



**Université de Limoges**



Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Année : 2005

Thèse N°: 58-2005

**Thèse**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

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

Présenté et soutenue par

**Gaël RUIZ**

le 10 novembre 2005

**Extraction, Détermination Structurale et  
Valorisation Chimique de Phycocolloïdes  
d'Algues Rouges**

**Directeurs de Thèse :** M. Vincent GLOAGUEN, Maître de Conférences-HDR  
M. Pierre KRAUSZ, Professeur

**Rapporteurs :**

M. Raymond BROUILLARD, Professeur, Université Strasbourg I

M. Gérard STRECKER, Directeur de Recherche au CNRS, Université de Lille

**Examineurs :**

Mme Aziza MOURADI, Professeur, Université de Kénitra

M. Vincent GLOAGUEN, Maître de Conférences-HDR, Université de Limoges

M. Pierre KRAUSZ, Professeur, Université de Limoges

**Invités :**

M. Jacques CHRISTEN, Directeur de l'Incubateur du Limousin

M. François LOUVET, PRAG, ENSCI, Limoges









# Remerciements

---

Je tiens en premier lieu à exprimer ma sincère gratitude au Pr. Pierre Krausz pour m'avoir accueilli dès le stage de maîtrise au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles qu'il dirige. Merci pour la confiance que vous avez su m'accorder ensuite lors de ces quatre années de 3<sup>ème</sup> cycle. Je tiens aujourd'hui à vous remercier chaleureusement pour votre rôle dans l'élaboration de ce mémoire.

Merci Vincent Gloaguen, maître de conférence-HDR, pour ce sujet, au combien passionnant, proposé en DEA et qui se concrétise à présent par la soutenance de ce manuscrit. Qu'elles sont passées vite ces 4 années sous ta direction dans un contexte de respect, d'écoute et d'échange. Je te remercie également pour la confiance que tu as su me témoigner et pour l'autonomie que tu m'as accordée. Je salue encore ta rigueur scientifique ainsi que tes grandes valeurs humaines. Comment témoigner ma reconnaissance pour cette formation scientifique autrement qu'en espérant conserver l'amitié que je te porte ?

Je tiens également à remercier Monsieur Raymond Brouillard, Professeur au Laboratoire de Chimie des Polyphénols à l'Université de Strasbourg, qui a accepté d'être rapporteur de ce travail.

Au Dr. Gérard Strecker, Directeur du Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université de Lille, je souhaite témoigner toute ma reconnaissance d'une part, pour tout le travail d'analyse structural réalisé et d'autre part, pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit.

Je vous remercie Madame Aziza Mouradi, Professeur au Laboratoire de Biochimie et de Biotechnologies Marines de Kenitra (Maroc), pour l'intérêt que vous portez à ce projet depuis ses débuts. Je suis très honoré de votre présence ici en tant qu'examinatrice.

Je souhaite aussi vivement vous remercier Monsieur François Louvet, PRAG à l'École Nationale Supérieure de Céramique Industrielle de Limoges pour l'aide que vous m'avez apportée tant sur l'analyse de données que sur l'élaboration de plans d'expériences.

Je remercie également Madame Annette Roy, ingénieur de recherche au CRITT matériaux de Rochefort, pour la caractérisation thermomécanique des films plastiques synthétisés.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à Monsieur Jacques Christen, directeur de l'Incubateur du Limousin, pour ses précieux conseils apportés au projet Matibio, entreprise virtuelle lauréate créée dans le cadre du concours Campus Entrepreneur. J'en profite pour remercier tous ses co-fondateurs : Benoît Genestie, Sophie Lautrette, Géraldine Laverdan et Charlotte Moine.

Je tiens également à remercier le Pr. Rachida Zerrouki et le Dr. Vincent Sol pour leur amabilité et leur disponibilité à répondre aux problèmes mécanistiques rencontrés. J'adresse aussi tous mes remerciements au Pr. Michel Guilloton pour ses précieuses critiques et sa participation à la rédaction de publications. Une pensée spéciale est aussi dédiée au Dr. Robert Granet pour sa grande culture scientifique et toutes ses anecdotes de laboratoire. Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du LCSN avec lesquels j'ai passé tant d'agréables moments.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Conseil Régional du Limousin pour le confort et la grande sérénité que m'a apporté le financement de ces trois années de thèse sur le programme du Fond Social Européen.

Je souhaiterais enfin finir par une pensée envers mes proches, mes parents bien sûr pour leur soutien tout le long de mes études, ma petite sœur Coralie et toute ma famille. Je n'oublie pas non plus mes plus chers amis qui m'ont accompagné durant toutes ces années, Frank, Michel, Stéphanie, Thierry, François, Sybille, Hélène, Brice...

# Table des matières





# Table des matières

---

<b>Introduction Générale .....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre I : Partie Bibliographique .....</b>	<b>9</b>
<b><i><u>I. Les bases de la classification des grandes lignées d'algues .....</u></i></b>	<b><i><u>9</u></i></b>
<b><i>1. La pigmentation .....</i></b>	<b><i>9</i></b>
1.1. Les chlorophylles .....	10
1.2. Les phycobiliprotéines .....	10
1.3. Rôles fonctionnels de la pigmentation .....	12
<b><i>2. Les polysaccharides de réserve.....</i></b>	<b><i>16</i></b>
2.1. L'amidon.....	16
2.1.a. L'amylopectine.....	16
2.1.b. L'amylose.....	17
2.2. Les laminarines .....	17
<b><i>3. Les polysaccharides pariétaux.....</i></b>	<b><i>18</i></b>
3.1. La phase fibrillaire .....	18
3.2. La phase matricielle .....	19
3.3. Rôles biologiques des polysaccharides extracellulaires .....	19
<b><i>4. Classification des principales lignées d'algues.....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b><i><u>II. Les Rhodophycées, des producteurs de composés à potentialités biotechnologiques .....</u></i></b>	<b><i><u>22</u></i></b>
<b><i>1. Habitat et diversité .....</i></b>	<b><i>22</i></b>
<b><i>2. Classification.....</i></b>	<b><i>22</i></b>
<b><i>3. Des molécules d'intérêt économique.....</i></b>	<b><i>23</i></b>
3.1. Les macroalgues .....	23
3.1.a. Les phycocolloïdes .....	23
i. Les carraghénanes .....	24
ii. Les agars.....	26
3.2. Les microalgues.....	27
3.2.a. Les pigments.....	27
3.2.b. Les antioxydants.....	27
3.2.c. Les acides gras.....	28
3.2.d. Des substances à activités biologiques .....	28
<b><i><u>III. Étude des polysaccharides extracellulaires sécrétés par les microalgues rouges .....</u></i></b>	<b><i><u>29</u></i></b>

