80	300	2,82
<b>Xylobiose 2,3-substitué</b>	<b>1'</b>	60	240	0,00
	<b>2'</b>	180	140	0,50
	<b>3'</b>	280	80	0,57
	<b>4'</b>	220	200	1,80
	<b>5'</b>	120	240	2,09
	<b>6'</b>	280	280	2,86

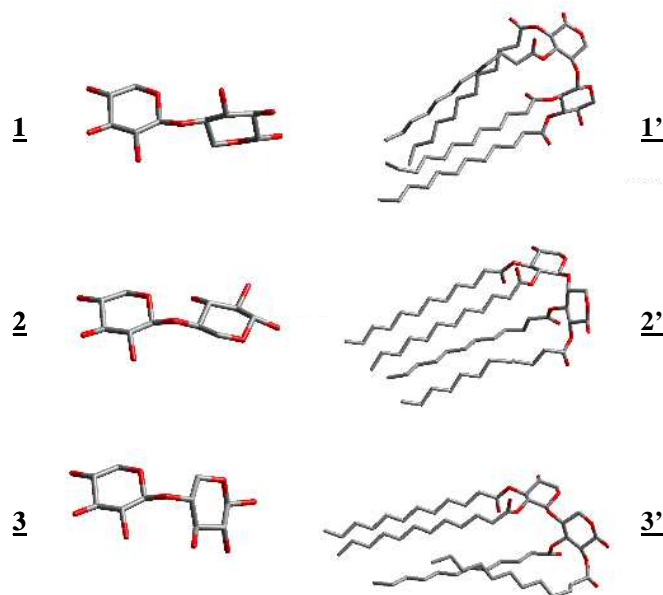


Figure 102 : Représentation des trois conformations les plus stables du xylobiose (à gauche) et du xylobiose 2,3-substitué (à droite).



La carte du xylobiose substitué (figure 101) est assez comparable à celle du xylobiose, avec une région principale pour les configurations étendues, et deux régions auxiliaires correspondant aux conformations repliées. En revanche l'aire totale accessible est moins importante que pour le xylobiose non substitué, ce qui indique une plus grande rigidité des conformations stables pour ce dimère. Les conformations d'énergie minimale sont toutes alignées suivant un axe transversal allant des orientations (*gauche+*, *gauche-*), (*trans*, *trans*), (*gauche-*, *gauche+*). La zone des conformations étendues, aire la plus stable dans le cas du xylobiose, correspond à des orientations moins privilégiées.

### III.4.3. Construction de chaînes de xylane – Etude de l'état cristallin

Des hélices régulières ont été construites à partir des géométries d'énergie minimale définies par les cartes d'énergie potentielle des deux disaccharides. Les hélices sont caractérisées par deux paramètres :  $n$ , qui correspond au nombre de résidus par tour, et  $h$ , la projection d'un résidu sur l'axe de l'hélice. Une valeur positive de  $n$  définit une hélice droite et une valeur négative de  $n$ , une hélice gauche. A partir des conformations les plus stables définies précédemment, un programme développé au Cermav, POLYS, modifie les valeurs des angles dièdres afin d'obtenir une valeur entière pour  $n$ . Avec ces valeurs optimisées de  $\phi$  et  $\psi$ , les hélices sont construites. Enfin ces structures sont relaxées par minimisation avec le champ de forces MM3. Les paramètres structuraux, hélicoïdaux et énergétiques des hélices les plus stables construites à partir des deux conformations disaccharidiques les plus stables sont présentés dans le tableau 42. Ces hélices sont représentées figure 103.

Tableau 42 : Paramètres structuraux et énergétiques des hélices les plus stables.

	Chiralité	$n$	$h$	$\phi$ (°)	$\psi$ (°)	dE (kcal.mol <sup>-1</sup> )	dE (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Hélice 1		2	10,44	272	208	10	16
Hélice 2	Gauche	3	15,29	289	263	1	0

Pour cette étude, nous avons considéré au départ des hélices comportant 2 à 6 résidus par tour. Les résultats ont cependant montré que seules les configurations les plus étendues avec un pas compris entre 10 et 15 Å (2 ou 3 résidus par tour) sont favorables du point de vue énergétique. De plus les hélices générées à partir des configurations repliées (3,4 et 5) des

disaccharides ne sont pas stables. Concernant les hélices substituées (figure 103), on peut observer un repliement des chaînes alkyle qui viennent entourer la chaîne principale de xylose.

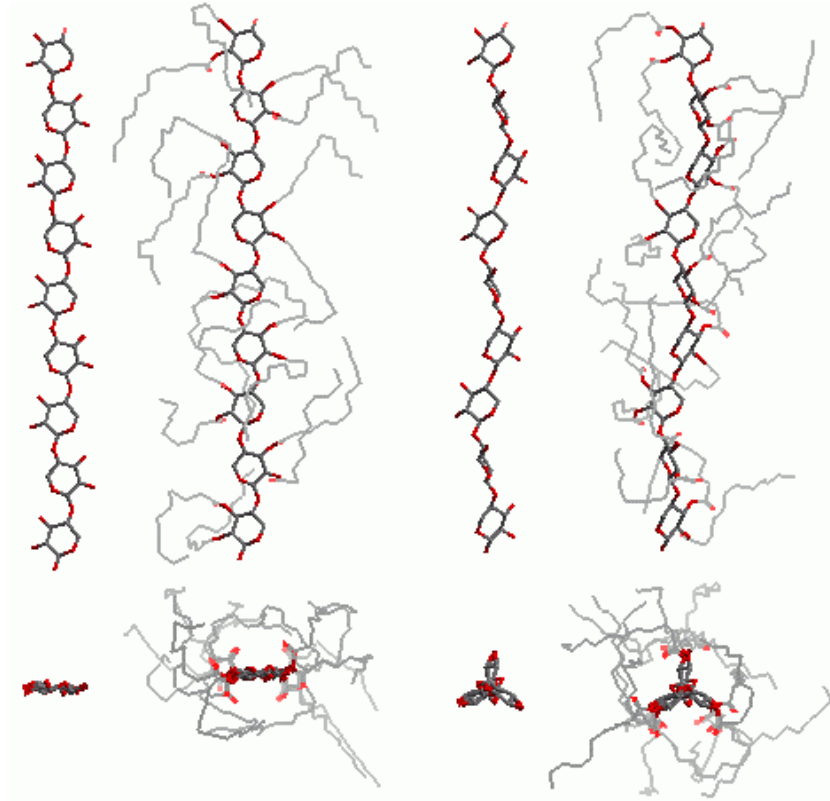


Figure 103 : Hélices  $2_1$  et  $3_1$  du xylane natif et du xylane substitué.

Ces résultats, dans le cas des xylanes, sont en accord avec des résultats de diffraction X (Atkins, 1992) et les hélices obtenues constituent une image satisfaisante de ces polymères dans leur état cristallin. Toutefois, les chaînes de polymère au sein d'un matériau amorphe ou semi-cristallin tels que les plastiques que nous avons synthétisés, adoptent dans leur conformation d'équilibre la forme de pelotes statistiques. Dans ce cas, les hélices ne sont plus représentatives du matériau et l'étude d'une chaîne isolée n'est plus suffisante pour décrire les propriétés de celui-ci.

#### III.4.4. Etudes des matériaux en phase amorphe

Considérons un système désordonné dans lequel les polymères adoptent un très grand nombre de conformations possédant chacune une probabilité d'apparition non nulle. La probabilité de trouver une configuration correspondant au minimum global de l'énergie est infime. Le calcul des propriétés du polymère en phase amorphe nécessite alors la connaissance du comportement statistique de la chaîne.

La représentation en volume d'une chaîne de polymère consiste à définir une boîte de simulation, dans laquelle on positionne au hasard le motif de répétition, dans notre cas le xylobiose, dans une de ses conformations stables. La chaîne de polymère est ensuite construite aléatoirement, en introduisant les résidus un par un dans la cellule. La conformation est retenue si le résidu ajouté n'induit pas une gêne stérique trop importante vis-à-vis des résidus déjà présents. Pour éviter les effets de bord que généreraient une boîte finie, on utilise en général des *conditions aux limites périodiques* qui consistent à reproduire la boîte de simulation de façon tri périodique dans l'espace formant ainsi un macroréseau. La taille de la boîte est définie par son arête, qui est déterminée à partir de la racine cubique du volume molaire du matériau. L'application des conditions aux limites périodiques signifie que toute molécule sortant par une face du cube va entrer automatiquement par la face opposée : la densité est ainsi préservée. Le système est alors considéré périodique, sa périodicité étant égale à l'arête du cube (figure 104).

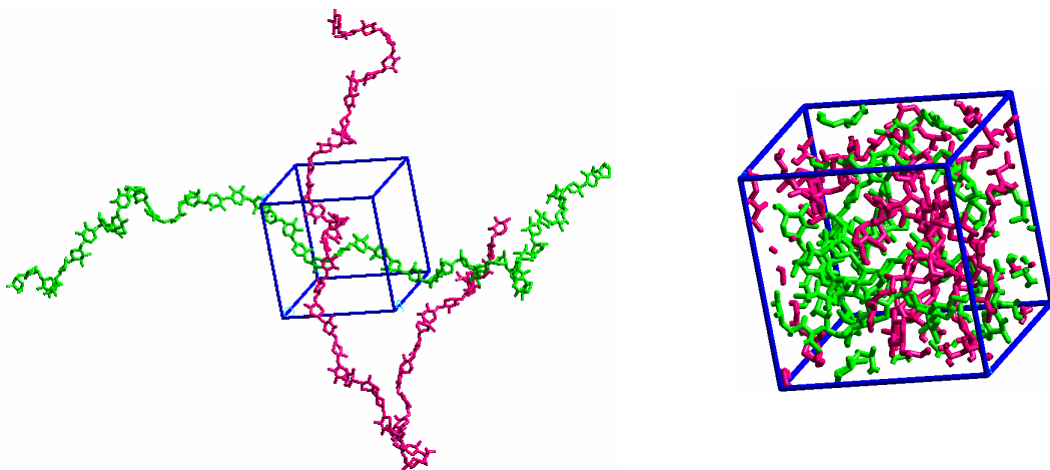


Figure 104 : Représentation des conditions aux limites périodiques.

Afin d'éviter les artefacts apportés par des calculs d'interactions non liantes supplémentaires, la convention de l'image minimale est utilisée (figure 105). Cette convention considère uniquement les interactions entre deux atomes dont la distance de séparation est la plus courte.

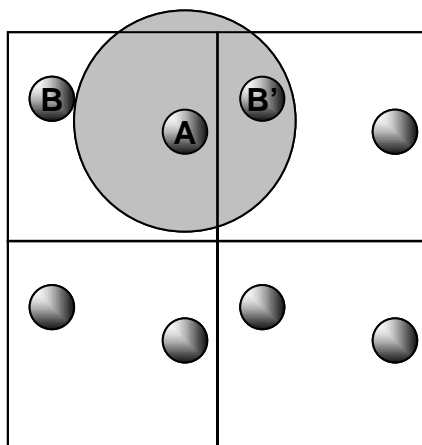


Figure 105 : Représentation schématique de la convention d'image minimale. L'interaction entre deux atomes A et B, présents au sein de la cellule principale, ne sera pas prise en compte si la distance entre ces deux atomes est supérieure à la distance entre A et B', B' étant l'image de B dans une autre cellule.

Après avoir défini la géométrie, il est nécessaire de définir le potentiel qui va décrire l'interaction entre les particules du modèle. Le calcul du potentiel intermoléculaire demande ici beaucoup de temps, c'est pourquoi il est nécessaire d'introduire des procédures permettant de réduire ces temps de calcul. L'une des approximations admises consiste notamment à négliger les interactions non liantes au-delà d'une certaine distance.

L'étape suivante consiste à attribuer à chaque particule une vitesse ; celle-ci est en général choisie aléatoirement, suivant une distribution de type Maxwell-Boltzmann. La phase d'optimisation de l'occupation de la cellule est importante : elle permet par une série de simulations de dynamique moléculaire de corriger la configuration de départ, et ainsi de rendre le modèle plus conforme à la réalité.

Le principe d'une *dynamique moléculaire* est d'animer une molécule, ou un ensemble de molécules, d'une trajectoire quasi-réelle. Pour cela, le calcul intègre les équations du mouvement. Afin d'éviter la divergence du système, la conformation de départ doit être

stable, c'est pourquoi une simulation par dynamique nécessite au préalable une étape de minimisation de l'énergie. Généralement, on emploie les équations newtoniennes du mouvement. Les coordonnées moléculaires et les vitesses à un instant  $(t + \delta t)$  sont obtenues à partir de la connaissance des coordonnées et des vitesses des atomes à l'instant  $t$ . Le pas d'intégration dépend du type d'intégrateur. Pour nos calculs, nous avons employé l'algorithme de Verlet (1967), un des intégrateurs les plus couramment utilisés, avec un pas d'intégration de 1 fs, durée pendant laquelle les vitesses sont supposées rester constantes.

Lors d'une simulation par dynamique moléculaire, à tout instant la position ( $r$ ) et la quantité de mouvement ( $p$ ) des atomes constitutifs du système sont accessibles. Un état microscopique d'un système donné est alors caractérisé par l'ensemble des valeurs  $\{r, p\}$ . La finalité de la dynamique moléculaire réside dans la compréhension et la prédiction de phénomènes macroscopiques. Pour ceci on utilise la physique statistique et les notions d'*ensembles statistiques*, qui permettent de relier les propriétés microscopiques aux propriétés thermodynamiques (macroscopiques) du système.

Pour modéliser les solides amorphes de xylane et de xylane substitué, nous nous sommes appuyés sur les résultats obtenus pour la cellulose (Mazeau et Heux, 2003). Dans chacun des cas, une chaîne de DP 50 a été insérée dans une boîte périodique (figure 106) et la densité initiale est fixée à  $1,25 \text{ g.cm}^{-3}$ , c'est à dire légèrement inférieure à la densité du cristal de xylane de  $1,3 \text{ g.cm}^{-3}$ .

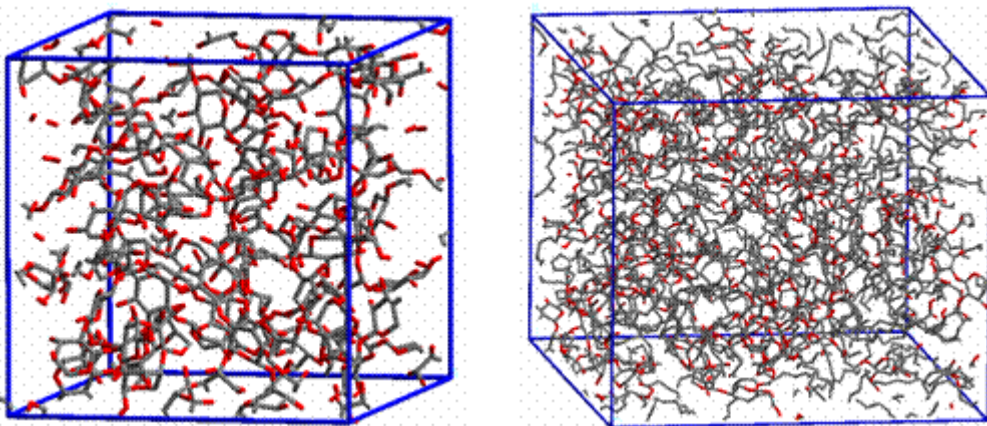


Figure 106 : Cellules modélisant les solides amorphes du xylane natif (à gauche) et du xylane substitué par les chaînes grasses (à droite).

Par la suite, le calcul de paramètres de solubilité de Hildebrand ( $\delta$ ), équivalent au calcul de la racine carrée de la densité de l'énergie de cohésion, permet de révéler la « qualité » des structures obtenues. Ces paramètres sont reportés dans le tableau 43.