<b>1. Informations générales sur les Porphyridiales.....</b>	<b>29</b>
1.1. Présentation des espèces.....	29
1.2. Culture en photobioréacteur .....	31
1.3. Une composition biochimique variable.....	33
1.3.a. Les acides gras.....	33
1.3.b. La pigmentation .....	33
1.3.c. Les polysaccharides .....	34
<b>2. Les polysaccharides extracellulaires des microalgues rouges, de nombreuses applications en chimie, biologie et biotechnologie.....</b>	<b>35</b>
<b>3. Méthodologie d'étude des polysaccharides anioniques.....</b>	<b>36</b>
3.1. Extraction .....	36
3.2. Étude de la composition des polysaccharides anioniques .....	38
3.2.a. Méthodes colorimétriques, dosage des oses neutres et acides uroniques.....	38
3.2.b. Méthodes chromatographiques.....	39
i. Hydrolyse des liaisons glycosidiques .....	39
ii. Méthodes de dérivation des sucres pour l'analyse par CPG .....	41
3.2.c. Taux de sulfatation .....	44
3.3. Analyse structurale des polysaccharides anioniques .....	45
3.3.a. Obtention d'oligosaccharides .....	45
i. Hydrolyse acide ménagée .....	45
ii. Autohydrolyse .....	47
iii. Dégradations chimiques spécifiques .....	48
3.3.b. Détermination structurale des oligosaccharides .....	52
i. Analyse infrarouge .....	52
ii. Analyse des liaisons glycosidiques .....	52
iii. Analyses RMN .....	54
iv. Spectrométrie de masse .....	56
<b>4. Composition et structure des polysaccharides extracellulaires sécrétés par les microalgues rouges de la famille des Porphyridiaceae .....</b>	<b>59</b>

## **Chapitre II : Méthodologie d'extraction et de détermination structurale de polysaccharides extracellulaires sécrétés par les microalgues rouges.....67**

### **I. Extraction du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum* .....**

### **II. Caractérisation chimique .....**

    1. Composition centésimale..... 68

    2. Identification et dosages des monosaccharides par CPG..... 69

    3. Analyse infrarouge .....

    4. Détermination du taux de sulfate..... 72

### **III. Obtention d'oligosaccharides et détermination structurale .....**

    1. Hydrolyse chimique non sélective du polysaccharide .....

1.1. Hydrolyse acide ménagée.....	73
1.1.a. Suivi cinétique de l'hydrolyse.....	73
1.1.b. Séparation et caractérisation des structures libérées.....	75
1.2. Autohydrolyse.....	80
1.2.a. Obtention d'oligosaccharides.....	80
1.2.b. Séparation et caractérisation des différents fragments oligosaccharidiques.....	80
1.3. Acétolyse.....	86
<b>2. Rupture chimique sélective.....</b>	<b>87</b>
2.1. Dégradation au lithium.....	87
2.1.a. Obtention et caractérisation des fractions oligosaccharidiques.....	87
2.1.b. Analyse structurale des oligosaccharides.....	88
i. Étude de la masse moléculaire.....	88
ii. Analyse RMN des oligosaccharides.....	90
2.2. Dégradation alcaline en milieu réducteur.....	96
<b><u>IV. Proposition d'un modèle structural.....</u></b>	<b><u>100</u></b>
<b><u>V. Étude comparée des polysaccharides extracellulaires sécrétés par Rhodella reticulata et Porphyridium cruentum.....</u></b>	<b><u>105</u></b>
1. Extraction et caractérisation chimique du polysaccharide extracellulaire de Rhodella reticulata.....	106
1.1. Extraction du polysaccharide extracellulaire de Rhodella reticulata.....	106
1.2. Caractérisation chimique des différents résidus d'extraction.....	106
2. Obtention d'oligosaccharides et analyse structurale.....	108
2.1. Autohydrolyse.....	108
2.2. Dégradation au Lithium.....	109
<b><u>VI. Conclusion.....</u></b>	<b><u>113</u></b>
<b>Chapitre III : Une nouvelle voie de valorisation pour les phycocolloïdes : l'élaboration de matériaux plastiques ...</b>	<b>117</b>
<b><u>I. Données bibliographiques.....</u></b>	<b><u>117</u></b>
1. Une approche biotechnologique dans la synthèse de matériaux plastiques.....	118
1.1. Les polymères de synthèse.....	118
1.2. Des biopolymères d'origine bactérienne.....	119
2. Modifications chimiques de la cellulose.....	120
2.1. Les esters de cellulose.....	120
2.2. Les esters de cellulose à longues chaînes.....	121
<b><u>II. Résultats et discussion.....</u></b>	<b><u>126</u></b>
1. L'agar, un modèle d'étude.....	126
2. Essais préliminaires.....	127

2.1. Dissolution .....	127
2.2. Acylation .....	128
2.3. Purification et casting .....	129
2.4. Caractérisation des esters synthétisés .....	130
2.4.a. Rendement massique .....	130
2.4.b. Analyse IR .....	131
2.4.c. Degré de substitution .....	132
2.5. Essais préalables d'estérification .....	133
2.5.a. Influence de la température .....	134
2.5.b. Influence du temps de la réaction .....	135
2.5.c. Influence de la quantité de chlorure d'acide laurique .....	136
2.5.d. Conclusion préliminaire .....	137
<b>3. Analyse statistique .....</b>	<b>138</b>
3.1. Analyse en composantes principales (A.C.P.) .....	138
3.1.a. Description de la méthode .....	138
3.1.b. Centrage et réduction des données brutes .....	138
3.1.c. Matrice des corrélations .....	140
3.1.d. Projection des variables et des individus .....	141
3.1.e. Résultats et limites .....	143
3.2. Construction d'un plan d'expérience en carré gréco-latin .....	144
3.2.a. Principe .....	144
3.2.b. Définition des objectifs et des modalités des facteurs .....	144
3.2.c. Définition du modèle et construction du plan d'expérience .....	145
3.2.d. Dépouillement des résultats et représentation graphique .....	147
3.2.e. Analyse des résultats .....	151
3.2.f. Validation du modèle .....	153
3.3. Modélisation de la réaction d'estérification .....	154
3.3.a. Définition du modèle .....	154
3.3.b. Analyse mathématique des résultats .....	155
3.3.c. Analyse graphique du modèle .....	158
<b>4. Évaluation du comportement thermomécanique des films synthétisés .....</b>	<b>162</b>
4.1. Analyse thermique .....	162
4.2. Tests mécaniques .....	164
<b>5. Essais d'acylation de phycocolloïdes anioniques .....</b>	<b>171</b>
<b><u>III. Conclusion .....</u></b>	<b><u>174</u></b>
<b>Conclusion Générale .....</b>	<b>177</b>
<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>183</b>
<b><u>I. Matériel et procédures analytiques .....</u></b>	<b><u>183</u></b>
<b>1. Analyses .....</b>	<b>183</b>
1.1. Spectroscopie infrarouge .....	183
1.2. Spectroscopie UV Visible .....	183
1.3. Spectroscopie RMN .....	183

1.3.a. Appareillage utilisé pour l'analyse des oligosaccharides.....	183
i. COSY homonucléaire $^1\text{H}/^1\text{H}$ : .....	183
ii. COSY hétéronucléaire : .....	184
1.3.b. Appareillage utilisé pour la caractérisation des esters synthétisés .....	184
1.4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	184
1.5. Chromatographie.....	185
1.5.a. Chromatographie sur couche mince.....	185
1.5.b. Chromatographie en phase gazeuse .....	185
2. Réactifs et solvants.....	186
<b><u>II. Matériels biologiques .....</u></b>	<b>187</b>
<b><u>III. Méthodologie d'extraction et de purification des polysaccharides .....</u></b>	<b>187</b>
1. Dépigmentation.....	187
2. Extraction.....	188
3. Purification .....	188
<b><u>IV. Caractérisation chimique des polysaccharides extracellulaires.....</u></b>	<b>188</b>
1. Composition centésimale.....	188
1.1. Dosage des sucres totaux.....	189
1.2. Dosage des acides uroniques.....	189
2. Détermination du taux de sulfates par turbidimétrie .....	189
3. Identification et dosage des monosaccharides par CPG.....	190
3.1. Méthode des méthylglycosides O-triméthylsilylés .....	190
3.1.a. Méthanolyse .....	190
3.1.b. Triméthylsilylation .....	190
3.1.c. Analyses des dérivés méthylglycosides O-triméthylsilylés par CPG .....	190
3.2. Dosage du 3,6-anhydrogalactose.....	191
3.2.a. Hydrolyse réductive .....	191
3.2.b. Acétylation .....	191
3.2.c. Analyse par CPG.....	192
<b><u>V. Méthodes d'analyses des polysaccharides.....</u></b>	<b>192</b>
1. Hydrolyse acide ménagée .....	192
1.1. Protocole.....	192
1.2. Séparation des oligosaccharides.....	192
2. Auto Hydrolyse.....	193
2.1. Protocole.....	193
2.2. Séparation des oligosaccharides .....	193
3. Acétolyse.....	193
4. Dégradation au Lithium.....	194
4.1. Protocole.....	194
4.2. Séparation des oligosaccharides .....	194
5. Dégradation alcaline en milieu réducteur .....	195

5.1. Protocole.....	195
5.2. Séparation des oligosaccharides.....	195
<b><i>VI. Modification chimique – Synthèse d'esters d'agar</i></b> .....	<b>196</b>
1. <i>Solubilisation des phycocolloïdes dans le DMA</i> .....	196
2. <i>Synthèse des esters laurique</i> .....	196
3. <i>Mise en forme des films plastiques</i> .....	196
4. <i>Caractérisation des esters formés</i> .....	196
4.1. Analyse par spectroscopie infrarouge .....	196
4.2. Calcul du degré de substitution par RMN .....	197
5. <i>Tests thermomécaniques</i> .....	197
5.1. Essais de traction.....	197
5.2. Analyse thermique différentielle (DSC).....	198
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>201</b>
<b>Glossaire</b> .....	<b>219</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>223</b>
<b><i>I. Méthode de calcul de la concentration en oses neutres et acides uroniques</i></b> .....	<b>223</b>
<b><i>II. Méthode de calcul du DS par RMN-<sup>1</sup>H</i></b> .....	<b>224</b>
<b><i>III. Analyse en Composantes Principales (A.C.P)</i></b> .....	<b>225</b>
1. <i>Centrage et réduction des données brutes</i> .....	225
2. <i>Matrice des corrélations</i> .....	225
3. <i>Valeurs propres associées à la matrice des corrélations</i> .....	225
4. <i>Vecteurs propres associés à la matrice des corrélations</i> .....	226
5. <i>Calcul des composantes principales</i> .....	226
<b><i>IV. Régression linéaire</i></b> .....	<b>228</b>
1. <i>Méthode des moindres carrés</i> .....	228
2. <i>Calcul du coefficient de détermination R<sup>2</sup></i> .....	229

# Abréviations

---

ACP : Allophycocyanine

A.C.P : Analyse en composantes principales

AGal : 3,6-anhydrogalactose

AGPI : Acides gras polyinsaturés

A.U : Acide uronique

BSTFA : *N,O*-Bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide

CA : Acétate de cellulose

CAB : Acétate butyrate de cellulose

CCM : Chromatographie couche mince

COSY : COrrélation SpectroscopY

CPA : Acétate propionate de cellulose

CPC : Chlorure de cétypyridinium

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CTAB : Bromure d'hexadecyltriméthylammonium

DHA : Acide docohexaénoïque

DMA : *N,N*-diméthylacétamide

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DP : Degré de polymérisation

DS : Degré de substitution

DSC : Differential scanning calorimetry

EPA : Acide eicosapentaénoïque

Fuc : Fucose

Gal : Galactose

Glc : Glucose

GlcA : Acide glucuronique

GlcNac : *N*-acétylglucosamine

HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HMQC : Heteronuclear Multi Quantum Coherence

HPAE-PAD : High Performance Anion Exchange Pulsed Amperometric Detection

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography  
IR : Infra rouge  
O.N. : Ose neutre  
Man : Mannose  
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation  
MHDP : Méthahydroxydiphényle  
NOE : Nuclear Overhauser Enhancement  
PC : Phycocyanine  
PE : Phycoérythrine  
P.E : Polyéthylène  
PHB : Polyhydroxybutyrate  
PHBV : Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)  
PHV : Polyhydroxyvalérate  
PLA : Acide polylactique  
PP : Polypropylène  
PS : Polystyrène  
Rha : Rhamnose  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
ROESY : Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy  
Sacc : Saccharose  
SM : Spectroscopie de masse  
SOD : Super Oxyde Dismutase  
TOCSY : Total Correlation Spectroscopy  
TFA : Acide trifluoroacétique  
Tg : Température de transition vitreuse  
TMSCl : Chlorure de triméthylsilane  
Xyl : Xylose

\* : Voir glossaire



# Liste des figures

---

Figure 1: Structure des différentes chlorophylles.....	10
Figure 2: Structure des phycobilines.....	11
Figure 3: Structure de caroténoïdes. a) Fucoxanthine ; b) $\beta$ -Carotène.....	12
Figure 4: Capture et transmission de l'énergie lumineuse dans les antennes collectrices.....	12
Figure 5: Disposition des phycobilines dans un phycobilisome.....	13
Figure 6: Cycle des xanthophylles contre la photo-oxydation.....	14
Figure 7: Absorption des radiations du spectre visible par l'eau en fonction de la profondeur, d'après Gayral et Cosson, 1986. <sup>13</sup> .....	15
Figure 8: Structure branchée de l'amylopectine.....	16
Figure 9: Structure linéaire de la molécule d'amylose.....	17
Figure 10: Structure des laminarines. La laminarine (a) présente en position terminale une molécule de mannitol ; la chrysolaminarine (b) ne comporte qu'une chaîne de glucanes $\beta$ -1,3 qui peut être ramifiée en $\beta$ -1,6 dans le cas du paramylon.....	18
Figure 11: Variation de la composition polysaccharidique en acides uroniques et en sulfates en fonction de l'étagement de la végétation marine, d'après Kloareg et al., 1988. <sup>24</sup> .....	20
Figure 12: Structure des unités répétitives de différents types de carraghénanes.....	25
Figure 13: Structure du polymère d'agar et dénomination des dimères selon Araki, 1956. <sup>41</sup> .....	26
Figure 14: Schéma d'un photobioréacteur tubulaire, d'après Barnier et al., 1988. <sup>63</sup> 1 : Cuve de préparation des éléments nutritifs ; 2 : Bioréacteur ; 3 : Photobioréacteur solaire ; 4 : Cuve de récolte et/ou d'enrichissement.....	32
Figure 15: Structure du chlorure de cétypyridinium (CPC) et du bromure d'héxadécyltriméthylammonium (CTAB).....	37
Figure 16: Exemples de chromogènes.....	38
Figure 17: Dérivés furfuriques obtenus par déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques.....	38
Figure 18: Différents types de liaisons glycosidiques entre différentes unités osidiques.....	40
Figure 19: Préparation des méthylglycosides selon la méthode proposée par Kamerling et al., 1975. <sup>108</sup> .....	41
Figure 20: Équilibre mutarotationnel du glucose.....	42
Figure 21: Méthode de préparation des alditols acétates.....	43
Figure 22: Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides, d'après Kamerling et al., 1975. <sup>108</sup> .....	44
Figure 23: Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides, d'après BeMiller, 1967. <sup>115</sup> .....	46
Figure 24: Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide, d'après Timell et al., 1965. <sup>116</sup> .....	46
Figure 25: Catalyse intramoléculaire par un groupement carboxyle d'une liaison 1 $\rightarrow$ 4 précédant un acide uronique, d'après Ciancia et Cerezo, 1993. <sup>105</sup> .....	48