Tableau 43 : Densités d'énergie cohésive (CED) et paramètres de solubilité ( $\delta$ ) du xylane et du xylane substitué.

	<b>CED</b> <b>(kcal.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-3</sup>)</b>	<b><math>\delta</math></b> <b>(J.cm<sup>-3</sup>)<sup>1/2</sup></b>
Xylane natif	0,108 ± 0,024	27,16 ± 3,09
Xylane 2,3-substitué	0,043 ± 0,051	15,55 ± 7,36

Pour comparaison, ces paramètres avaient été estimés par des travaux antérieurs pour la cellulose amorphe (Mazeau et Heux, 2003) : CED = 0,672 kcal.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-3</sup> et  $\delta$  = 68,33 (J.cm<sup>-3</sup>)<sup>1/2</sup>. Ces valeurs sont largement inférieures dans le cas du xylane, signifiant que la cohésion du solide dans ce cas est moins importante. Ces résultats peuvent être attribués à la présence du groupement hydroxyméthyle en position 5 du cellobiose, qui contribue largement aux interactions intermoléculaires.

La comparaison des valeurs de ces paramètres pour le xylane et le xylane substitué semblent indiquer une cohésion moins importante du matériau substitué par les chaînes grasses. Les valeurs calculées des paramètres sont en effet nettement inférieures à celles obtenues pour le xylane natif. Cette diminution de la cohésion due à la substitution apporte donc un plus grand degré de liberté à l'ensemble. La capacité des chaînes de polymères à glisser les unes par rapport aux autres est donc augmentée, ce qui pourrait expliquer le caractère plastique du matériau substitué.

### III.5. Conclusion

Au cours de ce travail consacré à l'obtention d'esters gras de xyloxyanes, nous avons montré que les hémicelluloses, et plus particulièrement les glucuronoxylanes qui nous intéressent dans cette étude, peuvent être transformées en matériaux plastiques hydrophobes. L'acylation est réalisée en phase homogène, en utilisant un solvant peu toxique, le DMA et peut être effectuée avec un activateur, le DMAP, afin de limiter la dégradation des esters formés par l'acide chlorhydrique, ou sans DMAP avec des rendements légèrement plus faibles, limitant ainsi l'utilisation de produits toxiques. Les plastiques obtenus ont des degrés de substitution variables compris entre 1,3 et 2 (substitution totale).

La mise en oeuvre d'un plan d'expériences a permis de mieux appréhender la réaction et d'en maîtriser les paramètres les plus importants. Nous avons ainsi identifié les facteurs principaux qui régissent l'acylation des xyloxyanes et modélisé cette réaction dans un domaine expérimental défini, par l'utilisation d'une méthode de régression. Nos résultats démontrent que des valeurs de DS élevées voire maximales peuvent être facilement obtenues, dans une large gamme de température et de temps de réaction, avec ou sans DMAP ; une température modérée associée à une durée de réaction légèrement prolongée permet cependant de limiter l'hydrolyse du polymère et donc une diminution du rendement. L'obtention d'un plastique faiblement substitué nécessite par contre un plus strict contrôle des paramètres de la réaction. Quelques-unes des caractéristiques physico-chimiques de ces plastiques ont été estimées, notamment leur température de transition vitreuse qui est située autour de 130°C. Cette dernière définit les domaines d'applications, ainsi que les propriétés mécaniques des matériaux, qui dans notre cas, sont comparables à celles de l'acétate de cellulose, largement exploité d'un point de vue industriel. Ce modèle, au-delà de son caractère descriptif, possède également un caractère prédictif. Il est alors possible de répondre à un cahier des charges qui imposerait des valeurs de DS et de gain de poids. Un tel modèle pourrait inclure par la suite d'autres propriétés, notamment les propriétés mécaniques. La généralisation de cette réaction à d'autres acides gras avec un nombre de carbones supérieur ou inférieur, ainsi que l'ajout de plastifiant tel que le glycérol, permettraient d'obtenir une gamme de plastiques de propriétés mécaniques et thermiques variées avec des domaines d'applications plus larges.

Enfin, une étude par modélisation moléculaire nous renseigne sur l'organisation tridimensionnelle des xylanes à l'état natif et des xylanes substitués par les chaînes grasses, dans l'état amorphe. Elle démontre que les chaînes grasses renforcent la flexibilité des chaînes de xylane, leur conférant ainsi des propriétés plastiques.



# Conclusion générale



# Conclusion générale

---

Le travail présenté apporte d'une part des données concernant l'extraction et l'analyse structurale des xylanes du bois, et d'autre part propose une nouvelle voie de valorisation chimique pour les déchets de la filière bois.

Notre étude est construite autour de deux objectifs complémentaires :

- établir un état des lieux bibliographique sur les xylanes, et apporter une contribution aux méthodes d'extraction et de caractérisation structurale des glucuronoxylanes du bois,
- et obtenir par greffage des xylanes une nouvelle famille de bioplastiques à partir de ces polysaccharides.

La première partie de notre travail a permis dans un premier temps d'établir la composition chimique de sciures d'essences diverses, en extrayant de manière séquentielle et sélective les constituants du bois. Nous avons alors choisi de concentrer notre travail sur les sciures de châtaignier, puisque celles-ci permettent d'extraire des xylanes très purs, en quantité. Après un travail d'optimisation des conditions d'extraction, nous proposons un protocole simple à mettre en œuvre, dont le nombre d'étapes est limité, et qui permet de recueillir la quasi totalité des xylanes présents (19% de la masse sèche de bois). L'étape de délignification s'est révélée indispensable pour optimiser les rendements d'extraction. L'analyse de composition a montré, grâce à l'identification de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, qu'il s'agit de 4-*O*-méthylglucuronoxylanes, typiques des bois de feuillus. Nous proposons un modèle structural de ces molécules, constitué d'une chaîne principale d'unités xylose substituée par l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, avec en moyenne une unité d'acide uronique pour six unités xylose, soit un polysaccharide acide. Les xylanes du bois de châtaignier sont donc présents en quantité, facilement extractibles et homogènes en composition. Ils nous ont donc paru être de bons candidats pour servir de support chimique à l'élaboration de matériaux plastiques.

Ce projet qui s'inscrit dans une perspective de valorisation des co-produits forestiers a pour vocation de déboucher vers une application industrielle. C'est pourquoi, après avoir montré que les xylanes pouvaient être transformés en matériaux plastiques par greffage de chaînes grasses, nous avons mené une étude à caractère plus technologique dans cette seconde partie, visant à maîtriser les caractéristiques des plastiques formés. L'optimisation du procédé de transformation des xylanes passe par la compréhension des mécanismes chimiques mis en jeu et par la définition des paramètres influents de la réaction. Les outils mis en œuvre ont permis de modéliser l'influence de chacun des paramètres et de leurs interactions sur les caractéristiques physico-chimiques des plastiques obtenus. La température et le temps de réaction sont les facteurs déterminants et doivent être parfaitement contrôlés pour obtenir des plastiques de DS variés avec un gain de poids optimum. L'étude des propriétés mécaniques et thermiques de ces matériaux a mis en évidence leur caractère thermoplastique, et a permis d'en préciser leurs caractéristiques par rapport aux plastiques usuels. Les esters de xylanes sont comparables en terme de propriétés mécaniques et thermomécaniques à l'acétate de cellulose, ce qui laisse envisager de nombreuses applications.

La modélisation moléculaire permet elle aussi la détermination de nombreuses propriétés des polymères, parmi lesquelles la température de transition vitreuse et les propriétés mécaniques, ainsi que la simulation de spectres d'absorption infrarouge et la simulation des paramètres RMN (Soldera, 2003). La détermination de la température de transition vitreuse qui sépare le domaine vitreux de la phase amorphe, est basée sur la variation du volume spécifique du matériau en fonction de la température. Le volume spécifique varie de manière linéaire dans les deux phases, mais, compte-tenu du fait que les coefficients d'expansion thermiques sont différents dans les deux phases, la  $T_g$  est obtenue à l'intersection de deux droites (Mazeau et Heux, 2003). Les propriétés mécaniques, quant à elles, peuvent être déterminées par différentes méthodes. La méthode de Brown et Clarke (1991), par exemple, consiste à réaliser des simulations de dynamique moléculaire à contrainte constante pour prévoir le comportement en contrainte-déformation. La poursuite de ce travail pourrait permettre de déterminer les paramètres caractéristiques des plastiques (température de transition vitreuse et les propriétés mécaniques) en fonction de leur degré de substitution, de les confronter aux données expérimentales et enfin de concevoir de nouveaux polymères avec un cahier des charges clairement établi en terme de propriétés physico-chimiques. Il sera également nécessaire par la suite de se rapprocher d'un modèle plus juste

du xylane natif, notamment en y introduisant les unités d'acide 4-*O*-méthylglucuronique qui substituent la chaîne principale. La modélisation de polymères modifiés de DS intermédiaires est à finaliser afin de mieux comprendre l'évolution des propriétés qui définissent nos matériaux.

Sur le plan fondamental, quelques questions restent en suspens sur la structure des xylanes de châtaignier, notamment la répartition des acides uroniques sur la chaîne de xylane ainsi qu'une estimation de la masse molaire de ces molécules. Des techniques comme la spectrométrie de masse, encore peu répandue pour l'analyse des polysaccharides, devrait permettre de compléter le modèle structural des xylanes étudiés. Ces informations, couplée à une étude plus approfondie par modélisation moléculaire devrait permettre de mieux appréhender le comportement physico-chimique de ces polysaccharides et donc d'envisager de nouvelles voies de transformation de ces molécules.

Sur le plan appliqué, il semble opportun de caractériser de manière plus complète les esters de xylanes, en prenant en compte d'autres caractéristiques nécessaires pour envisager une application industrielle, telles que la résistance à certains agents chimiques, aux radiations, mais aussi le caractère hydrophobe, la perméabilité aux gaz, etc... Enfin une étude de biodégradabilité de ces matériaux doit être menée.

Pour conclure, ce travail propose une réponse originale au problème de valorisation des déchets de la filière bois. Le développement de ce projet nécessite une approche pluridisciplinaire basée sur la chimie du bois, à l'interface avec la chimie des sucres et la chimie des matériaux.



# Chapitre IV

## Partie expérimentale





# Chapitre IV : Partie expérimentale

## IV.1. Matériel et procédures analytiques

### IV.1.1. Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et solvants utilisés sont présentés dans le tableau suivant :

Réactifs et solvants	CAS [Reg. Num.]	Pureté	M (g/mol)	Fournisseur
Acétate d'éthyle	[141-78-6]			SDS
Acide acétique	[64-19-7]	99-100%	60,05	Fisher Labosi
Acide chlorhydrique	[7647-01-0]	37%	36,46	Fisher Labosi
Bromure de sodium	[7647-15-6]	99+%	102,90	Aldrich
Chloroforme	[67-66-3]	99,9%		SDS
Chlorure d'acide laurique	[112-16-3]	98%	218,76	Acros
Chlorure de benzoyle	[98-88-4]	99%	140,57	Aldrich
Diméthylformamide	[68-12-2]	99,8%		Aldrich
DMAP	[1122-58-3]	99%	122,17	Acros
Hydroxyde de sodium	[1310-73-2]		40,00	Acros
Hypochlorite de sodium	[7681-52-9]		74,44	Acros
Iodométhane	[74-88-4]		141,94	Merck
LiCl	[7447-41-8]	99%	42,38	Acros
Méthanol	[67-56-1]	99,99%		Fisher
Méthanolate de sodium 0,5M (conservé à 4°C)	[124-41-4]		54,02	Acros
Méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranose	[97-30-3]		194,18	Sigma
MgSO <sub>4</sub>	[7487-88-9]	99%	120,36	SDS
NaHCO <sub>3</sub>	[144-55-8]	99%	84,00	Acros
Oxyde d'argent	[20667-12-3]	99+%	231,74	Acros
Pyridine	[110-86-1]	99,8%		Aldrich
TEMPO (conservé à 4°C)	[2564-83-2]	98%	156,25	Aldrich
Toluène	[108-88-3]			SDS

Les solvants techniques utilisés, méthanol (Fisher, 99,99%), chloroforme (SDS, 99,9%), DMA (Aldrich, 99%) ont été utilisés sans purification supplémentaire.

## **IV.1.2. Analyses**

### ***IV.1.2.a. Spectroscopie infra-rouge***

Les produits obtenus ont été soumis à une analyse par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier. Les spectres infra-rouge ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 1310 pour une gamme de fréquences comprises entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ , sur des échantillons conditionnés en pastilles de KBr. Les nombres d'ondes sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ .

### ***IV.1.2.b. Spectroscopie RMN***

Les analyses RMN ont été réalisées au service commun de RMN de l'Université de Limoges sur un appareil Bruker DPX-400 à une fréquence de 400,13 MHz pour le proton et 100,62 MHz pour le carbone 13. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm par rapport au triméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. Les abréviations retenues sont : s (singulet), sél. (singulet élargi), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), dt (double triplet), tap (triplet apparent), dtap (double triplet apparent), ddd (double double doublet), m (multiplet).

### ***IV.1.2.c. Pouvoirs rotatoires***

Les pouvoirs rotatoires  $[\alpha]_D$  sont mesurés avec un polarimètre Jasco DIP-370 pour la raie D du sodium et dans une cuve de 10 cm de longueur. Ces mesures sont effectuées à 22°C en solution.

### ***IV.1.2.d. Spectroscopie UltraViolet-Visible***

Les mesures sont réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible à double faisceau Perkin Elmer Lambda 25 piloté par le logiciel UVWinlab. Elles sont effectuées dans des cellules en copolymère acrylique (PMMA) de 1 cm de trajet optique.

### ***IV.1.2.e. Spectrométrie de masse MALDI***

Les spectres de masse MALDI des oligosaccharides issus de l'hydrolyse acide et de l'hydrolyse enzymatique ont été effectués au Laboratoire de Glycobiologie Structurale et

Fonctionnelle de l'Université de Lille (UMR 8576 CNRS) avec un spectromètre Vision 2000 Finnigan Instrument dont le laser émet dans l'UV à 337 nm ; dans le cas des oligosaccharides, la matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB). Les spectres de masse MALDI des oligosaccharides issus de l'autohydrolyse ont été réalisés au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) de l'Université de Rennes sur un spectromètre Ultraflex MALDI-TOF/TOF de la société Bruker Daltonics, en utilisant le DHB comme matrice.

#### ***IV.1.2.f. Spectrométrie de masse Haute Résolution***

Les spectres de masse Haute Résolution ont été réalisés sur un appareil ZABSpec. TOF de Micromass possédant une géométrie EBE TOF au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) de l'Université de Rennes. Les spectres de masse ont été réalisés en électronebulisation (ESI) en mode positif avec le méthanol comme solvant. Les ions sont accélérés avec une tension de 4000 V. La détermination des masses précises est réalisée par balayage du champ électrique en utilisant les ions du polyéthylène glycol (PEG) comme référence interne. La précision obtenue est inférieure à 5 ppm.

#### ***IV.1.2.g. Analyse en CPG/SM***

Le système de couplage CPG/SM est composé d'un chromatographe Fison Instrument GC 8060 muni d'une colonne capillaire PTE-5 (0,32 mm x 30 m ; Supelco) couplé à un spectromètre de masse Fison Instrument MD 800. Le gaz vecteur utilisé en CPG est de l'hélium. Le spectromètre est utilisé en mode impact électronique (IE). L'élévation de la température du four est programmée de 80 (pallier de 2 min) à 235°C à raison de 15°C.min<sup>-1</sup> (pallier de 10 min).

### **IV.1.3. Chromatographie**

#### ***IV.1.3.a. Chromatographie sur couche mince (CCM)***

Des plaques de silice Kieselgel 60F<sub>254</sub> de 0,2 mm d'épaisseur (Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince en phase normale. La révélation des plaques est réalisée :

- par observation sous une lampe UV pour les composés aromatiques.