Figure 26: Dépolymérisation en milieu basique ou peeling d'un glycane lié en 1→4, d'après Lai, 2000. <sup>125</sup> .....	50
Figure 27: Dégradation alcaline en milieu réducteur d'un polysaccharide acide, d'après Lindberg et al., 1973. <sup>126</sup> .....	51
Figure 28: Libération des substituants R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> en milieu acide après la β-élimination, d'après Lindberg et al., 1973. <sup>126</sup> .....	51
Figure 29: Analyse de l'enchaînement des monosaccharides.....	53
Figure 30: Schéma représentant les corrélations <sup>3</sup> J <sub>H,C</sub> carbone/proton observées à partir du proton H-1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison glycosidique. ....	56
Figure 31: Matrices courantes pour l'analyse MALDI. ....	57
Figure 32: Principe du MALDI, d'après Karas et al., 1990. <sup>139</sup> .....	58
Figure 33: Principe de l'oxydation periodique. ....	60
Figure 34: Structure d'acides aldobiuroniques présents chez <i>Porphyridium cruentum</i> , d'après Heaney-Kieras et Chapman, 1976. <sup>141</sup> .....	61
Figure 35: Structure de sucres sulfatés présents chez <i>Porphyridium</i> sp., d'après Lupescu et al., 1991. <sup>146</sup> .....	61
Figure 36: Structures développées d'acides aldobiuroniques présents chez <i>Porphyridium cruentum</i> et <i>Porphyridium aerugineum</i> , d'après Percival et Foyle, 1979. <sup>140</sup> .....	63
Figure 37: Figure développée de l'acide aldobiuronique 3-O-(α-D-GlcpA)-L-Galp commun aux microalgues rouges.....	63
Figure 38: Méthodologie d'extraction et purification des polysaccharides extracellulaires. ....	68
Figure 39: Spectre IR du polysaccharide extracellulaire de <i>Porphyridium cruentum</i> . ....	71
Figure 40: Suivi par CCM de l'hydrolyse en fonction du temps (en min) du polysaccharide extracellulaire de <i>Porphyridium cruentum</i> par HCl 0,5 M. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2/1/1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	73
Figure 41: Suivi par CCM de l'hydrolyse en fonction du temps (en min) du polysaccharide extracellulaire de <i>Porphyridium cruentum</i> par CF <sub>3</sub> COOH à 0,05 M. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2/1/1 ; révélation orcinol sulfurique. ....	74
Figure 42: Composés 1 et 2 purifiés à partir de l'hydrolysate par l'acide trifluoroacétique du polysaccharide extracellulaire de <i>Porphyridium cruentum</i> . Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	75
Figure 43: Structure du composé 1.....	76
Figure 44: A gauche, agrandissement d'un spectre RMN hétéronucléaire <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMQC du composé 1 (δ <sup>1</sup> H=3,2-5,2 ppm et δ <sup>13</sup> C=55-100 ppm) ; à droite, agrandissement d'un spectre RMN <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H homonucléaire TOCSY du composé 1 (δ <sup>1</sup> H=3,2-5,2 ppm).....	77
Figure 45: Structure du composé 2.....	78
Figure 46: Spectres RMN homo et hétéronucléaires du composé 2. En haut à gauche : agrandissement d'un spectre HMBC entre δ <sup>1</sup> H=4,5-5,3 ppm et δ <sup>13</sup> C=55-90 ppm ; en haut à droite : agrandissement d'un spectre HMQC entre δ <sup>1</sup> H=3,2-4,2 ppm et δ <sup>13</sup> C=55-90 ppm ; en bas : agrandissement d'un spectre TOCSY entre δ <sup>1</sup> H=4,1-5,3 ppm et δ <sup>1</sup> H=3,2-5,3 ppm. 79	79

Figure 47: Autohydrolysats à 100°C pendant 6 heures du polysaccharide extracellulaire sécrété par <i>Porphyridium cruentum</i> . Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	80
Figure 48: Séparation par chromatographie échangeuse d'ions des fragments oligosaccharidiques obtenus par autohydrolyse du polysaccharide extracellulaire de <i>Porphyridium cruentum</i> . Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	81
Figure 49: Contrôle des hydrolysats d'autohydrolyse et hydrolyse au TFA par HPAE-PAD effectué sous un gradient de NaOH à 100mM (A) et NaOH/acétate de sodium à 1M (B) ; à t=0 min, A=99 %; t=15 min, A=90 %; t=40 min, A=80 %; t=50 min, A=50 %; t=60 min, A=99 %; débit 1 mL/min. ....	82
Figure 50: Oligosaccharides purifiés issus de l'autohydrolyse du polysaccharide extracellulaire sécrété par <i>Porphyridium cruentum</i> . A gauche : oligosaccharides retenus ; à droite : oligosaccharides non retenus. ....	83
Figure 51: Séquence de l'oligosaccharide <b>5</b> obtenu par autohydrolyse du polysaccharide extracellulaire sécrété par <i>Porphyridium cruentum</i> . ....	84
Figure 52: Agrandissement du spectre RMN hétéronucléaire <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMQC de l'oligosaccharide <b>5</b> entre δ <sup>1</sup> H=3,4-5,4 ppm et δ <sup>13</sup> C=60-106 ppm). ....	85
Figure 53: Oligosaccharides obtenus par dégradation au lithium dans l'éthylène diamine après purification sur colonne d'exclusion stérique Biogel-P2. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	87
Figure 54: Spectres MALDI des composés <b>Li 1</b> (A) et <b>Li 2</b> (B). ....	89
Figure 55: Séquence de l'oligosaccharide <b>Li 2</b> . ....	91
Figure 56: Spectres RMN <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H homonucléaire de l'oligosaccharide <b>Li 2</b> . A gauche, agrandissement d'un spectre COSY relayé entre δ <sup>1</sup> H=5,5-3,2 ppm ; à droite : agrandissement entre δ=5,5-3,15 ppm d'un spectre ROESY 400 ms. ....	91
Figure 57: Agrandissements de spectres RMN hétéronucléaires <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMQC des oligosaccharides <b>Li 2</b> (à gauche) et <b>Li 1</b> (à droite). A gauche, agrandissement δ <sup>1</sup> H=5,5-3,15 ppm et δ <sup>13</sup> C=106-59 ppm ; à droite, agrandissement δ <sup>1</sup> H=5,5-3,2 ppm et δ <sup>13</sup> C=105-60 ppm. ....	93
Figure 58: Séquence de l'oligosaccharide <b>Li 1</b> . ....	94
Figure 59: Structure des oligosaccharides <b>Li 1</b> et <b>Li 2</b> obtenus par dégradation au lithium dans l'éthylène diamine. ....	95
Figure 60: Profil chromatographique d'exclusion stérique (Biogel P-2) des oligosaccharides obtenus après 2 h de dégradation alcaline en milieu réducteur. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	97
Figure 61: Profil chromatographique d'exclusion stérique (Biogel P-2) des oligosaccharides obtenus après 8 h de dégradation alcaline en milieu réducteur. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	97
Figure 62: Structure de l'oligosaccharide <b>OligoNaOH/NaBH<sub>4</sub> 1</b> obtenu par dégradation alcaline en milieu réducteur. ....	98
Figure 63: Agrandissement du spectre RMN hétéronucléaire <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMQC de l'oligosaccharide <b>NaOH/NaBH<sub>4</sub> 1</b> entre δ <sup>1</sup> H=3,3-5,5 ppm et δ <sup>13</sup> C=60-105 ppm. ....	99
Figure 64: Motif de répétition hypothétique du polysaccharide extracellulaire de <i>Porphyridium cruentum</i> . ....	101