- par pulvérisation à l'orcinol sulfurique (0,1% d'orcinol dans de l'acide sulfurique à 20%), suivie d'un chauffage à 100°C dans le cas des composés glycosylés.

Dans le cas des oligosaccharides, une double migration est effectuée dans le solvant n-butanol/acide acétique/eau 2/1/1 puis on révèle les sucres par pulvérisation à l'orcinol sulfurique et passage à l'étuve à 100°C.

#### ***IV.1.3.b. Chromatographie préparative sur plaques de silice***

Les plaques de silice sont préparées par dépôt d'une couche uniforme de silice de 2 mm d'épaisseur (Kieselgel 60F<sub>254</sub>, Merck) sur des plaques de verre (20 cm x 20 cm) que l'on active, après séchage, à 100°C durant deux heures.

#### ***IV.1.3.c. Chromatographie préparative sur colonne***

Pour les séparations par chromatographie sur colonne, nous avons utilisé de la silice 60 ACC, 20-40 µm provenant de SDS. Les colonnes sont équilibrées dans le système d'élution. La quantité de support utilisée est calculée afin que le produit à chromatographier n'excède pas 1 à 2% en masse du système. Tous les composés à purifier sont dissous dans un minimum d'éluant, puis sont introduits en tête de colonne. L'élution se fait sous pression d'air. L'éluant est ensuite fractionné afin de récupérer le produit pur souhaité.

## **IV.2. Protocoles d'extraction des xylanes**

### **IV.2.1. Matériel biologique**

Les sciures utilisées sont issues de quatre essences d'intérêt régional et appartiennent aux deux catégories d'arbres : les feuillus et les résineux :

- Les sciures de chêne (*Quercus robur*) et de châtaignier (*Castanea sativa*) ont été fournies par l'établissement Mazières de la Chapelle Montbrandeix (87).

- Les sciures d'épicéa (*Picea abies*) et de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) proviennent de l'établissement Moreau de Sauviat-sur-Vige (87).

Les sciures de châtaignier ont été séchées à l'étuve à 50°C pendant trois jours, avant d'être broyées et tamisées (taille < 500 µm) afin de faciliter l'extractibilité des hémicelluloses.

### **IV.2.2. Protocole d'extraction standard des hémicelluloses pour différentes espèces forestières**

La procédure adoptée repose sur l'extraction séquentielle des différentes catégories de molécules constituant la paroi. Quatre séries d'extractions identiques ont été effectuées à partir de 30 g de différents types de sciures (châtaignier, chêne, épicéa, Douglas). Les volumes d'extractants utilisés ont été fixés à 400 mL pour toutes les extractions.

#### ***IV.2.2.a. Extraction à l'éthanol***

La première étape permet, après deux extractions à l'éthanol à 80% pendant 20 min à 80°C, d'éliminer les petites molécules tels que les sucres circulants et une grande partie des tannins. Après chaque extraction, le résidu est filtré sur verre fritté (porosité 3) et rincé à l'eau distillée.

#### ***IV.2.2.b. Extraction des pectines***

L'extraction sélective des pectines à partir du résidu précédent débute par l'eau chaude (90°C) pendant 20 min et se poursuit, après filtration et élimination du filtrat, par une solution aqueuse d'oxalate d'ammonium à 1%, à pH 5, à 85°C pendant 2 h.

#### ***IV.2.2.c. Délignification***

La méthode utilise une solution tamponnée de chlorite de sodium  $\text{NaClO}_2$  (0,47 g /g de matière sèche) dans l'acide acétique (0,2 mL /g de matière sèche) à 80 °C pendant une heure. Après filtration, le surnageant est éliminé et la procédure est répétée. Le résidu est ensuite filtré et lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralisation.

#### ***IV.2.2.d. Extraction des hémicelluloses***

Les hémicelluloses sont, par la suite, extraites selon leur solubilité, par des solutions alcalines de concentrations croissantes : KOH 0,43M (1h, température ambiante), KOH 4,3M (1h, température ambiante), NaOH 4,3 M (16 h, température ambiante). Chaque solution de potasse ou de soude est préalablement additionnée de borohydrure de sodium, agent réducteur, à la concentration de 3 mg.mL<sup>-1</sup>. Toutes ces extractions ont lieu sous agitation et sous azote. Le résidu cellulosique est enfin obtenu après passage du résidu précédent dans la soude 4,3 M, 1 h, à reflux.

Après chaque extraction, on sépare le résidu du surnageant par centrifugation. Les surnageants sont neutralisés par l'acide acétique glacial ; les polymères qui précipitent au cours de cette étape de neutralisation sont séparés des hémicelluloses restantes en solution par centrifugation. Ces hémicelluloses solubles sont précipitées par addition de trois volumes d'éthanol absolu. Les fractions hémicellulosiques sont ensuite placées en dialyse (seuil de coupure = 6-8000 Da, Spectrapor) contre de l'eau distillée avant d'être lyophilisées. Après chaque étape d'extraction, les résidus sont rincés à l'eau distillée et un aliquot est prélevé pour une analyse ultérieure de composition monosaccharidique par CPG.

#### **IV.2.3. Extraction des xylanes à partir de sciures de châtaignier**

Ces protocoles d'extraction ont été réalisés sur des fractions de 10 g de sciures de châtaignier.

#### ***IV.2.3.a. Extraction à l'éthanol***

Un traitement des sciures par 500 mL d'éthanol à 80% au soxhlet (7h) a été réalisé afin d'extraire les sucres circulants (glucose, fructose, saccharose) et les tannins. Le résidu est récupéré par filtration sur verre fritté.

#### ***IV.2.3.b. Extraction des pectines***

Les pectines sont ensuite éliminées du résidu par une extraction par 500 mL d'une solution d'oxalate d'ammonium à 1 % (chélateur de calcium), à pH=5 (2 h à reflux). Le mélange est filtré sur verre fritté puis séché à l'étuve à 40°C.

#### ***IV.2.3.c. Délignification***

Le mode opératoire est le même que celui décrit précédemment (page 223).

#### ***IV.2.3.d. Extraction des xylanes***

Les procédés d'extraction reposent sur un traitement alcalin du résidu précédemment obtenu. Certains échantillons bénéficient d'une étape d'imprégnation de la paroi, au cours de laquelle le résidu est mis en contact avec 500 mL d'une solution de potasse diluée KOH 0,43M, pendant 1 h. L'étape d'extraction des xylanes proprement dite est effectuée par 500 mL d'une solution de KOH 4,3M pendant 24 h. Pour chacune de ces étapes, l'ensemble est laissé à température ambiante et sous agitation.

Ces extractions par la potasse sont réalisées sous atmosphère inerte afin d'éviter tout risque de dégradation, et en présence de NaBH<sub>4</sub> (3 mg/mL). Après centrifugation, les résidus sont rincés par de l'eau distillée. Les filtrats sont neutralisés par l'acide acétique glacial, puis placés en dialyse pendant 3 jours (seuil de coupure = 6-8000 Da, Spectrapor) contre de l'eau distillée. Ensuite, les fractions hémicellulosiques sont précipitées par 3 volumes d'éthanol. Les hémicelluloses sont récupérées après centrifugation et lyophilisées. Après chaque étape d'extraction, un échantillon du résidu est prélevé pour l'analyse de composition monosaccharidique par TMS<sub>d</sub>.

## IV.3. Composition monosaccharidique

### IV.3.1. Détermination de la composition monosaccharidique par CPG

Le principe de cette méthode repose sur l'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés par méthanolyse suivie d'une *per*triméthylsilylation des monosaccharides libérés.

#### *IV.3.1.a. Préparation des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés*

Les monosaccharides neutres et les acides uroniques sont identifiés et analysés sous forme de méthylglycosides *O*-triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling et *coll.* (1975) modifiée par Montreuil et *coll.* (1986). 200 à 500 µg de polysaccharides, auxquels on ajoute un témoin interne, le méso-inositol (MI), à raison de 50% de la quantité de polysaccharide, sont traités. Cette analyse, qui a été adaptée à l'analyse de poudres d'origine végétale par Marga et *coll.* (1995), a été également utilisée pour l'étude de la composition monosaccharidique des sciures brutes et des résidus d'extraction.

#### *i. Méthanolyse*

Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides par ajout de 1 mL de méthanol chlorhydrique 1M (Instant methanolic HCl, Alltech) à l'échantillon polysaccharidique anhydre. Après 24h à 80°C dans un tube scellé (SVL), la méthanolyse est stoppée par évaporation de l'hydrolysate sous un flux d'argon.

Cette étape a fait l'objet d'une optimisation pour nos produits. Dans le cadre de cette étude, après refroidissement du tube réactionnel, on neutralise le réactif d'hydrolyse par du carbonate d'argent en excès jusqu'à ce que l'effervescence due au dégagement de CO<sub>2</sub> soit terminée. La phase liquide est séparée du solide blanc (chlorure d'argent) et vert (excès de carbonate d'argent) par filtration sur laine de verre ; elle est alors séchée sous un flux d'argon.

Pour les échantillons de sciures brutes ou résidus d'extraction, la phase méthanolique est délipidée par trois lavages successifs à l'heptane (3 x 1 mL). Elle est à nouveau évaporée sous flux d'argon.



### *ii. Triméthysilylation*

Les méthylglycosides sont ensuite triméthysilylés par 100  $\mu\text{L}$  de BSTFA (N,O-bis-triméthysilyl-trifluoroacétamide) à 1% de TMCS (triméthylchlorosilane) dans la pyridine (100  $\mu\text{L}$ ), à l'obscurité pendant 2h, à température ambiante. Ces échantillons sont alors directement injectés en CPG.

#### ***IV.3.1.b. Analyse des dérivés TMS en CPG***

Les méthylglycosides triméthysilylés sont identifiés par CPG, par comparaison avec des échantillons authentiques à l'aide d'un chromatographe Perichrom PR 2100 équipé d'une colonne capillaire (0,32 mm x 50 m) CP-SIL-5CB (Chrompack) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) ; le gaz vecteur est l'azote sous pression de 75 kPa. La température de l'injecteur est fixée à 260°C. L'élévation de la température du four est programmée de 130 à 210°C à raison de 2°C.min<sup>-1</sup>, avec un pallier de 5 min à 190°C, puis de 210 à 260°C à raison de 5°C.min<sup>-1</sup>. Le chromatographe est piloté par le logiciel Winilab III (Perichrom). Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics chromatographiques par les facteurs de correction.

#### **IV.3.2. Dosages des sucres par colorimétrie**

Les dosages des sucres sont effectués avec les méthodes au phénol sulfurique (Dubois, 1956) pour les oses neutres et par celle au méta-hydroxydiphényl (m-HDP) pour les acides uroniques (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973). En raison de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres et réciproquement, il est nécessaire d'appliquer une méthode de correction, établie par Montreuil et Spik (1963) qui permet d'établir les quantités relatives d'oses neutres et d'acides uroniques.

##### ***IV.3.2.a. Dosage des oses neutres (Dubois, 1956)***

A 200  $\mu\text{L}$  de solution à doser, on ajoute 200  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de phénol à 5%. Le mélange est homogénéisé au vortex, puis 1mL d'acide sulfurique concentré est rapidement introduit dans le milieu réactionnel. Après homogénéisation, le mélange est porté au bain-marie à 100°C durant 5 minutes. Les tubes sont refroidis et placés à l'obscurité pendant 30 minutes. Une coloration jaune apparaît. La lecture des densités optiques est

réalisée à 480 nm. Les quantités de sucres en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon de xylose de concentrations 25, 50, 100 et 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### ***IV.3.2.b. Dosage des acides uroniques (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973)***

A 200  $\mu\text{L}$  de solution à doser, on ajoute 1,2 mL d'une solution de tétraborate de sodium à 0,125 M dans l'acide sulfurique concentré. Le mélange est homogénéisé au vortex, et réfrigéré dans la glace. Les tubes sont ensuite portés à 100°C au bain-marie durant 5 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, on ajoute 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de m-HDP (méta-hydroxydiphényle) à 0,15% dans une solution aqueuse de soude à 0,5%. Les tubes sont agités. Une coloration rose se développe pendant 5 minutes. La lecture des densités optiques est réalisée à 520 nm. Les quantités de sucres en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon d'acide glucuronique de concentrations 25, 50, 100 et 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### ***IV.3.2.c. Dosages des sucres réducteurs (Lever, 1972)***

A 250  $\mu\text{L}$  de solution à doser, on ajoute 750  $\mu\text{L}$  d'une solution de PAHBAH (acide hydrazide para-hydroxybenzoïque) à 5 % dans HCl 0,5 M, fraîchement dilué au 1/5 par NaOH 0,5 M. Le mélange est homogénéisé au vortex et porté à 100°C au bain-marie durant 5 minutes, puis refroidi. La lecture des densités optiques est réalisée à 410 nm. Les quantités de sucres réducteurs en solution peuvent être établies en comparaison avec une gamme étalon de xylose de concentrations 10, 20, 30 et 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## **IV.4. Méthodes d'analyses des oligosaccharides et polysaccharides**

### **IV.4.1. Répartition en masses des polysaccharides**

Les extraits hémicellulosiques majoritaires en masse sont soumis à une étape de purification par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de gel Sépharose CL-4B (Pharmacia, 70 x 3 cm) équilibrée dans l'eau distillée.

Environ 10 mL de solution aqueuse de polysaccharides (15 à 20 mg) sont déposés sur la colonne. Le débit est maintenu constant à 15 mL.h<sup>-1</sup> à l'aide d'une pompe péristaltique Pharmacia LKB P-1. Des fractions de 3 mL sont collectées et le suivi de l'élution est réalisé par dosage des sucres totaux (Dubois, 1956).

### **IV.4.2. Hydrolyse des xylanes**

Au cours de cette étude, le substrat utilisé est un xylane extrait du hêtre, d'origine commerciale (SIGMA).

#### ***IV.4.2.a. Hydrolyse enzymatique***

Une endo-β-1,4-xylanase (EC 3.2.1.8) de grade industriel, isolée d'*Aspergillus niger*, (Xylulyve AN, Lyven) a été utilisée.

##### ***i. Protocole***

On prépare une solution à 1 mg.mL<sup>-1</sup> de xylane et 0,25% (m:v) d'enzyme dans l'eau. L'hydrolyse est réalisée dans un erlenmeyer, sous agitation, dans un bain-marie thermostaté à 40°C. Le milieu réactionnel est inactivé à chaud, puis après refroidissement, 3 volumes d'éthanol sont ajoutés pour précipiter la fraction polymérique non dégradée. Après filtration, la fraction oligosaccharidique (le filtrat) est concentrée.

##### ***ii. Séparation des oligosaccharides***

L'hydrolysate est ensuite déposé sur colonne d'exclusion stérique de Biogel P2 (180-2000 Da ; Biorad), l'éluant utilisé étant une solution de NaCl 50 mM à un débit de 10 mL.h<sup>-1</sup>. L'élution des oligosaccharides est suivie par CCM.

#### ***IV.4.2.b. Hydrolyse acide***

##### ***i. Protocole***

100 mg de xylane sont introduits dans un flacon hermétique (SVL), ainsi que 20 mL d'acide sulfurique 50 mM. Le flacon est placé à l'étuve à 100°C pendant deux heures. Après refroidissement, l'hydrolysate est neutralisé par la soude 4 M, et on précipite la fraction macromoléculaire non dégradée par ajout de 3 volumes d'éthanol. Après filtration, l'hydrolysate est concentré par évaporation sous vide.

##### ***ii. Séparation des oligosaccharides***

La fraction oligosaccharidique ainsi obtenue est séparée sur colonne de Biogel P2 (180-2000 Da ; Biorad) équilibrée dans une solution de NaCl 50 mM avec un débit de 10 mL.h<sup>-1</sup>.