Figure 65: Oligosaccharides hypothétiques libérées par dégradation alcaline du polysaccharide de <i>Porphyridium cruentum</i> en milieu réducteur dans l'hypothèse d'un Gal lié en 1→4 au GlcA. ....	102
Figure 66: Spectre de masse MALDI de la fraction 1 de l'hydrolysats obtenu en milieu alcalin et réducteur. ....	103
Figure 67: Suivi en fonction du temps de l'autohydrolyse des polysaccharides extracellulaires de <i>Rhodella reticulata</i> (en haut) et <i>Porphyridium cruentum</i> (en bas). Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	108
Figure 68: Profils d'exclusion stérique sur colonne Biogel P-2 des dégradations au lithium dans l'éthylène diamine des polysaccharides de <i>Rhodella reticulata</i> (en haut) et <i>Porphyridium cruentum</i> (en bas). ....	110
Figure 69: Fractions oligosaccharidiques séparées sur colonne d'exclusion stérique. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH <sub>3</sub> COOH/ H <sub>2</sub> O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique. ....	111
Figure 70: Structure d'oligosaccharides obtenus après hydrolyse enzymatique d'Ulvane. ....	112
Figure 71: Motif de répétition hypothétique proposé pour le polysaccharide extracellulaire sécrété par <i>Porphyridium cruentum</i> . ....	113
Figure 72: Principe de la polycondensation chimique de l'acide lactique. ....	118
Figure 73: Structure des polyhydroxyalcanoates (PHAs). PHB= polyhydroxybutyrate ; PH= polyhydroxyvalérate ; PHBV= poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate). ....	119
Figure 74: Structure de plastiques à base d'esters de cellulose. ....	120
Figure 75: Principe de solvation de la cellulose dans le système de solvant DMA/LiCl, d'après Tosh et al., 2000. <sup>176</sup> ....	123
Figure 76: Synthèse en phase homogène d'esters de cellulose à longues chaînes, d'après Edgar et al., 2001. <sup>6</sup> ....	124
Figure 77: Structure du modèle agarose. ....	127
Figure 78: Estérification d'une unité osidique par du chlorure d'acide laurique. ....	128
Figure 79: Rôle du DMAP dans le déroulement de la réaction d'acylation. R=C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> ; R'=unité osidique. ....	129
Figure 80: Spectre IR de l'agar natif (en haut) et d'un agar estérifié de DS=3,2 pour un DS <sub>max</sub> =4 (en bas). ....	131
Figure 81: Spectre RMN- <sup>1</sup> H à 400 MHz d'un agar estérifié de DS=3,93. ....	132
Figure 82: Influence de la température sur le rendement massique et le DS. ....	134
Figure 83: Influence du temps de réaction sur le DS et le rendement massique. ....	135
Figure 84: Influence de la quantité de chlorure d'acide laurique, avec et sans DMAP sur le DS et le rendement. ....	136
Figure 85: Projection des variables dans les plans factoriels (1,2) et (1,3) représentatifs de plus de 75 % de l'information initiale. ....	142
Figure 86: Projection des individus et des variables dans les plans factoriels (1, 2) et (1,3). ....	143
Figure 87: A : disposition des essais dans le domaine expérimental défini à partir du carré latin ; B : stratégie consistant à ne faire varier qu'un seul facteur à la fois. ....	147
Figure 88: Tracé des effets moyens des facteurs sur le rendement massique. ....	150

<i>Figure 89: Tracé des effets moyens des facteurs sur le DS.....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 90: Adéquation entre le rendement mesuré et le rendement calculé.....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 91: Adéquation entre le DS mesuré et le DS calculé.....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 92: Surfaces de réponses et courbes d'isoréponses représentant le rendement pour des temps fixés en fonction de la température et du nombre d'équivalent de chlorure d'acide laurique.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 93: Surfaces de réponses et courbes d'isoréponses représentant le rendement massique pour des températures fixées en fonction du nombre d'équivalent de RCOCl et du temps de réaction.....</i>	<i>159</i>
<i>Figure 94: Surfaces de réponses représentant le rendement massique pour une quantité de chlorure d'acide fixée en fonction du temps et de la température.....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 95: Courbe d'isoréponse modélisant la variation du DS en fonction de la température et du nombre d'équivalent de chlorure d'acide laurique pour un temps de 5 min.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 96: Exemple d'analyse DSC sur un ester d'agar.....</i>	<i>163</i>
<i>Figure 97: Schéma d'une éprouvette haltère.....</i>	<i>164</i>
<i>Figure 98: Différents comportements de polymères à la traction.....</i>	<i>165</i>
<i>Figure 99: Évolution de la forme d'une éprouvette au cours d'un étirement.....</i>	<i>166</i>
<i>Figure 100: Effets moyens des facteurs sur l'allongement des films d'esters d'agar.....</i>	<i>169</i>
<i>Figure 101: Effets moyens des facteurs sur la contrainte à la rupture des esters d'agar.....</i>	<i>169</i>
<i>Figure 102: Motif structural du ι-carraghénane.....</i>	<i>171</i>
<i>Figure 103: Motif structural de l'alginate. G= acide α-L-guluronique; M= acide β-D-mannuronique.....</i>	<i>172</i>
<i>Figure 104: Spectres IR de phycocolloïdes natifs et estérifiés.....</i>	<i>173</i>
<i>Figure 105: Découpe d'haltères normalisés H3 dans un film plastique.....</i>	<i>197</i>