#### ***IV.4.2.c. Autohydrolyse***

##### ***i. Protocole (adapté de Cescutti et coll., 1999)***

Une solution aqueuse de xylane (2 mg.mL<sup>-1</sup>), préalablement convertie sous sa forme acide après passage sur résine Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>), conditionnée en milieu acide, est soumise à une autohydrolyse. Pour cela la solution est placée dans un flacon hermétique à l'étuve pendant 24 h à 100°C. Après refroidissement, la fraction polymérique non dégradée est précipitée par 3 volumes d'éthanol et éliminée par filtration. La fraction oligosaccharidique est concentrée par évaporation sous vide.

##### ***ii. Séparation des oligosaccharides***

Les produits de l'hydrolyse sont séparés par chromatographie d'échange d'anions sur colonne Dowex 1x2 par un gradient de formiate d'ammonium 0,05 M à 0,5 M. Les oligosaccharides sont ensuite purifiés sur colonne de Biogel P4 (800- 4000 Da ; Biorad), équilibrée dans une solution de NaCl 50 mM à un débit de 10 mL.h<sup>-1</sup>.

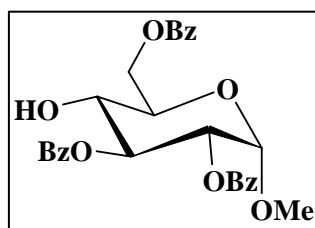
#### **IV.4.3. Purification des oligosaccharides**

Les oligosaccharides sont déssalés sur colonne de Biogel P2 (180-2000 Da ; Biorad) équilibrée dans l'eau distillée, puis lyophilisés.

## IV.5. Synthèse de l'acide 4-O-méthylglucuronique

### IV.5.1. Synthèses et caractérisation des produits

#### IV.5.1.a. méthyl-2,3,6-tri-O-benzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (**1a**)



Le méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (1g, 5,1 mmol) est dissous dans 40 mL de pyridine anhydre. Le chlorure de benzoyle (1,8 mL, 15,9 mmol, 3,1 éq.) est ensuite introduit goutte à goutte. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante et sous argon. Après 1h30 de réaction, on évapore la pyridine, puis le résidu est dissous dans 50 mL de chloroforme et lavé successivement par 30 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,1 M, 30 mL d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> et par l'eau (2 x 30 mL). Après séchage sur MgSO<sub>4</sub>, filtration et évaporation sous vide, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant toluène/EtOAc 100/0 à 95/5), et sur plaques préparatives de silice (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc 90/10). Le composé **1** est obtenu sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 54% (1,41 g).

R<sub>f</sub> = 0,53 (CHCl<sub>3</sub>/EtOH 98/2)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: + 133,9° (C=1,25, CHCl<sub>3</sub>) ; litt. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: + 147,8° (C = 0,5, CHCl<sub>3</sub>)

IR  $\nu$ (cm<sup>-1</sup>) : 3475 (OH), 2900, 1715 (C=O), 1600, 1448, 1269, 1100, 1067, 1025, 754, 708.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)  $\delta$  en ppm (*J* en Hz), 3,32 (d, 1H, *J*<sub>OH,4</sub> = 4,7 ; O-H), 3,46 (s, 3H ; 1-OCH<sub>3</sub>), 3,87 (td, 1H, *J*<sub>4,OH</sub> = 4,7 - *J*<sub>4,3</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 9,5 ; H<sub>4</sub>), 4,12 (ddd, 1H, *J*<sub>5,6a</sub> = 2,2 - *J*<sub>5,6b</sub> = 4,4 - *J*<sub>5,4</sub> = 9,9 ; H<sub>5</sub>), 4,63 (dd, 1H, *J*<sub>6a,5</sub> = 2,2 - *J*<sub>6a,6b</sub> = 12,1 ; H<sub>6a</sub>), 4,80 (dd, 1H, *J*<sub>6b,5</sub> = 4,5 - *J*<sub>6b,6a</sub> = 12,1 ; H<sub>6b</sub>), 5,14 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 3,6 ; H<sub>1</sub>), 5,27 (dd, 1H, *J*<sub>2,1</sub> = 3,6 - *J*<sub>2,3</sub> = 10,2 ; H<sub>2</sub>), 5,77 (t, 1H, *J*<sub>3,2</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9,7 ; H<sub>3</sub>), 7,34-7,61 (m, 9H ; Bz), 7,96-8,11 (m, 6H ; Bz).

Au cours de cette synthèse, les produits **1b**, le 2,4,6-tri-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside et **1c**, le 2,3,4,6-tétra-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ont été également isolés et caractérisés par RMN  $^1\text{H}$ .

*i. méthyl-2,4,6-tri-O-benzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (1b)*

Rendement : 20%

R<sub>f</sub> = 0,60 (CHCl<sub>3</sub>/EtOH 98/2)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)  $\delta$  en ppm (*J* en Hz), 2,59 (d, 1H,  $J_{\text{OH},3} = 5,3$  ; O-H), 3,45 (s, 3H, 1-OCH<sub>3</sub>), 4,31 (ddd, 1H,  $J_{5,6a} = 2,6 - J_{5,6b} = 5,3 - J_{5,4} = 8,1$  ; H<sub>5</sub>), 4,44 (dd, 1H,  $J_{6a,5} = 5,4 - J_{6b,6a} = 11,8$  ; H<sub>6a</sub>), 4,45 (m, 1H ; H<sub>3</sub>), 4,61 (dd, 1H,  $J_{6b,5} = 2,7 - J_{6b,6a} = 12,1$  ; H<sub>6b</sub>), 5,11 (m, 2H, H<sub>1</sub> ; H<sub>2</sub>), 5,38 (t, 1H,  $J_{4,5} = J_{4,3} = 9,8$  ; H<sub>4</sub>), 7,39 – 7,60 (m, 9H ; Bz), 8,02 – 8,10 (m, 6H ; Bz).

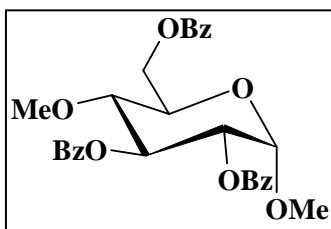
*ii. méthyl-2,3,4,6-tétra-O-benzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranose (1c)*

Rendement : 4,5%

R<sub>f</sub> = 0,73 (CHCl<sub>3</sub>/EtOH 98/2)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)  $\delta$  en ppm (*J* en Hz), 3,49 (s, 3H ; 1-OCH<sub>3</sub>), 4,42 (ddd, 1H,  $J_{5,6a} = 2,7 - J_{5,6b} = 5,1 - J_{5,4} = 8,2$  ; H<sub>5</sub>), 4,49 (dd, 1H,  $J_{6b,5} = 5,3 - J_{6b,6a} = 12,0$  ; H<sub>6b</sub>), 4,61 (dd, 1H,  $J_{6a,5} = 2,8 - J_{6b,6a} = 12,0$  ; H<sub>6a</sub>), 5,25 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3,6$  ; H<sub>1</sub>), 5,30 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 3,6 - J_{2,3} = 10,2$  ; H<sub>2</sub>), 5,69 (t, 1H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9,8$  ; H<sub>3</sub>), 6,19 (t, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9,9$  ; H<sub>4</sub>), 7,26-7,57 (m, 12H ; Bz), 7,86 – 8,05 (m, 8H ; Bz).

**IV.5.1.b. méthyl-4-O-méthyl-2,3,6-O-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (2)**



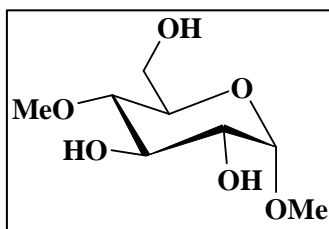
Par réaction de 160 mg de méthyl-2,3,6-tri-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranose **1a** (0,32 mmol, 1 éq.) et 100  $\mu$ L d'iodométhane (1,6 mmol, 5éq.) dans 1,22 mL de DMF anhydre en présence d'oxyde d'argent (370 mg, 1,6 mmol, 5 éq.), on obtient après 5 h à température ambiante, sous atmosphère d'argon et à l'abris de la lumière, un mélange auquel on ajoute 10 mL de chloroforme. Après filtration et rinçages au chloroforme, cette phase organique est lavée à l'eau (4 x 30 mL), séchée sur  $MgSO_4$ , filtrée et évaporée sous vide. Le brut est alors purifié par chromatographie sur plaques préparatives de silice (éluant  $CHCl_3/EtOAc$  90/10) et on isole 82 mg de composé **2** (50%) sous forme d'une mousse.

$R_f = 0,34$  ( $CHCl_3/EtOAc$  95/5)

IR  $\nu$ ( $cm^{-1}$ ) : 2900, 1724 (C=O), 1600, 1451, 1271, 1110, 1070, 1027, 709.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , 25°C)  $\delta$  en ppm ( $J$  en Hz), 3,44 (s, 3H ; 4-*O*- $CH_3$ ), 3,45 (s, 3H ; 1- $OCH_3$ ), 3,64 (t, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9,6$  ;  $H_4$ ), 4,13 (ddd, 1H,  $J_{5,6a} = 2,3 - J_{5,6b} = 4,4 - J_{5,4} = 7,0$  ;  $H_5$ ), 4,61 (dd, 1H,  $J_{6b,5} = 4,6 - J_{6a,6b} = 12,0$  ;  $H_{6b}$ ), 4,66 (dd, 1H,  $J_{6a,5} = 2,3 - J_{6b,6a} = 12,0$  ;  $H_{6a}$ ), 5,13 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3,6$  ;  $H_1$ ), 5,17 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 3,7 - J_{2,3} = 10,1$  ;  $H_2$ ), 5,99 (t, 1H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9,8$  ;  $H_3$ ), 7,36 - 7,60 (m, 9H ; Bz), 7,96 - 8,12 (m, 6H ; Bz).

#### IV.5.1.c. méthyl-4-*O*-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (3)



300 mg de méthyl-4-*O*-méthyl-2,3,6-*O*-tribenzoyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside **2** (0,57 mmol, 1 équ.) sont dissous dans 3 mL de méthanol ; on ajoute alors 5,7 mL (2,85 mmol, 5 équ.) de solution méthanolique de méthylate de sodium (0,5 M). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant 1h30 puis on ajoute 10 mL de méthanol au brut réactionnel. La solution est alors neutralisée à l'aide d'une résine H<sup>+</sup>, filtrée, puis le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le benzoate de méthyle est éliminé par ajouts d'eau et évaporations successives (entraînement à la vapeur). Le produit **3** est alors directement obtenu avec un rendement de 99% (118 mg) sous forme d'une huile.

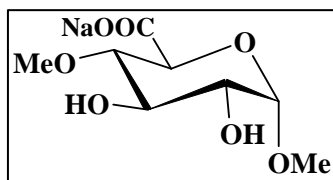
R<sub>f</sub> = 0,34 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 6/1)

IR  $\nu(\text{cm}^{-1})$  : 3387 (OH), 2937, 2842, 1641, 1450, 1193, 1146, 1121, 1072, 1034, 960, 895, 710.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C)  $\delta$  en ppm (*J* en Hz), 3,06 (t, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9,1$  ; H<sub>4</sub>), 3,38 (s, 3H ; 4-OCH<sub>3</sub>), 3,39 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 3,9 - J_{2,3} = 9,5$  ; H<sub>2</sub>), 3,48 (ddd, 1H,  $J_{5,6a} = 2,1 - J_{5,6b} = 4,7 - J_{5,4} = 10,0$  ; H<sub>5</sub>), 3,54 (s, 3H ; 1-OCH<sub>3</sub>), 3,66 (dd, 1H,  $J_{6b,5} = 4,7 - J_{6b,6a} = 11,9$  ; H<sub>6b</sub>), 3,68 (t, 1H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9,4$  ; H<sub>3</sub>), 3,75 (dd, 1H,  $J_{6a,5} = 2,1 - J_{6a,6b} = 11,8$  ; H<sub>6a</sub>), 4,64 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3,7$  ; H<sub>1</sub>).



**IV.5.1.d. Sel de sodium de l'acide méthyl-4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosiduronique (4)**



Dans un bicol de 50 mL, on introduit 300 mg de méthyl-4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside **3** (1,45 mmol, 1 éq.), 15 mL d'eau, 75 mg de NaBr (0,72 mmol, 0,5 éq.), et 3 mg de TEMPO (0,014 mmol, 0,01 éq.). Le mélange réactionnel est maintenu à 0°C, et agité sous argon. On ajoute alors goutte à goutte 4,3 mL d'une solution d'hypochlorite de sodium à 5% (3,18 mmol, 2,2 éq.) dont le pH est préalablement ajusté à 10-11 par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M. Le pH du mélange est contrôlé au pH-mètre et maintenu à 10-11 tout le long de la réaction, par addition goutte à goutte d'une solution aqueuse de soude 0,5 M. Au bout d'une heure, la réaction est stoppée par ajout de méthanol (10 mL) et le solvant est évaporé sous pression réduite. Après chromatographie sur colonne de Biogel P2, le composé **4** sous forme d'une mousse blanche est obtenu avec un rendement de 90%.

$R_f = 0,33$  (Butanol/acide acétique/eau 2/1/1)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 25°C)  $\delta$  en ppm ( $J$  en Hz), 3,28 (t, 1H,  $J_{4,3} = J_{4,5} = 9,3$  ; H<sub>4</sub>), 3,43 (s, 3H ; 4-OCH<sub>3</sub>), 3,65 (dd, 1H,  $J_{2,1} = 3,7 - J_{2,3} = 9,8$  ; H<sub>2</sub>), 3,50 (s, 3H ; 1-OCH<sub>3</sub>), 3,70 (t, 1H,  $J_{3,2} = J_{3,4} = 9,6$  ; H<sub>3</sub>), 3,90 (d, 1H,  $J_{5,4} = 9,9$  ; H<sub>5</sub>), 4,81 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3,8$  ; H<sub>1</sub>);

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  en ppm, 55,1 (O<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>), 59,8 (O<sub>1</sub>-CH<sub>3</sub>), 71,1 (C<sub>2</sub>), 71,9 (C<sub>5</sub>), 72,4 (C<sub>3</sub>), 82,3 (C<sub>4</sub>), 99,2 (C<sub>1</sub>), 176,4 (C=O).

SM Haute Résolution (ESI) : masse moléculaire calculée pour C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>2</sub> :  $m/z = 267,0457$ , observée :  $m/z = 267,0458$  [M+Na]<sup>+</sup>.

## **IV.6. Synthèse des esters d'hémicelluloses**

### **IV.6.1. Matériel biologique**

Les hémicelluloses utilisées pour nos essais de valorisation sont d'origine commerciale. Le 4-*O*-méthylglucuronoxylane extrait du hêtre, et le mannane extrait de *Saccharomyces cerevisiae* sont obtenus auprès de la société Sigma. L'hétéroxylane de son de maïs est produit à l'échelle semi-industrielle par la société ULICE (Riom, France).

### **IV.6.2. Solubilisation des hémicelluloses dans le système de solvant DMA/LiCl**

#### ***IV.6.2.a. 1<sup>ère</sup> méthode***

Les hémicelluloses subissent préalablement un échange de solvants dans le méthanol puis dans le DMA à froid. La solubilisation est par la suite réalisée dans le DMA à 70°C, sous agitation, en présence de quantités variables de LiCl.

#### ***IV.6.2.b. 2<sup>ème</sup> méthode***

Le xylane est tout d'abord dissous dans l'eau, à raison de 1g pour 30 mL, à chaud (80°C) pendant deux à trois heures. Un volume équivalent de DMA est alors ajouté. L'eau est ensuite évaporée progressivement à l'évaporateur rotatif. En cours d'évaporation, un volume équivalent de DMA est ajouté à deux reprises dès que la solution devient trop visqueuse. Après trois ajouts de DMA, la solution est considérée anhydre. La concentration de la solution est ajustée à 1 g / 50 mL. Afin de faciliter la dissolution complète du xylane en conditions organiques, 2% (m/v) de LiCl sont additionnés en fin de préparation.