# Liste des tableaux

---

Tableau 1: Caractéristiques des principales lignées d'algues, d'après Reviers, 2002. <sup>8</sup> PC : phycocyanine ; PE : phycoérythrine ; ACP : allophycocyanines.....	21
Tableau 2: Classification de la division des Rhodophyta, d'après Van Den Hoek et al., 1996. <sup>32</sup> .....	23
Tableau 3: Méthodes de dérivation des monosaccharides.....	42
Tableau 4: Composition monosaccharidique (en % molaire) des différents résidus d'extraction isolés à partir de <i>Porphyridium cruentum</i> .....	69
Tableau 5: Bandes d'absorption caractéristiques du polysaccharide extracellulaire de <i>Porphyridium cruentum</i> , d'après Chopin et al., 1999 <sup>132</sup> et Knutsen et al., 1994. <sup>153</sup> .....	71
Tableau 6: Composition du polysaccharide extracellulaire sécrété par <i>Porphyridium cruentum</i> . ....	72
Tableau 7: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) constitutifs du composé <b>1</b> (D <sub>2</sub> O).....	76
Tableau 8: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) des monosaccharides constitutifs du composé <b>2</b> .....	78
Tableau 9: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) des monosaccharides constitutifs du composé <b>5</b> .....	84
Tableau 10: Composition osidique (en % molaire) des fractions issues de la dégradation au lithium dans l'éthylène diamine.....	88
Tableau 11: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) des monosaccharides constitutifs des oligosaccharides <b>Li 1</b> et <b>Li 2</b> . ....	92
Tableau 12: Analyse par CPG des dérivés (-)-2-butylglycosides triméthylsilylés obtenus à partir des oligosaccharides <b>Li 1</b> et <b>2</b> .....	95
Tableau 13: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) des monosaccharides constitutifs de l'oligosaccharide <b>OligoNaOH/NaBH<sub>4</sub> 1</b> . ....	98
Tableau 14: Tableau récapitulatif des différents oligosaccharides obtenus à partir de <i>Porphyridium cruentum</i> . ....	100
Tableau 15: Oligosaccharides identifiés par spectroscopie de masse MALDI à partir de la <b>Fraction 1</b> obtenue par dégradation alcaline en milieu réducteur.....	104
Tableau 16: Composition monosaccharidique (en % molaire) des différents résidus d'extraction isolés à partir de <i>Rhodella reticulata</i> . ....	106
Tableau 17: Composition des polysaccharides extracellulaires sécrétés par <i>Rhodella reticulata</i> et <i>Porphyridium cruentum</i> .....	107
Tableau 18: Composition molaire des différentes fractions oligosaccharidiques isolées après dégradation au lithium dans l'éthylène diamine du polysaccharide extracellulaire de <i>Rhodella reticulata</i> . ....	111
Tableau 19: Composition de l'agar Difco.....	126
Tableau 20: Influence de la dissolution sur l'obtention de films plastiques.....	128
Tableau 21: Tableau de données des différents essais.....	139
Tableau 22: Matrice des corrélations. ....	140

<i>Tableau 23: Définition des facteurs et de leurs modalités.</i>	145
<i>Tableau 24: Combinaison des différentes modalités des facteurs.</i>	146
<i>Tableau 25: Matrice d'expériences.</i>	146
<i>Tableau 26: Réponses mesurées sur des essais réalisés avec 1 éq/OH de DMAP.</i>	148
<i>Tableau 27: Réponses mesurées sur des essais réalisés sans DMAP.</i>	148
<i>Tableau 28: Estimation de la dispersion expérimentale au centre du domaine.</i>	149
<i>Tableau 29: Grille de dépouillement pour le rendement massique.</i>	149
<i>Tableau 30: Essais de validation pour la série avec DMAP.</i>	153
<i>Tableau 31: Essais complémentaires avec DMAP pour la construction des surfaces de réponse.</i>	155
<i>Tableau 32: Coefficients <math>a_i</math> relatifs au modèle pour le rendement et le DS.</i>	156
<i>Tableau 33: Comparaison des réponses observées et calculées à partir du modèle.</i>	156
<i>Tableau 34: Propriétés thermiques des esters d'agar.</i>	163
<i>Tableau 35: Propriétés mécaniques des films synthétisés avec DMAP.</i>	167
<i>Tableau 36: Caractéristiques mécaniques de films polymères commerciaux, d'après Trotignon, et al., 1996.<sup>194</sup></i>	168
<i>Tableau 37: Valeurs propres de la matrice des corrélations.</i>	226
<i>Tableau 38: Vecteurs propres associés à la matrice des corrélations.</i>	226
<i>Tableau 39: Coordonnées des individus.</i>	227



# Introduction générale



# Introduction Générale

---

L'environnement marin est un écosystème rendu unique en raison de la diversité des organismes qu'il abrite. Des estuaires aux fosses abyssales jusqu'aux sources hydrothermales, les algues font preuve d'une incroyable plasticité écologique. Une nouvelle espèce est d'ailleurs identifiée par semaine et des projections estimaient en 1994 que les 36 000 espèces répertoriées ne représentaient en fait que 17 % des 200 000 espèces supposées existantes.<sup>1</sup>

Utilisées depuis des millénaires par les populations littorales pour leurs hautes valeurs nutritives, les algues constituent aujourd'hui un enjeu majeur de développement économique. Ainsi, la masse monétaire brassée chaque année par l'industrie algale est croissante et estimée en 2003 entre 5,5 et 6 milliards de dollars.<sup>2</sup> Les principales substances extraites sont les polysaccharides de la famille des agars, des carraghénanes et des alginates dont les propriétés physicochimiques gélifiantes ou stabilisantes intéressent de nombreux secteurs industriels. Les domaines agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou textiles en ont valorisé près de 8 millions de tonnes en 2003 ce qui représente une valeur marchande supérieure à 2 milliards de dollars. Depuis plusieurs années, un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles substances d'intérêts biotechnologiques. Ainsi, sur le marché pharmaceutique et cosmétique, 30 % des substances actives ont été développées à partir de substances naturelles dont 10 % ont été isolées à partir d'organismes marins tels que les microalgues.

Les microalgues, végétaux inférieurs doués d'autotrophie\* par photosynthèse, participent activement à la production du dioxygène atmosphérique<sup>3</sup> et constituent le phytoplancton à la base de la chaîne alimentaire du milieu marin. Par leur taille de l'ordre du micromètre, leur temps de génération de l'ordre de la journée, leur diversité taxonomique\* (40 000 espèces dont 100 étudiées et 10 exploitées) et donc biotechnologique, les microalgues constituent un vivier pour de nouvelles applications scientifiques et économiques. Leurs particularités biochimiques les plus marquées concernent les lipides, les enzymes, les pigments et les polysaccharides. Ces molécules sont à la base de nombreux développements dans les domaines aussi variés que la santé, l'alimentation humaine ou animale, ou encore

l'environnement avec par exemple la production d'hydrocarbures, la mobilisation des nitrates ou du gaz carbonique.<sup>4</sup> Mais faute de données structurales suffisantes permettant d'établir des corrélations structures/fonctions, il est souvent difficile de définir des voies de valorisation innovantes et économiquement attractives.

Depuis plus de 10 ans, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles s'intéresse à la valorisation chimique et biologique des polysaccharides produits par les végétaux supérieurs (cellulose, hémicelluloses). La Chimie des substances renouvelables a bénéficié au cours des dernières décennies des progrès de la Chimie organique contemporaine. Les spécialistes s'accordent d'ailleurs à penser que la biomasse trouvera à moyen terme une place de choix dans le panier d'énergie du futur<sup>5</sup> parce qu'elle constitue la seule matière première substituable au pétrole pour l'industrie pétrochimique en général et l'industrie de production de matières plastiques en particulier. Dans ce domaine, les polysaccharides des végétaux supérieurs ou phytopolysaccharides ont fait l'objet d'études détaillées. C'est notamment le cas de la cellulose<sup>6</sup> et, plus récemment, des hémicelluloses de la famille des xylanes.<sup>7</sup> De telles macromolécules peuvent servir de substrats à la réaction d'acylation et permettre, lorsqu'elles sont placées en présence de dérivés d'acide gras, la synthèse de matériaux qui présentent des propriétés élastiques et plastiques variables et dépendantes des conditions physicochimiques qui ont conduit à leur obtention. Si, comme l'atteste les nombreux travaux parus à ce sujet, rien ne s'oppose d'un point de vue théorique et pratique à la mise en œuvre d'une telle méthodologie, son développement reste suspendu à l'obtention des polysaccharides qui en sont à la base. Cette étape est malheureusement limitante. En effet, l'extraction des phytopolysaccharides fait appel à des procédés physicochimiques parfois contraignant et souvent polluant qui requièrent généralement la délignification par voie oxydative de la biomasse végétale et l'emploi de solutions alcalines concentrées. Une telle difficulté peut être aisément contournée en faisant appel aux polysaccharides hydrosolubles de la famille des phycocolloïdes. De telles macromolécules sont, à partir d'algues marines, facilement accessibles par de simples extractions à l'eau chaude. Parmi les biomasses disponibles, les microalgues rouges unicellulaires du genre *Porphyridium* sont des producteurs reconnus de polysaccharides extracellulaires sulfatés. Leur culture contrôlée en réacteur ouvert ou tubulaire est par ailleurs parfaitement contrôlé et offre à l'expérimentateur un accès durable à une matière première dont les coûts sont économiquement supportables.