### **IV.6.3. Préparation des esters laurique**

La réaction est effectuée dans un bicol de 250 mL équipé d'un réfrigérant et d'un agitateur mécanique. A 50 mL de la solution de xylane précédemment préparée (1 g, 7,58 mmol), sont ajoutés 1 équivalent de DMAP par fonction hydroxyle (1,85 g ; 15,2 mmol) le cas échéant, et l'acide laurique. La synthèse se déroule sous agitation, à des températures et pour des durées variables. En fin de réaction, l'ester est précipité par ajout d'un volume d'eau et de trois volumes d'éthanol. Après filtration, le solide obtenu est dissous dans environ 50 mL de chloroforme, puis précipité à nouveau par 3 volumes d'éthanol. Après filtration, le résidu recueilli est séché à l'air libre.

#### **IV.6.4. Mise en forme des films plastiques**

L'ester de xylane est dissous dans un volume minimum de chloroforme. La solution est transférée dans une boîte de pétri. Le film est finalement obtenu après évaporation du solvant à l'air libre et à température ambiante.

#### **IV.6.5. Caractérisation des esters**

##### ***IV.6.5.a. Spectroscopie infra-rouge***

L'estérification est mise en évidence par spectroscopie infra-rouge. Les spectres infra-rouge ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 1310 pour une gamme de fréquences comprises entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ , à partir d'échantillons conditionnés en pastilles de KBr. Les nombres d'ondes sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ .

Le calcul des degrés de substitution a été effectué par utilisation de la RMN  $^1\text{H}$  dans le cas des esters de xylane et de mannane et par analyse élémentaire pour les esters d'hétéroxylane.

##### ***IV.6.5.b. Degré de substitution***

###### ***i. Spectroscopie RMN***

Les analyses RMN du proton ont été réalisées au service commun de RMN de l'Université de Limoges sur un appareil Bruker DPX-400 à une fréquence de 400,13 MHz. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en ppm par rapport au triméthylsilane (TMS). Les spectres sont enregistrés dans le chloroforme deutéré. Le DS correspond au rapport des intégrations des signaux correspondant aux protons des chaînes grasses et aux protons glucidiques.

###### ***ii. Analyse élémentaire***

Les analyses élémentaires ont été fournies par le Service Régional de Microanalyse de l'Université Pierre et Marie Curie. Le principe du calcul du DS est basé sur l'établissement de l'expression du pourcentage théorique d'un élément, en fonction du DS. Cette méthode de calcul est développée par Fredon et *coll.* (2002).

## IV.7. Analyse des données

### IV.7.1. Analyse en Composantes Principales (ACP)

#### IV.7.1.a. Centrage et réduction des données brutes

En présence de grandeurs exprimées dans des unités différentes et présentant des domaines de variations différents, il est nécessaire de coder les variables. Le centrage des données pour chacune des  $p$  variables  $U_j$  est effectué par rapport à la moyenne arithmétique  $\bar{u}_j$  et la réduction utilise l'écart-type  $s(U_j)$ :

$$x_{ij} = \frac{u_{ij} - \bar{u}_j}{s(U_j)}$$

Ainsi on détermine la matrice  $X$  des données centrées réduites.

#### IV.7.1.b. Matrice des corrélations

En utilisant les coordonnées centrées réduites pour les  $N$  individus, le coefficient de corrélation linéaire  $r(U_j, U_{j'})$  entre deux variables  $U_j$  et  $U_{j'}$ , est égal à :

$$r(U_j, U_{j'}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij} x_{ij'}$$

La matrice des corrélations ( $R_i$ ), matrice symétrique d'ordre  $p$ , est alors établie par la formule :

$$R = \frac{1}{N} ({}^t X)(X)$$

Dans le cas présent, les coefficients de corrélations sont regroupés dans le tableau suivant (tableau 44):

Tableau 44 : Coefficients de corrélation.

	Qté RCOCI	Température	Temps	Qté DMAP	DS	GP
Qté RCOCI	1,00					
Température	0,162	1,00				
Temps	-0,117	0,114	1,00			
Qté DMAP	-0,047	-0,229	0,165	1,00		
DS	0,333	0,785	0,132	0,089	1,00	
GP	0,443	0,463	0,013	0,330	0,864	1,00

**IV.7.1.c. Valeurs propres et vecteurs propres associées à la matrice des corrélations**

La matrice des corrélations admet  $p$  valeurs propres  $\lambda_j$  que l'on classe par ordre décroissant (tableau 45), établies à partir de l'équation suivante :

$$\det [(R) - \lambda_j(I_p)] = 0$$

où  $(I_p)$  est la matrice unite d'ordre  $p$ .

Le vecteur propre  $(u_j)$  associé à la valeur propre  $\lambda_j$  vérifie l'équation suivante :

$$(R)(u_j) = \lambda_j(u_j)$$

Un vecteur propre permet de définir un axe. Les projections des individus sur l'axe restituent une quantité d'information proportionnelle à la valeur propre correspondante.

Tableau 45 : Valeurs propres et vecteurs propres de la matrice de corrélation.

		<b>u<sub>1</sub></b>	<b>u<sub>2</sub></b>	<b>u<sub>3</sub></b>	<b>u<sub>4</sub></b>	<b>u<sub>5</sub></b>	<b>u<sub>6</sub></b>
<b>λ<sub>1</sub></b>	2,624	0,314	-0,209	-0,510	0,723	0,270	0,044
<b>λ<sub>2</sub></b>	1,268	0,473	-0,278	0,419	-0,197	0,608	-0,340
<b>λ<sub>3</sub></b>	1,108	0,071	0,472	0,631	0,598	-0,114	-0,059
<b>λ<sub>4</sub></b>	0,727	0,077	0,790	-0,312	-0,207	0,477	0,050
<b>λ<sub>5</sub></b>	0,239	0,598	0,004	0,118	-0,157	-0,173	0,757
<b>λ<sub>6</sub></b>	0,034	0,555	0,181	-0,233	-0,119	-0,535	-0,551

**Valeurs propres**

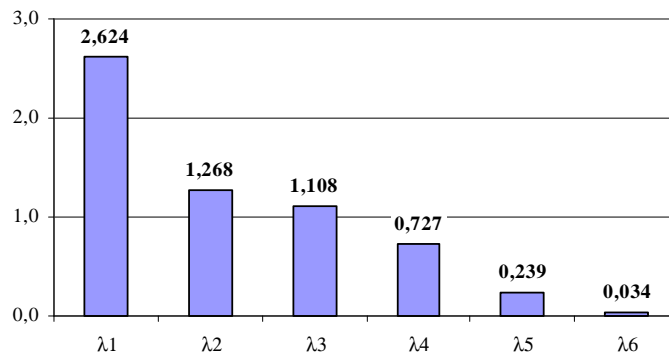


Figure 107 : Décroissance des valeurs propres.

Tableau 46 : Coefficients de corrélation entre les CP<sub>k</sub> et les variables initiales.

	CP <sub>1</sub>	CP <sub>2</sub>	CP <sub>3</sub>	CP <sub>4</sub>	CP <sub>5</sub>	CP <sub>6</sub>
X <sub>1</sub>	0,509	-0,236	0,537	-0,616	-0,132	0,008
X <sub>2</sub>	0,766	-0,313	-0,441	0,168	-0,297	-0,063
X <sub>3</sub>	0,115	0,531	-0,665	-0,510	0,056	-0,011
X <sub>4</sub>	0,124	0,889	0,329	0,176	-0,233	0,009
X <sub>5</sub>	0,969	0,005	-0,124	0,134	0,085	0,140
X <sub>6</sub>	0,899	0,204	0,245	0,102	0,262	-0,102

#### IV.7.1.d. Calcul des composantes principales

Les composantes principales (tableau 47) sont les nouvelles variables dont les valeurs correspondent aux coordonnées des projections des individus  $i$  sur les nouveaux axes définis à partir des vecteurs propres :

$$(CP_j) = (X)(u_j)$$

Les nouvelles variables CP<sub>k</sub> ne sont pas corrélées entre elles (les composantes principales sont orthogonales).

Tableau 47 : Composantes principales.

	CP <sub>1</sub>	CP <sub>2</sub>	CP <sub>3</sub>	CP <sub>4</sub>	CP <sub>5</sub>	CP <sub>6</sub>
1	0,045	0,426	0,289	-1,091	0,221	-0,069
2	0,803	0,481	0,076	-1,055	-0,126	0,037
3	0,936	0,429	-0,064	-0,869	-0,077	0,072
4	1,264	0,206	-0,633	-0,077	0,211	0,066
5	1,576	-0,023	-1,196	0,719	0,515	0,075
6	2,029	-0,225	-1,780	1,482	0,724	0,084
7	-0,222	0,149	-0,302	-0,797	0,518	-0,584
8	0,792	0,584	0,227	-0,587	0,002	0,081
9	0,629	0,924	0,774	-0,051	0,060	0,044
10	0,576	2,390	2,883	1,953	-0,098	-0,074
11	-2,994	-1,978	1,530	0,055	1,134	0,161
12	-0,693	-1,597	1,010	-0,267	-0,329	-0,017
13	-0,090	-1,564	0,805	-0,193	-0,588	0,036
14	0,897	-1,660	0,130	0,444	-0,749	-0,001
15	1,135	-1,874	-0,477	1,262	-0,456	-0,194
16	-4,560	0,812	-1,221	0,742	0,112	0,097
17	-2,720	0,971	-1,264	0,263	-0,645	-0,270
18	-0,727	0,778	-0,719	-0,326	-0,615	0,393
19	0,342	0,559	-0,316	-0,676	-0,274	0,033
20	0,982	0,209	0,248	-0,932	0,461	0,031

Les axes associés aux vecteurs propres, pris deux à deux, constituent la base des plans factoriels utilisés pour les projections du nuage des individus et du nuage des variables.

## IV.7.2. Méthode de régression

### IV.7.2.a. Relation de codage des facteurs

La relation de codage consiste à transformer la valeur  $u_i$  du facteur  $U$ , en une valeur codée  $x_i$  selon l'expression suivante :

$$x_i = \frac{u_i - \left( \frac{u_{\text{maxi}} + u_{\text{mini}}}{2} \right)}{\left( \frac{u_{\text{maxi}} - u_{\text{mini}}}{2} \right)}$$

### IV.7.2.b. Représentation matricielle du système d'équations

Le plan expérimental comporte  $n$  points expérimentaux (dans notre cas  $n = 13$ ), pour lesquels on peut écrire la relation :

$$y_i = a_0 + a_1x_{i,1} + a_2x_{i,2} + a_3x_{i,3} + a_{11}x_{i,1}^2 + a_{22}x_{i,2}^2 + a_{33}x_{i,3}^2 + a_{12}x_{i,1}x_{i,2} + a_{13}x_{i,1}x_{i,3} + a_{23}x_{i,2}x_{i,3} + e_i$$

où les quantités  $e_i$  correspondent aux résidus ou écarts du modèle.

Le système peut être écrit sous forme matricielle :

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \dots \\ y_i \\ \dots \\ y_{13} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & x_{1,1} & x_{1,2} & \dots & x_{1,1}^2 & \dots & x_{1,1}x_{1,2} & \dots & x_{1,2}x_{1,3} \\ 1 & x_{2,1} & x_{2,2} & \dots & x_{2,1}^2 & \dots & x_{2,1}x_{2,2} & \dots & x_{2,2}x_{2,3} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & x_{i,1} & x_{i,2} & \dots & x_{i,1}^2 & \dots & x_{i,1}x_{i,2} & \dots & x_{i,2}x_{i,3} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & x_{13,1} & x_{13,2} & \dots & x_{13,1}^2 & \dots & x_{13,1}x_{13,2} & \dots & x_{13,2}x_{13,3} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \\ \dots \\ a_{11} \\ \dots \\ a_{12} \\ \dots \\ a_{23} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \dots \\ e_i \\ \dots \\ e_{13} \end{bmatrix}$$

$$\text{soit } (Y) = (X)(A) + (E), \quad \mathbf{(1)}$$

un système de  $n$  équations à  $(p+n)$  inconnues,  $p$  étant le nombre de coefficients ( $p = 10$  dans notre cas). Il faut donc introduire  $p$  équations complémentaires qui sont fournies par la méthode des moindres carrés.

#### IV.7.2.c. Régression

La méthode des moindres carrés consiste à estimer la valeur des coefficients qui minimisent la somme des carrés des écarts SCE :

$$SCE = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

où  $y_i$  représente la valeur calculée de la réponse et  $\hat{y}_i$ , la valeur de la réponse observée.

$$\text{D'où les } p \text{ équations supplémentaires : } \frac{\partial SCE}{\partial a_i} = 0 \quad (2) \quad \text{avec} \quad \frac{\partial^2 SCE}{\partial a_i^2} > 0$$

La solution du système d'équations  $\{(1) + (2)\}$ , dans le cas d'un modèle polynomial est donné par :

$$A = ({}^tXX)^{-1}({}^tX)(Y)$$

où A représente le vecteur des coefficients  $a_i$  estimés par la méthode des moindres carrés.

La valeur des coefficients ainsi obtenue est utilisée pour écrire le modèle mathématique, permettant de calculer les réponses dans tout le domaine expérimental :

$$(\hat{Y}) = (X)(A)$$

#### IV.7.2.d. Calcul du coefficient de détermination

Le coefficient de détermination, noté  $R^2$ , est défini à partir de :

$$R^2 = \frac{SCM}{SCT} = 1 - \frac{SCE}{SCT} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

Pour tenir compte du degré du modèle polynomial et éventuellement comparer différents modèles entre eux, il est préférable de calculer le coefficient  $R^2$  ajusté défini par :

$$R^2_{\text{ajusté}} = 1 - \frac{\left( \frac{SCE}{n-p} \right)}{\left( \frac{SCT}{n-1} \right)}$$



## **IV.8. Tests mécaniques**

Les tests de traction uni-axiale ont été réalisés à la Plate-Forme Technologique Plasturgie et Outillages de Rochefort sur 4 ou 5 éprouvettes type haltère normalisées H3 pour chaque échantillon de plastique. L'épaisseur de chaque éprouvette est mesurée en plusieurs points (partie active et zones de maintien des mors). Les essais sont effectués sur une machine MTS Q Test / 25. On relève les 3 paramètres caractéristiques que sont : la contrainte à la rupture (MPa), la déformation à la rupture (%) et le module d'élasticité (MPa).

### **IV.8.1. Analyse thermogravimétrique**

Les analyses thermiques différentielles ont été menées au laboratoire SPCTS (Sciences et Procédés Céramiques et Traitements de Surface) de l'Université de Limoges. L'expérience a été effectuée à l'aide d'un appareil TA instruments SDT 2960 simultaneous DSC-TGA. Pour cela 10 à 20 mg d'échantillon sont placés dans un creuset en platine et les variations d'énergie par rapport à une référence (creuset vide) sont enregistrées avec une vitesse de chauffe de 20°C/min. La fréquence d'acquisition est d'une mesure toutes les 2 secondes.

### **IV.8.2. Analyse thermique différentielle**

Les essais ont été conduits sur un équipement DSC METTLER à la Plate-Forme Technologique Plasturgie et Outillages de Rochefort. La masse initiale d'échantillon, d'environ 10 mg, est placée dans une coupelle en aluminium surmontée d'un couvercle scellé. Les variations d'énergie par rapport à une référence (coupelle vide) sont ensuite enregistrées, l'augmentation de la température étant constante (10°C/min).

### **IV.8.3. Analyse thermomécanique dynamique (DMTA)**

Les essais ont été réalisés au Laboratoire de Structures et Propriétés de l'Etat Solide de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, sur un équipement Rheometric Scientific solids analyzer RSA II.



# Références bibliographiques



# Références bibliographiques

---

Adams G.A., Arabinoglucuronoxylan, arabinoxylan, and xylan; purification using a copper complex and purification by fractional precipitation of acetates, *In: Whistler R.L., Carbohydrate Chemistry*, vol V. Ed. Academic Press, New-York, **1965**, 170-175.

Albersheim P., Bauer W.D., Keegstra K., Talmadge K.W., The structure of the wall of suspension cultured Sycamore cells. *In: Loewus F. (Ed), The Biogenesis of Plant cell wall Polysaccharides*, **1973**, 117 p.

Alèn R., Structure and chemical composition of wood, *Papermaking Science and Technology*, **2000**, 3, 11-57.

Andersson S.I., Samuelson O., Ishihara M., Shimizu K., Structure of the reducing end-groups in spruce xylan, *Carbohydr. Res.*, **1983**, 111(2), 283-288.

Atkins E.D.T., Three-dimensional structure, interactions and properties of xylans, *Progress in Biotechnology*, **1992**, 7(Xylans Xylanases), 39-50.

Baeza J., Freer J., Chemical characterization of wood and its components, *In: Hon D.N.S., Shiraishi N. (Eds), Wood and Cellulosic Chemistry (2nd Edition)*. Marcel Dekker, New York, **2001**, 275-384.

Bailey, R.W., Quantitative studies of ruminant digestion, II, Loss of ingested plant carbohydrates from the reticulo-rumen, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **1967**, 10(1), 15-32.

Baker G.R., Triphenylmethyl ethers, *Methods Carbohydr. Chem.*, **1963**, 2, 168.

Bartolomé A.P., Rupérez P., Polysaccharides from the cell walls of pineapple fruit, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 608-612.

Besemer, Arie C.; van Bekkum, Herman. Dicarboxy-starch by sodium hypochlorite/bromide oxidation and its calcium-binding properties. *Starch/Staerke*, **1994**, 46(3), 95-101.

Bidlack J., Malone M., Benson R., Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants, *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, **1992**, 72, 51-56.

Biely P., MacKenzie C.R., Puls J., Schneider H., Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymic degradation of acetyl xylan, *Bio/Technology*, **1986**, 4(8), 731-733.

Biermann C.J., Introduction to analysis of carbohydrates by gas-liquid chromatography (GLC). *In: Biermann C.J., McGinnis G.D. (eds), Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. CRC Press, Boca Raton, **1989**, 1-17.

Black G.E., Fox A., Recent progress in the analysis of sugar monomers from complex matrixes using chromatography in conjunction with mass spectrometry or stand-alone tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr., A*, **1996**, 720, 51-60.

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

Bleton J., Mejanelle P., Sansoulet J., Goursaud S., Tchaplal A., Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums, *J. Chromatogr., A*, **1996**, 720, 27-49.

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.*, **1973**, 54(2), 484-489.

Bochicchio R., Reicher F., Are hemicelluloses from *Podocarpus lambertii* typical of gymnosperms? *Carbohydr. Polym.*, **2003**, 53(2), 127-136.

Bonnin E., Renard C., Thibault J.F., Ducroo P., Les enzymes de dégradation des parois végétales : mode d'action et utilisations alimentaires. Dans : Larreta-Garde V. (Ed), *Enzymes en agroalimentaire*. Techniques et documentation Lavoisier, Paris, **1997**, 169-197.

Bouroche J.M., Saporta G., L'analyse en composantes principales. Dans : *L'analyse des données*. Presses Universitaires de France, Série que sais-je ?, Paris, **1994**, 1854, 17-47.

Bowering W.D.S., Marchessault R.H., Timell T.E., Preparation and properties of a 4-O-methylglucosylated xylan from the wood of white birch, *Svensk Papperstidning*, **1961**, 64, 191-194.

Brisson S., Rigal L., Manolas C., Gaset A., Les hémicelluloses de plantes annuelles, une source d'ingrédients fonctionnels et de matériaux pour de nouvelles valorisations non-alimentaires des grandes productions agricoles. Dans : *Valorisations non-alimentaires des grandes productions agricoles*. INRA Editions, Nantes (France), **1994**, 231.

Brochette-Lemoine S., Joannard D., Descotes G., Bouchu A., Queneau Y., Sonocatalysis of the TEMPO-mediated oxidation of glucosides, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **1999**, 150, 31-36.

Brown D., Clarke J.H.R., Molecular dynamics simulation of an amorphous polymer under tension. 1. Phenomenology, *Macromolecules*, **1991**, 24, 2075-2082.

Browning B.L., *Methods of Wood Chemistry*, Vol. II. Wiley, **1967**, 495 p.

Buchert J., Siika-aho M., Bailey M., Puls J., Valkeajarvi A., Pere J., Viikari L., Quantitative determination of wood-derived soluble oligosaccharides by HPLC, *Biotechnology Techniques*, **1993**, 7(11), 785-790.

Carpita N.C., Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali, *Phytochemistry*, **1984**, 23(5), 1089-1093.

Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant Journal*, **1993**, 3(1), 1-30.

Castro M.J.L., Salmaso N., Kovensky J., Fernandez C.A., *O*-sulfated derivatives of glucuronic acid, *Molecules*, **2000**, 5(3), 600-601.

Cavagna F., Deger H., Puls J., The 2D NMR analysis of the structure of an aldotriouronic acid obtained from birch wood, *Carbohydr. Res.*, **1984**, 129, 1-8.

Cescutti P., Toffanin R., Pollesello P., Sutherland I.W., Structural determination of the acidic exopolysaccharide produced by a *Pseudomonas* sp. Strain 1.15., *Carbohydr. Res.*, **1999**, 315(1-2), 159-168.

Chanliaud E., Saulnier, L., Thibault, J.F., Alkaline extraction and characterization of heteroxylans from maize bran, *Journal of Cereal Science*, **1995**, 21(2), 195-203.

Chanliaud E., Extraction, caractérisation, et propriétés fonctionnelles des hétéroxylanes de son de maïs, thèse des Universités Paris VII, Paris IX, et E.N.S.I.A., **1995**, 117 p.

Ciancia M., Cerezo A.S., Autohydrolysis of polysaccharides, *Ciencia e Cultura (Sao Paulo)*, **1993**, 45(1), 54-61.

Cibois P., *L'analyse factorielle*, Presses Universitaires de France, Série que sais-je ?, Paris, **1983**, 2095, 126 p.

Ciucanu I., Kerek F., A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, *Carbohydr. Res.*, **1984**, 131(2), 209-217.

Ciucanu I., Luca C., Avoidance of degradation during the methylation of uronic acids, *Carbohydr. Res.*, **1990**, 206(1), 71-77.

Ciucanu I., Koenig W.A., Immobilization of peralkylated  $\beta$ -cyclodextrin on silica gel for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr., A*, **1994**, 685(1), 166-171.

Coimbra M.A., Rigby N.M., Selvendran R.R., Waldron K.W., Investigation of the occurrence of xylan-xyloglucan complexes in the cell walls of olive pulp (*Olea europaea*), *Carbohydr. Polym.*, **1995**, 27(4), 277-84.

Davis N.J., Flitsch S.L., Selective oxidation of monosaccharide derivatives to uronic acids, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34(7), 1181-1184.

De Nooy A.E.J., Besemer A.C., Van Bekkum H., Highly selective TEMPO mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, **1994**, 113(3), 165-166.

De Nooy A.E.J., Besemer A.C., Van Bekkum H., Highly selective nitrosyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269(1), 89-98.

De Nooy A.E.J., Besemer A.C., Van Bekkum H., On the use of stable organic nitroxyl radicals for the oxidation of primary and secondary alcohols, *Synthesis*, **1996**, 10, 1153-1174.

De Nooy A.E.J., Pagliaro M., Van Bekkum H., Besemer A.C., Autocatalytic oxidation of primary hydroxyl functions in glucans with nitrogen oxides, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 304(2), 117-123.

Dekker R.F.H., Richards G.N., Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **1976**, 32, 277-352.

Despre D., Guy C., Messenger A., Fredon E., Krausz P., Granet R., Benhaddou-Zerrouki R., Compounds derived from polysaccharides, method for obtaining same and use thereof for manufacture of biodegradable plastic films, *PCT Int. Appl.*, **2001**, 40 p.

Dische Z., The aerobic glycolysis of avian red blood cells and its control by intracellular ions in physiological concentrations, *J. Biol. Chem.*, **1946**, 163, 575-576.

Dodge Y., *Analyse de régression appliquée*. Dunod, Paris, **1999**, 278 p.

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 350-356.

Dutton G.G.S., Unrau A.M., Structural analysis of some acidic xylans by periodate oxidation, *Can. J. Chem.*, **1962**, 40, 348-52.

Ebringerova A., Kramar A., Domansky R., Structural features of (4-*O*-methylglucurono)xylan from hornbeam wood (*Carpinus betulus*), *Holzforschung*, **1969**, 23(3), 89-92.

Ebringerova A., The thermal degradation of hardwood hemicelluloses in the 80°C to 200°C range. III. Thermal degradation of an isolated 4-*O*-methylglucuronoxylan in a dry nitrogen atmosphere, *Cellul. Chem. Technol.*, **1976**, 10(1), 121-129.

Ebringerova A., Hromadkova Z., Burchard W., Dolega R., Vorwerg W., Solution properties of water-insoluble rye-bran arabinoxylan, *Carbohydr. Polym.*, **1994a**, 24(3), 161-9.

Ebringerova A., Belicova A., Ebringer L., Antimicrobial activity of quaternized heteroxylans, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **1994b**, 10(6), 640-644.

Ebringerova A., Hromadkova Z., Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, **1999**, 16, 325-346.

Ebringerova A., Heinze T., Xylan and xylan derivatives, biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, 21(9), 542-556.

Edgar K.J., Buchanan C.M., Debenham J.S., Rundquist P.A., Seiler B.D., Shelton M.C., Tindall D., Advances in cellulose ester performance and application, *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, 26(9), 1605-1688.



El-Ashmawy A.E., Mobarak F., El-Kaliobi S., Hemicelluloses as additives in papermaking. III. Effect of hemicelluloses isolated from plant raw materials compared to the effect of those isolated from pulps on paper properties, *Cellul. Chem. Technol.*, **1976**, 10(5), 637-640.

Englmaier P., Carbohydrate trifluoroacetates, *In: Biermann C.J., McGinnis G.D. (eds), Analysis of carbohydrates by GLC and MS.* CRC Press, Boca Raton, **1989**, 127-141.

Excoffier G., Nardin R., Vignon M.R., Détermination de la structure primaire d'un acide tri-D-xylo-4-O-méthyl-D-glucuronique par R.M.N. à deux dimensions, *Carbohydr. Res.*, **1986**, 149, 319-328.

Fang J.M., Fowler P.A., Tomkinson J., Hill C.A.S., An investigation of the use of recovered vegetable oil for the preparation of starch thermoplastics, *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 50, 429-434.

Feil H., Biodegradable plastics from vegetable raw materials, *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, **1995**, 6(4), 25-32.

Ford C.W., Hartley R.D., Cyclodimers of p-coumaric and ferulic acids in the cell walls of tropical grasses, *J. Sci. Food Agric.*, **1990**, 50(1), 29-43.

Fournet B., Apports de la spectrométrie de masse à l'étude d'oligosaccharides et de glycoconjugués, *Les cahiers Imabio, Spectrométrie de masse CNRS*, **1991**, 1, 47-58.

Fredon E., Obtention de films plastiques hydrophobes à partir de polysaccharides contenus dans des co-produits agricoles, thèse de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, **2001**, 179 p.

Fredon E., Granet R., Zerrouki R., Krausz P., Saulnier L., Thibault J.F., Rosier J., Petit C., Hydrophobic films from maize bran hemicelluloses, *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 49(1), 1-12.

Fry S.C., Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms, *Annual Review of Plant Physiology*, **1986**, 37, 165-186.

Fry S.C., The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. *In: Monographs and survey in the biosciences.* Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK, **1988**.

Fry S.C., Analysis of cross-links in the growing plant cell walls of higher plants. *In: Linskens H.F., Jackson J.F. (Eds), Plant Fibers. Modern methods of plant analysis.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1989**, 10, 12-36.

Gandini A., Belgacem M.N., Le furfural et les polymères furaniques, *Actualité Chimique*, **2002a**, 11-12, 56-61.

Gandini A., Belgacem M.N., Recent contributions to the preparation of polymers derived from renewable resources, *Journal of polymers and the environment*, **2002b**, 10(3), 105-114.

- Garozzo D., Spina E., Cozzolino R., Cescutti P., Fett W.F., Studies on the primary structure of short polysaccharides using SEC MALDI mass spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 323(1-4), 139-46.
- Gorin P.A.J., 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid and 4-*O*-methyl-D-glucose, *Can. J. Chem.*, **1957**, 35, 595-598.
- Goupy J., *Plans d'expériences pour surfaces de réponse*. Dunod, Paris, **1999**, 409 p.
- Gourson C., Benhaddou R., Granet R., Krausz P., Verneuil B., Branland P., Chauvelon G., Thibault J.F., Saulnier L., Valorization of maize bran to obtain biodegradable plastic films, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1999**, 74(13), 3040-3045.
- Grengross T., Slater S., Des plastiques extraits des plantes, *Pour la science*, **2000**, 276, 66-71.
- Gupta S., Madan R.N., Bansal M.C., Chemical composition of *Pinus caribaea* hemicellulose, *Tappi J.*, **1987**, 70(8), 113-114.
- Habibi Y., Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie – Les polysaccharides pariétaux : caractérisation et modification chimique, thèse des Universités J. Fourier de Grenoble et Cadi Ayyad de Marrakech, **2004**, 236 p.
- Hanessian S., Lavallée P., Preparation and synthetic utility of tert-butyldiphenylsilyl ethers, *Can. J. Chem.*, **1975**, 53(19), 2975-2977.
- Hansson J.A., Hartler N., Alkaline degradation of xylans from birch and pine, *Svensk Papperstidning*, **1968**, 71(9), 358-65.
- Havlicek J., Samuelson O., Chromatography of oligosaccharides from xylan by various techniques, *Carbohydr. Res.*, **1972**, 22(2), 307-316.
- Haworth W.N., A new method of preparing alkylated sugars, *Journal of the Chemical Society, Abstracts*, **1915**, 107, 8-16.
- Holmbom B., Le xylitol, un édulcorant salubre issu du bois de bouleau, *Actualité chimique*, **2002**, 11-12, 52-53.
- Horio M., Imamura R., Crystallographic study of xylan from wood, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **1964**, 2, 627-44.
- Hromadkova Z., Ebringerova A., Kacurakova M., Alfoldi J., Interactions of the beechwood xylan component with other cell wall polymers, *J. Wood Chem. Technol.*, **1996**, 16(3), 221-234.
- Hromadkova Z., Kovacikova J., Ebringerova A., Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan, *Industrial Crops and Products*, **1999**, 9(2), 101-109.
- Huang Y.Z., Indrarti L., Azuma J., Okamura K., Simultaneous determination of xylose and uronic acid in beech xylan by methanolysis, *Mokuzai Gakkaishi*, **1992**, 38(12), 1168-1171.

Iiyama K., Lam T.B.T., Stone B.A., Covalent cross-links in the cell wall, *Plant Physiol.*, **1994**, 104(2), 315-20.

Ishihara M., Shimizu K., Ishihara T., Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. III. Partial purification and mode of action of an extracellular xylanase, *Mokuzai Gakkaishi*, **1978**, 24(2), 108-115.