Il nous a semblé opportun de nous engager dans une étude prospective dans ce domaine, le but étant d'identifier de nouvelles sources de polysaccharides qui pourraient se substituer aux phytopolysaccharides déjà utilisés lors de la réaction d'acylation par le chlorure d'acide laurique. Comme toute démarche de valorisation, la modification chimique des biomolécules impose un prérequis, la parfaite connaissance de la structure primaire et/ou tridimensionnelle de ces dernières. C'est pourquoi, dans une première partie, nous nous intéresserons à l'analyse de la structure d'oligosaccharides obtenus par des dégradations sélectives et non sélectives du polysaccharide natif de *Porphyridium cruentum* dont nous proposons un modèle structural théorique. Les microalgues rouges forment une famille assez large d'individus qui regroupent des espèces voisines présentant un certain nombre de caractéristiques morphologiques et chimiques communes. C'est notamment le cas de *Rhodella reticulata* avec laquelle nous avons engagé une démarche plus fondamentale dont l'objectif est d'utiliser la structure des polysaccharides extracellulaires de microalgues rouges comme marqueur taxonomique.

Une autre alternative à l'utilisation des polysaccharides sécrétés par les microalgues repose sur l'utilisation des agarophytes, macroalgues rouges productrices d'agar. De structure linéaire, homogène et répétitive, l'agar constitue également un substrat de choix que nous avons utilisé, dans une seconde partie, afin de mieux paramétrer la réaction d'acylation et d'en dégager un modèle mathématique prédictif dont nous avons extrapolé l'utilisation à d'autres phycocolloïdes (polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*, alginate, carraghénanes) ou phytopolysaccharides (pectines).



# Chapitre I

## **Partie bibliographique**





# Chapitre I : Partie Bibliographique

---

Ce travail s'articule autour de la valorisation chimique des phycocolloïdes d'algue rouge en une nouvelle gamme de matériaux plastiques. Après avoir défini quelques critères employés dans la taxonomie des algues, nous détaillons les potentialités offertes par les Rhodophycées et plus particulièrement par les microalgues rouges de la famille des Porphyridiaceae. En raison d'un manque de données structurales permettant la valorisation des polysaccharides anioniques extracellulaires sécrétés par ces algues, nous nous proposons de détailler la démarche menant à leur caractérisation.

## **I. Les bases de la classification des grandes lignées d'algues**

De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie\* des algues comme les structures cellulaires, le mode de nutrition, l'habitat ou même la nature et la localisation des pigments et glucanes de réserve. Malgré une extrême diversité et complexité structurale, tant d'un point de vue macroscopique que microscopique, les algues peuvent néanmoins être classées en une dizaine d'embranchements<sup>8</sup> selon des critères basés sur leurs compositions pigmentaires, leurs polysaccharides de réserve ou des caractéristiques structurales.

### **1. La pigmentation**

Les pigments ont dès le début du 19<sup>ème</sup> siècle constitué un critère important dans la classification des algues.<sup>9, 10</sup> Le rôle physiologique de ces molécules est de capter l'énergie lumineuse. Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, les plastes\* sont tantôt verts (Chlorophytes), tantôt jaunes ou bruns (Chromophytes), ou encore rouges (Rhodophytes).

## 1.1. Les chlorophylles

Les chlorophylles sont des macrocycles tétrapyrroliques métallés par du magnésium et substitués par une chaîne phytyle (Figure 1). Ces molécules impliquées dans les processus d'oxydoréduction photochimique des milieux biologiques assurent d'une part la collecte énergétique des photons, et d'autre part le transfert d'énergie permettant ainsi la transformation du dioxyde de carbone et de l'eau en molécules organiques. A l'origine de la photosynthèse, toutes les algues possèdent de la chlorophylle *a*. Malgré cette caractéristique commune, certains phylums se distinguent par la présence de chlorophylles *b* ou *d*. Les algues vertes renferment, comme les plantes supérieures et contrairement aux autres algues, de la chlorophylle *b* tandis que les algues rouges possèdent en faible quantité de la chlorophylle *d*.

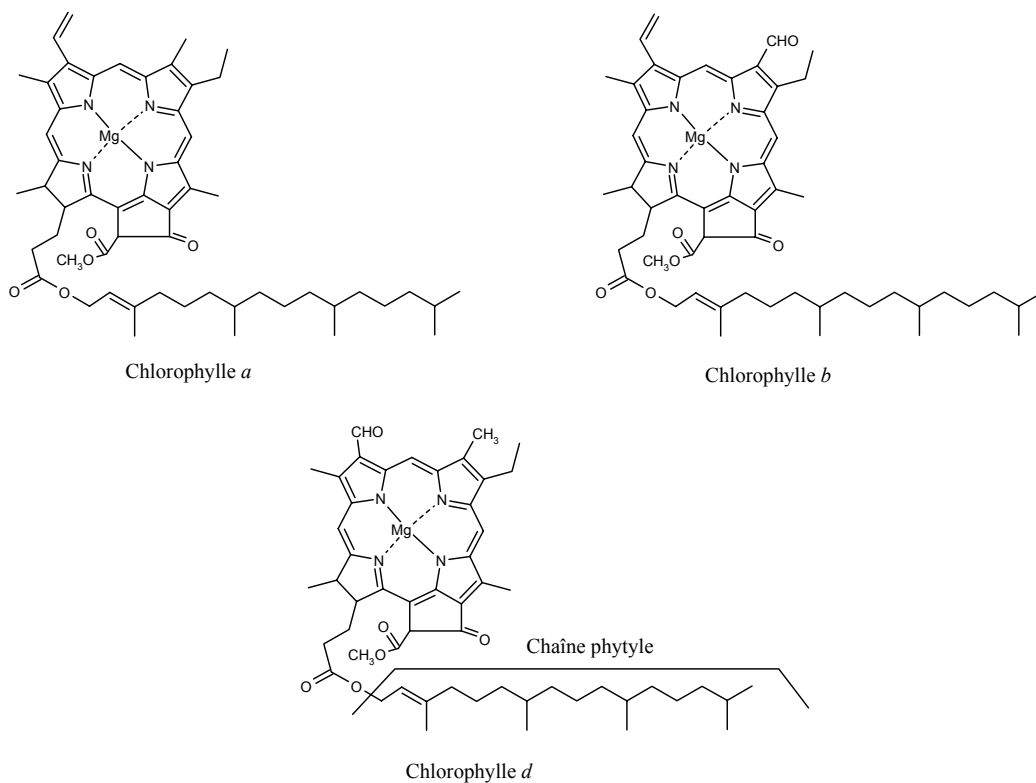


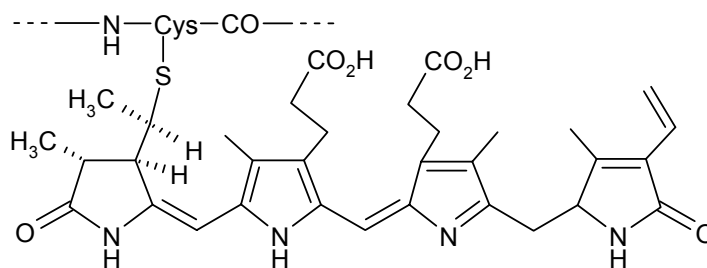
Figure 1: Structure des différentes chlorophylles.