Jacobs A., Larsson P.T., Dahlman O., Distribution of uronic acids in xylans from various species of soft- and hardwood as determined by MALDI mass spectrometry, *Biomacromolecules*, **2001**, 2(3), 979-990.

Johansson M.H., Samuelson O., Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation, *Wood Sci. Technol.*, **1977a**, 11(4), 251-263.

Johansson M.H., Samuelson O., Epimerization and degradation of 2-O-(4-O-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylitol in alkaline medium, *Carbohydr. Res.*, **1977b**, 54(2), 295-299.

Johnson D.L., Cyclic amine oxides as solvents for natural and synthetic polymers, *Brit.*, **1969**, 9 p.

Joly N., Granet R., Krausz P., Crosslinking of cellulose by olefin metathesis, *J. Carbohydr. Chem.*, **2003**, 22(1), 47-55.

Joseleau J.P., Les hémicelluloses. Dans : B. Monties (Ed), *Les polymères végétaux*. Bordas, **1980**, 87-121.

Joseleau J.P., Comtat J., Ruel K., Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls, *Progress in Biotechnology*, **1992**, 7(Xylans Xylanases), 1-15.

Jung H.G., Deetz D.A., Cell wall lignification and degradability, *Forage Cell Wall Struct. Dig.*, Int. Symp., **1993**, Meeting Date 1991, 315-346.

Kacurakova M., Wellner N., Ebringerova A., Hromidkova Z., Wilson R.H., Belton P.S., Characterization of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies, *Food Hydrocolloids*, **1999**, 13(1), 35-41.

Kacurakova M., Capek P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerova A., FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses, *Carbohydr. Polym.*, **2000**, 43(2), 195-203.

Kamerling, J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R., 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.*, **1975**, 151(3), 491-495.

Karacsonyi S., Kubackova M., Polysaccharides of poplar (*Populus monilifera*). The structure of (4-O-methylglucurono)xylan, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1969**, 34(7), 2002-2013.

Kemmish D., In: Ching C., Kaplan D., Thomas E. (Eds), *Biodegradable polymers and packaging*. Technomic Publishing AG, Basel, Switzerland, **1993**, 225p.

Kennedy J.F., Robertson S.M., Mass-spectrometric fragmentation pathways of the *O*-trimethylsilyl derivatives of hexuronic acids and their lactones, *Carbohydr. Res.*, **1978**, 67(1), 1-15.

Kohn R., Hromadkova Z., Ebringerova A., Toman R., Distribution pattern of uronic acid units in 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylan of beech (*Fagus sylvatica* L.), *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1986**, 51(10), 2243-2249.

Koshijima T., Timell T.E., Zinbo M., Number-average molecular weights of native hardwood xylans, *J. Polym. Sci., Part C: Polymer Symposia*, **1965**, 11, 265-79.

Kuhn R., Trischmann H., Low I., Permethylation of sugars and glucosides, *Angew. Chem.*, **1955**, 67, 32.

Kwan J.S., Morvan H., Extracellular branched xylans and acidic arabinogalactans from suspension cultured cells of white campion (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause), *Food Hydrocolloids*, **1991**, 5(1-2), 163-6.

Kwatra H.S., Caruthers J.M., Tao B.Y., Synthesis of long chain fatty acids esterified onto cellulose via the vacuum-acid chloride process, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1992**, 31(12), 2647-2651.

Lai Y.Z., Chemical degradation, In: Hon D.N.S., Shiraishi N. (Eds), *Wood and Cellulosic Chemistry* (2nd Edition). Marcel Dekker, New York, **2001**, 443-512.

Lam T.B.T., Iiyama K., and Stone B.A., Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: Taxonomic and structural considerations. In: Akin D.E., Ljungdahl L.G., Wilson J.R., Harris P.J. (Eds), *Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilisation by ruminants*. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, **1990**, 43-69.

Lau J.M., McNeil M., Darvill A.G., Albersheim P., Selective degradation of the glycosyluronic acid residues of complex carbohydrates by lithium dissolved in ethylenediamine, *Carbohydr. Res.*, **1987**, 168, 219-243.

Lenz J., Wutzel H., Effect of the addition of hemicelluloses on the flow properties of wheat flour dough, *Rheol. Acta*, **1984**, 23(5), 570-572.

Lever M., New reaction for colorimetric determination of carbohydrates, *Anal. Biochem.*, **1972**, 47(1), 273-279.

Li K., Helm R.F., A practical synthesis of methyl 4-*O*-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosiduronic acid, *Carbohydr Res*, **1995**, 273, 249-253.

Liang C.Y., Marchessault R.H., Infrared spectra of crystalline polysaccharides, II, Native celluloses in the region from 640 to 1700  $\text{cm}^{-1}$ , *J. Polym. Sci.*, **1959**, 39, 269-278.

Lindberg B., Lonngren J., Svensson S., Specific degradation of polysaccharides, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **1975**, 31, 185-240.

Lochner R.H., Matar J.E., *Designing for quality, An introduction to the best of Taguchi and western methods of statistical experimental design*. Productivity Press (Ed.), Portland, Oregon, **1990**, 243 p.

Marchessault R.H., Liang C.Y., The infrared spectra of crystalline polysaccharides, VIII Xylans, *J. Polym. Sci.*, **1962**, 59, 357-378.

Marga F., Freyssac V., Morvan H., Rapid gas liquid chromatography microanalysis of carbohydrates in woody plant tissues, *J. Trace and Microprobe Techniques*, **1995**, 13(4), 473-478.

Mares D.J., Stone B.A., Wheat endosperm, II, Properties of the wall components and studies on their organization in the wall, *Australian Journal of Biological Sciences*, **1973**, 26(4), 813-30.

Mazeau K., Heux L., Molecular dynamics simulations of bulk native crystalline and amorphous structures of cellulose, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107(10), 2394-2403.

McCormick C.L., Shen T.C., A new cellulose solvent for preparing derivatives under homogeneous conditions, *Organic Coatings and Plastics Chemistry*, **1981**, 45, 335-338.

McCormick C.L., Callais P. A., Derivatization of cellulose in lithium chloride and N,N-dimethylacetamide solutions, *Polymer*, **1987**, 28(13), 2317-2323.

McGinnis G.D., High performance liquid chromatography (HPLC) of carbohydrates. In: Biermann C.J., McGinnis G.D. (eds), *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. CRC Press, Boca Raton, **1989**, 19-26.

Monties B., Preparation of dioxane lignin fractions by acidolysis, *Methods in Enzymology*, **1988**, 161, 31-35.

Montreuil J., Spik G., Chosson A., Segard E., Scheppler N., Methods of study of the structure of glycoproteins, *J. Pharm. Belg.*, **1963**, 18, 529-546.

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

Morooka T., Norimoto M., Yamada T., Shiraishi N., Viscoelastic properties of cellulose acylates, *Wood Research*, **1983**, 69, 61-70.

Mort A.J., Bauer W.D., Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments - Structure of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* that bind soybean lectin, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257(4), 1870-1875.

Murphy D., Pennock C.A. , Gas-chromatographic measurement of blood and urine glucose and other monosaccharides, *Clinica Chimica Acta*, **1972**, 42(1), 67-75.

Neeser J.R., Schweizer T.F., Analysis of carbohydrates as *O*-alkyloxime derivatives by gas-liquid chromatography (GLC). In: Biermann C.J., McGinnis G.D. (eds), *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. CRC Press, Boca Raton, **1989**, 143-155.

Nimz H., Beech lignin - Draft of a constitution scheme, *Angew. Chem.*, **1974**, 86(9), 336-44.

Nishitani K., Nevins D.J., Glucuronoxylan xylanohydrolase a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266(10), 6539-6543.

Ogawa T., Matsui M., Regioselective stannylation - Acylation of carbohydrates: coordination control, *Tetrahedron*, **1981**, 37, 2363-2369.

Paillet M., Peguy A., New biodegradable films from exploded wood solutions, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1990**, 40(3-4), 427-433.

Parpot P., Kokoh K.B., Beden B., Lamy C., Electrocatalytic oxidation of saccharose in alkaline medium, *Electrochim. Acta*, **1993**, 38(12), 1679-1683.

Petkowicz C.L.O., Reicher F., Mazeau K., Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains, *Carbohydr. Polym.*, **1998**, 37(1), 25-39.

Popa V.I., Hemicelluloses. In: , *Polysaccharides in Medicinal Applications*, **1996**, 107-124.

Quemener B., Thibault J.F., Brunet C., Crepeau M.J., Improvements in the methanolysis of pectins by enzymic prehydrolysis, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 190(1), C7-C10.

Rees D.A., Skerrett R.J., Conformational analysis of cellobiose, cellulose, and xylan, *Carbohydr. Res.*, **1968**, 7(3), 334-348.

Robert D., Roland J.C., Biologie végétale, volume 1, Organisation cellulaire, Ed. Doin, Paris, **1998**, 367 p.

Roland J.C., Visualisation des polysaccharides au niveau ultrastructural. Dans : Les Polymères Végétaux . Polymères Pariétaux et Alimentaires non azotés. Ed. Gauthier-Villars, Paris, **1980**, 30-45.

Rutenberg, M.W., Herbst W.M., *Extraction of hemicellulose from corn bran*, **1957**, US 2801955 19570806.

Sajjan S.U., Salimath P.V., Isolation of a neutral linear xylan from guar seed hus, *Carbohydr. Res.*, **1986**, 145(2), 348-350.

Salimath P.V., Tharanathan R.N., Structural features of two amyloids from the hemicellulosic fraction of field-bean (*Dolichos lablab*) hulls, *Carbohydr. Res.*, **1982**, 107(1), 103-109.

Samaranayake G., Glasser W.G., Cellulose derivatives with low DS, I, A novel acylation system, *Carbohydr. Polym.*, **1993**, 22(1), 1-7.

Satgé C., Verneuil B., Branland P., Granet R., Krausz P., Rozier J., Petit C., Rapid homogeneous esterification of cellulose induced by microwave irradiation, *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 49(3), 373-376.

Saulnier L., Vigouroux J., Thibault J.F., Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 272(2), 241-53.

Sealey J.E., Samaranayake G., Todd J.G., Glasser W.G., Novel cellulose derivatives, IV, Preparation and thermal analysis of waxy esters of cellulose, *J. Polym. Sci., Part B: Polymer Physics*, **1996**, 34(9), 1613-1620.

Shimizu K., Samuelson O., Uronic acids in birch hemicellulose, *Svensk Papperstidning*, **1973**, 76(4), 150-155.

Shimizu K., Ishihara M., Ishihara T., Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. II. The oligosaccharides from the hydrolysate of a hardwood xylan by the intracellular xylanase, *Mokuzai Gakkaishi*, **1976**, 22(11), 618-625.

Shimizu K., Hashi M., Sakurai K., Isolation from a softwood xylan of oligosaccharides containing two 4-O-methyl-D-glucuronic acid residues, *Carbohydr. Res.*, **1978**, 62(1), 117-126.

Shimizu K., Chemistry of hemicelluloses. In: Hon D.N.S., Shiraishi N. (Eds), *Wood and Cellulosic Chemistry*. Marcel Dekker, New York, **1991**, 177-214.

Siika-aho M., Tenkanen M., Buchert J., Puls J., Viikari L., An  $\alpha$ -glucuronidase from *Trichoderma reesei* Rut C-30, *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, 16(9), 813-819.

Sjöström E., Westermarck U., Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution, In: Sjöström E., Alén R. (eds), *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*. Springer series in wood sciences, **1999**, 1-19.

Soldera A., Modélisation moléculaire des polymères linéaires, *Techniques de l'ingénieur, Traité Sciences fondamentales*, **2003**, AF 6 042, 1-21.

Somogyi M., Notes on sugar determination, *J Biol Chem*, **1952**, 195, 19-23.

Strecker G., Analyse structurale des chaînes glycaniques, *Biofutur*, **1993**, 46-52.

Sun R.C., Fang J.M., Tomkinson J., Hill C.A.S., Esterification of hemicelluloses from poplar chips in homogeneous solution of N,N-dimethylformamide/lithium chloride, *J. Wood Chem. Technol.*, **1999**, 19(4), 287-306.

Sundararajan P.R., Rao V.S.R., Conformational studies of  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) xylan, *Biopolym.*, **1969**, 8(3), 305-312.

Sundberg A., Sundberg K., Lillandt C., Holmbom B., Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibers by acid methanolysis and gas chromatography, *Nord. Pulp Pap. Res. J.*, **1996**, 11(4), 216-219, 226.

Sweeley C.C., Bentley R., Makita M., Wells W.W., Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2497.

Tahiri C., Vignon M.R., TEMPO-oxidation of cellulose : synthesis and characterisation of polyglucuronans, *Cellulose*, **2000**, 7, 177-188.

Takahashi N., Koshijima T., Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood, *Wood Sci. Technol.*, **1988**, 22(3), 231-241.

Takenishi S., Tsujisaka Y., Hemicellulases, V, Structures of the oligosaccharides from the enzyme hydrolysate of rice-straw arabinoxylan by a xylanase of *Aspergillus niger*, *Agricultural and Biological Chemistry*, **1973**, 37(6), 1385-1391.

Teleman A., Lundqvist J., Tjerneld F., Stalbrand H., Dahlman O., Characterization of acetylated 4-*O*-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 329(4), 807-815.

Teleman A., Tenkanen M., Jacobs A., Dahlman O., Characterization of *O*-acetyl-(4-*O*-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech, *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337(4), 373-377.

Thibault J.F., Robin J.P., Automation of uronic acid determination by the carbazole method, Application to pectic substances, *Annales de Technologie Agricole*, **1975**, 24(1), 99-110.

Thiebaud S., Borredon M.E., Solvent-free wood esterification with fatty acid chlorides, *Bioresour. Technol.*, **1995**, 52(2), 169-173.

Timell T.E., The acid hydrolysis of glycosides, I, General conditions and the effect of the nature of the aglycon, *Can. J. Chem.*, **1964**, 42(6), 1456-1472.

Timell T.E., Enterman W., Spencer F., Soltes E.J., The acid hydrolysis of glycosides, II, Effect of substituents at C-5, *Can. J. Chem.*, **1965**, 43(8), 2296-2305.

Timell T.E., Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses, *Wood Sci. Technol.*, **1967**, 1(1), 45-70.

Toman R., Kohn R., Malovikova A., Rosik J., Distribution of 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid units in xylan of the bark of white willow (*Salix alba* L.), *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1981**, 46(6), 1405-1412.

Tosh B., Saikia C.N., Dass N.N., Homogeneous esterification of cellulose in the lithium chloride-N,N-dimethylacetamide solvent system: effect of temperature and catalyst, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 327, 345-352.



Tosh B., Saikia C.N., Preparation of cellulose pentanoate of different degree of substitution: a detailed kinetics study, *Trends in Carbohydrate Chemistry*, **2000**, 6, 143-153.

Trombotto S., Préparation de composés carboxylés dérivés du saccharose, de l'isomaltulose et du tréhalulose, thèse de l'Université Claude Bernard de Lyon I, **2001**, 212 p.

Vaca-Garcia C., Etude de la réactivité de la cellulose et de déchets lignocellulosiques sur des acides gras et des esters d'acides gras en milieu hétérogène solide-liquide. Obtention de matériaux thermoplastiques et hydrophobes, thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, **1997**, 222 p.

Vaca-Garcia C., Thiebaud S., Borredon M.E., Gozzelino G., Cellulose esterification with fatty acids and acetic anhydride in lithium chloride/N,N-dimethylacetamide medium, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1998**, 75(2), 315-319.

Van Bekkum H., *Carbohydrates as organic raw materials*. F.W Lichtenthaler (Ed), VCH, Weinheim, **1992**, 289-310.

Van Halbeek H., <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbohydrate chains of glycoproteins, *Methods in Enzymology*, **1994**, 230, 132-168.

Verlet L., Computer "experiments" on classical fluids, I, Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules, *Phys. Rev.*, **1967**, 159(1), 98-103.

Vincendon M., Xylan derivatives: aromatic carbamates, *Makromolekulare Chemie*, **1993**, 194(1), 321-328.

Vinkx C.J.A., Delcour J.A., Rye (*Secale cereale* L.) arabinoxylans: A critical review, *Journal of Cereal Science*, **1996**, 24(1), 1-14.

Vinogradov E., Petersen B., Bock K., Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy at 750 MHz, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 307(1,2), 177-183.

Vuorinen T., Alén R., Carbohydrates. In: Sjöström E., Alén R. (eds), *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*. Springer Series in Wood Science, **1999**, 37-75.

Wang P., Tao B.Y., Synthesis and characterization of long-chain fatty acid cellulose ester (FACE), *J. Appl. Polym. Sci.*, **1994**, 52, 755-761

Wang P., Tao B.Y., Synthesis of cellulose-fatty acid esters for use as biodegradable plastics, *Journal of Environmental Polymer Degradation*, **1995**, 3(2), 115-119.

Watanabe T., Kaizu S., Koshijima T., Binding sites of carbohydrate moieties toward lignin in "lignin-carbohydrate complex", *Chem. Lett.*, **1986**, 11, 1871-1874.

Watanabe T., Structural studies on the covalent bonds between lignin and carbohydrate in lignin-carbohydrate complexes by selective oxidation of the lignin with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, *Wood Research*, **1989**, 76, 59-123.

Whistler R.L., Richards E.L., Hemicelluloses. *In: Pigman W., Horton D. (eds), The carbohydrates*, vol IIa. Academic Press, New York, **1970**, 447-469.

Whistler R.L., BeMiller J.N., Alkaline degradation of polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, **1958**, 13, 289-329.

Whistler R.L., Shah R.N., Recent developments in the industrial use of hemicelluloses, *Modif. Cellul.*, [Symp. Cellul., Pap., Text. Div. Am. Chem. Soc.], **1978**, Meeting Date 1977, 341-356.

Wilkie K.C.B., The hemicelluloses of grasses and cereals, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **1979**, 36, 215-264.

Wilkie K.C.B., The noncellulosic polysaccharides of nonendospermic parts of grasses, *Progress in Biotechnology*, **1985**, 1, 231-240.

Williams J.M., Richardson A.C., Selective acylation of pyranosides – I, Benzoylation of methyl  $\alpha$ -D-glucopyranosides of mannose, glucose and galactose, *Tetrahedron*, **1967**, 23, 1369-1378.

York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T., Albersheim P., Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components, *Methods in Enzymology*, **1986**, 118, 3-40.

Yui T., Imada K., Shibuya N., Ogawa K., Conformation of an arabinoxylan isolated from the rice endosperm cell wall by x-ray diffraction and a conformational analysis, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **1995**, 59(6), 965-968.

Zinbo M., Timell T.E., Degree of branching of hardwood xylans, *Svensk Papperstidning*, **1965**, 68(19), 647-662.

# Chapitre V

Nouveau chapitre de la thèse



# **Chapitre V : Conduite du projet de recherche (nouveau chapitre de la thèse)**

## **V.1. Présentation du sujet de thèse – Contexte**

### **Titre :**

« Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois. Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes. »

### **V.1.1. Contexte :**

Le développement des industries forestières a entraîné une augmentation significative de la production de sous-produits provenant de la transformation du bois. La gestion de ces déchets ou co-produits forestiers constitue un problème d'actualité et de nombreuses études visent à les valoriser. Il semble pourtant qu'à l'heure actuelle, moins de 10% de ces coproduits soit valorisé, notamment dans le secteur de l'énergie en tant que combustible ou dans le secteur du bois-matériau pour la production de plaquettes, de pâte à papier, de compost, de panneaux de particules...

Le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles est une unité pluridisciplinaire spécialisée dans la chimie des sucres et possède deux axes principaux de recherche. Un premier axe concerne la synthèse de molécules à visée thérapeutique, telles que les porphyrines utilisées en tant que photosensibilisateurs en photothérapie dynamique des cancers, et des analogues de nucléosides, développés en tant qu'antiviraux, anticancéreux et antibiotiques. Ce laboratoire s'intéresse également aux voies de valorisation des fractions cellulosique et hémicellulosique de co-produits agricoles et forestiers. Des travaux récents de notre laboratoire mettent en évidence que la cellulose du bois peut être transformée avec succès en matériau plastique hydrophobe avec une biodégradabilité significative et ceci en développant une chimie propre, s'affranchissant de l'utilisation de solvants toxiques.

Les matières plastiques actuelles, omniprésentes dans notre environnement (emballages de lait, bouteilles de boisson gazeuses ou d'eau minérale, pièces automobiles, vêtements, ...),

dérivent en majeure partie de l'industrie pétrochimique ce qui peut à court ou moyen terme poser quelques problèmes d'ordre économique, environnemental ou encore culturel. En premier lieu, la raréfaction annoncée des combustibles fossiles va s'accompagner inmanquablement d'une augmentation sensible de leur coût ; par ailleurs l'élimination des matières plastiques par incinération libère du gaz carbonique dont l'impact sur l'effet de serre n'est plus à démontrer ; enfin, la sensibilité de l'opinion publique en matière de défense et de protection de l'environnement conduira progressivement vers un durcissement des réglementations nationales et européennes. L'ensemble de ces constatations renforce l'intérêt de travaux qui proposeraient des voies de production alternative de plastiques biodégradables à partir de matériaux d'origine naturelle.

La biomasse formée par le bois, outre sa composition essentiellement polysaccharidique (cellulose, hémicelluloses et pectines), présente comme caractéristique d'être inépuisable puisque totalement renouvelable. Les co-produits générés par l'industrie du bois apparaissent alors comme un matériau de choix pour toute étude qui s'intéresserait aux voies de transformation chimique de la fraction polysaccharidique qu'ils renferment. Si la fraction cellulosique trouve déjà un grand nombre d'applications y compris à une échelle industrielle, les hémicelluloses sont quant à elles peu exploitées et ce, malgré leur grande richesse structurale.

### **V.1.2. Objectifs :**

*Au plan fondamental*, il s'agissait de qualifier la nature chimique des fractions hémicellulosiques extraites de sciures de bois de quatre essence d'intérêt régional (douglas, épicéa, chêne, châtaignier) et d'optimiser les protocoles d'extraction de ces hémicelluloses. *Au plan appliqué*, notre objectif était de définir des protocoles expérimentaux susceptibles de transformer les hémicelluloses extraites en films plastiques et de proposer une gamme de nouveaux matériaux plastiques, d'origine végétale, aux propriétés physico-chimiques variées. Il était alors intéressant de comprendre l'évolution de ces propriétés en fonction des différents paramètres de la réaction et de relier ces caractéristiques la structure tridimensionnelle des polymères.

## V.2. Gestion et évolution du projet

Ce projet a été mené au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, sous la direction du Dr Vincent Gloaguen et du Pr Pierre Krausz, entre octobre 2001 et novembre 2004.

### V.2.1. Les différentes étapes

Pour mener à bien mon sujet de thèse, je me suis appuyée sur tous les moyens matériels et humains mis à ma disposition par le laboratoire. J'ai eu la chance d'être encadrée par le Dr V. Gloaguen et d'aborder avec lui, dès mon stage de DEA, une thématique nouvelle du laboratoire, l'analyse structurale des polysaccharides. Je me suis donc appuyée dans une première phase de mon travail sur son expérience et ses connaissances dans le domaine de la glycobiochimie. J'ai bénéficié au cours de ces années d'un encadrement de qualité, avec un projet de départ déjà élaboré, parfaitement préparé, ce qui m'a permis de rentrer dès le début dans le vif du sujet. Cette première phase de mon travail a consisté à extraire les polysaccharides des sciures issues de quatre essences forestières d'intérêt régional et de déterminer la composition chimique des molécules extraites. Des problèmes liés à l'analyse structurale des polysaccharides m'ont amené, dès la deuxième année, à me détacher du sujet tel qu'il était défini à l'origine. En effet, au cours de l'analyse de composition des xylanes, polysaccharides comportant des unités d'acide 4-O-méthylglucuronique, nous avons été confrontés au problème de l'identification de ce sucre par manque de témoin adapté. J'ai alors souhaité réorienter mon travail vers la synthèse de l'acide 4-O-méthylglucuronique, permettant ainsi de répondre à notre problématique. Le laboratoire étant spécialisé dans la synthèse organique, et notamment la chimie des sucres, j'ai bénéficié là encore d'un encadrement très précieux, nécessaire pour aborder la synthèse. La synthèse des matériaux plastiques à partir des polysaccharides, synthèse maîtrisée au laboratoire depuis quelques années, m'est apparue intéressante à aborder en terme d'applications potentielles. Pour cela nous avons cherché à caractériser nos matériaux d'un point de vue de leurs propriétés mécaniques et thermiques. La démarche a ensuite consisté à répondre à un cahier des charges défini, ce qui nécessite de paramétrer la réaction chimique. Cette étude a été menée avec F. Louvet, professeur à l'ENSCI, spécialiste de l'analyse statistique des données, que j'ai rencontré au cours d'une formation proposée par l'Ecole Doctorale. La mise en place d'un plan d'expérience pour la réaction de transformation des polysaccharides en plastiques a constitué une approche très intéressante du problème, d'autant plus que ces méthodes, très développées dans le milieu industriel, ne sont que très peu employées dans le milieu universitaire. Enfin, dans une dernière partie, je me suis intéressée à la modélisation moléculaire afin de mettre en rapport l'organisation

tridimensionnelle des polymères et leurs propriétés thermiques et mécaniques. Ne disposant sur place ni de station de calcul nécessaire pour de lourds calculs, ni de spécialiste de ce domaine, j'ai effectué à deux reprises un stage au Cermav de Grenoble. Ce travail de thèse a donc bénéficié des compétences complémentaires de plusieurs partenaires, cités ci-dessous :

<i>Laboratoire</i>	<i>Participation</i>
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) UPRES EA 1069, Limoges	Laboratoire d'accueil
CRITT Matériaux Rochefort	Tests de traction
Sciences et Procédés Céramiques et Traitements de Surface (SPCTS) UMR CNRS 6638, Limoges	Analyse thermogravimétrique, analyse thermique différentielle
Groupe d'Etudes des Matériaux Hétérogènes EA 3178, Limoges	Analyse statistique des résultats, plan d'expériences
Laboratoire de Structures et Propriétés de l'Etat Solide UMR CNRS 8576, Lille	Analyse thermomécanique dynamique
Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) Rennes	Spectres de masse Haute Résolution, spectres de masse MALDI des oligosaccharides
Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) UPR CNRS 5301, Grenoble	Modélisation moléculaire

### **V.2.2. Communications**

Ce travail a donné lieu à plusieurs communications, sous forme d'un article (un deuxième article est actuellement en cours de rédaction), et d'exposés lors des XIXèmes Journées de Chimie et Biochimie des Glucides en 2002 et du Symposium de Chimie Organique en 2003 (SyCOCAL II).

Ce projet, qui s'inscrit dans une perspective de valorisation des coproduits forestiers, a pour vocation de déboucher vers une application industrielle. D'où notre implication dans



L'organisation du colloque « *Valorisation non énergétique et hors bois matériaux des écorces et sciures : Recherche, partenariat et transfert de technologies* » qui a eu lieu à Tulle (Corrèze) le 25 septembre 2002. L'objectif de cette manifestation était d'initier un rapprochement entre les acteurs de la recherche régionale-nationale et les entreprises de l'Espace Central susceptibles de s'impliquer dans la valorisation chimique et biologique des écorces et des sciures. Il s'agissait d'une part de favoriser les transferts de technologies des centres de compétences vers les entreprises susceptibles de les valoriser et d'autre part, de permettre aux entreprises de faire état de leurs besoins auprès des acteurs de la recherche et développement. Ce colloque a reçu entre autres le soutien de l'ADEME.

J'ai également participé, au cours dernière année de thèse au concours Campus Entrepreneur, concours régional ayant pour objectif d'initier et d'encourager la création d'entreprises. Nous avons pour cela formé une équipe de 5 doctorants, tous issus du LCSN, avec pour projet la création d'une entreprise de fabrication de matière plastique biodégradable. Ce projet était particulièrement motivant pour la plupart d'entre nous, puisque qu'il concernait directement nos travaux de recherche. Il s'agissait d'étudier la faisabilité du transfert technologique de notre savoir-faire à une échelle industrielle. Ce projet s'est révélé très positif pour plusieurs raisons. Tout d'abord, notre travail a été récompensé par le premier prix. Il m'a permis d'acquérir des connaissances dans un domaine encore inexploré pour moi jusqu'à cette année, l'entreprise, sa création, son évolution, concevoir et estimer la viabilité d'un projet. L'exercice a nécessité d'aller chercher conseils et soutien auprès de diverses personnes et organismes, de convaincre et de susciter l'intérêt auprès d'acteurs du monde économique. Mais il nous a également confronté aux problèmes liées aux relations humaines dans une équipe, aux ambitions des uns et des autres, aux motivations de chacun.

### **V.2.3. Enseignement et formations :**

Parallèlement à mes travaux de recherche, ces trois années m'ont permis d'acquérir une expérience pédagogique, sous la forme de vacances en première année et d'un poste d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche en troisième année. J'ai débuté par l'encadrement de travaux pratiques de chimie organique, de travaux dirigés en premier puis en deuxième cycle, pour finalement avoir la charge de quelque heures de cours en maîtrise de chimie. Cette progression a été très formatrice pour moi, me permettant d'obtenir de plus en plus d'assurance

et d'apprendre à transmettre, expliquer, adapter des connaissances, pour un public très exigeant et impitoyable que sont les étudiants.

Enfin, j'ai profité d'un certain nombre de formations proposées par l'école doctorale, qui sont venues enrichir ma formation dans des domaines très variés. J'ai ainsi participé à une formation d'initiation à l'économie d'entreprise, à la gestion de projet, et à certains ateliers tels que l'aide à la recherche d'emploi. Une formation à la méthodologie des plans d'expériences a trouvé une application directe dans mon travail de thèse.

### V.3. Mon projet professionnel

Il est maintenant important de définir de la façon la plus objective possible les compétences scientifiques et savoirs-faire acquis pendant la thèse et de présenter sur la base de ce bilan, un projet professionnel. Au cours de ces trois années de thèse, j'ai appris à :

- **Extraire, purifier, caractériser et modifier chimiquement les polysaccharides végétaux .**
- **Maîtriser les techniques d'analyse des sucres** : chromatographie phase gaz, chromatographie d'exclusion stérique, dosages colorimétriques, spectrométrie de masse, RMN, IR, et les bases de **la synthèse glucidique.**
- **Définir et coordonner un nouvel axe de recherche,** encadrer une équipe sur un projet.
- **Planifier et définir les besoins** et les manipulations nécessaires à un travail de recherche.
- **Identifier les contraintes et les risques** liés à l'élaboration d'un projet, proposer des solutions et mobiliser des compétences.
- **Faire le bilan** sur le déroulement et les résultats d'un projet, rédiger un rapport, présenter les conclusions d'une étude.
- **Enseigner la chimie organique, encadrer des étudiants.**

J'ai trouvé, au cours de ces trois années, un équilibre tout à fait satisfaisant entre le travail de recherche, dans lesquels j'ai eu la chance de pouvoir développer deux axes, fondamental et appliqué, et des activités d'enseignement dans lesquelles je me suis pleinement épanouie. L'équilibre, je l'ai également trouvé dans les méthodes de travail, l'ambition de mener un projet de recherche à bien, l'innovation scientifique et technologique, mais aussi un investissement dans des projets d'équipe et la participation à la vie d'un laboratoire. La carrière universitaire d'enseignant-chercheur est donc pour moi une évidence.