## 1.2. Les phycobiliprotéines

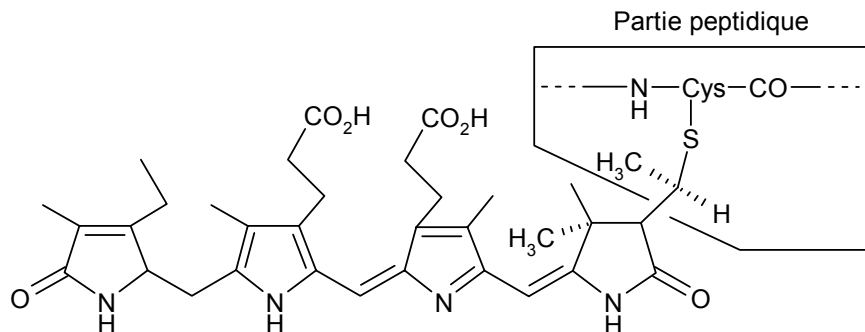
Les phycobiliprotéines sont des molécules hydrosolubles comportant une partie protéique liée de façon covalente à des chromophores ou bilines. Ces derniers sont composés de groupes tétrapyrroliques non cyclisés. On distingue trois familles de phycobiliprotéines, les phycoérythrine (rouges), les phycocyanine (bleues) et les allophycocyanine (bleu

turquoise) dont les chromophores sont respectivement les phycoérythrobilines, phycocyanobilines, et phycourobilines (Figure 2). Ces pigments peuvent coexister dans une même espèce, mais la phycoérythrine domine chez les Rhodophytes tandis que la phycocyanine est plus abondante et parfois seule présente chez les algues bleues (Cyanophytes). Localisés à la surface des thylacoïdes\* des algues rouges et bleues, ces pigments jouent le rôle d'antennes collectrices de photons. Leur rôle physiologique est de capter les photons de longueurs d'ondes différentes de ceux captés par les chlorophylles et de transférer cette énergie aux complexes chlorophylliens. La quantité de ces pigments varie en fonction de l'intensité lumineuse à laquelle sont exposées les cellules.<sup>11</sup>

**Phycoérythrobiline liée à un peptide (couleur rouge)**



**Phycocyanobiline liée à un peptide (couleur bleue)**



**Phycourobiline liée à un peptide (couleur bleue turquoise)**

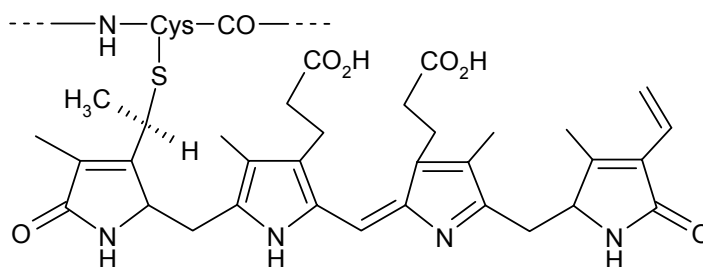


Figure 2: Structure des phycobilines.

### 1.3. Rôles fonctionnels de la pigmentation

La présence de certains pigments surnuméraires confère aux algues des propriétés particulières. La captation de l'énergie lumineuse s'effectue au niveau d'antennes collectrices. Ce sont des complexes multi protéiques et pigmentaires capables d'intercepter des photons de longueurs d'ondes variables. Chez les algues rouges, les antennes collectrices sont constituées de chlorophylles associées à des phycobilines (Figure 2) et à des caroténoïdes (Figure 3).

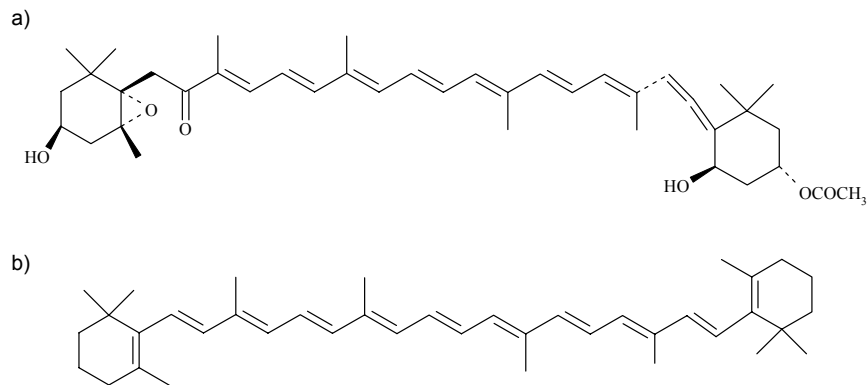


Figure 3: Structure de caroténoïdes. a) Fucoxanthine ; b)  $\beta$ -Carotène.

Lorsqu'un pigment absorbe un photon d'une longueur d'onde  $\lambda$ , un électron change d'orbitale moléculaire. Lorsque cet électron revient à son niveau d'énergie initial, il y a émission de fluorescence. Les pigments sont arrangés de telle sorte que l'énergie ne soit pas émise sous forme de fluorescence mais transmise à un autre pigment de l'antenne collectrice capable d'absorber des longueurs d'ondes plus grandes (Figure 4).

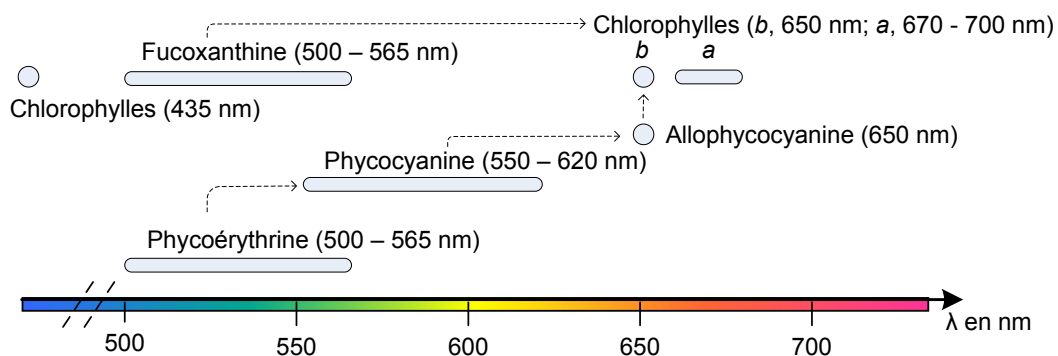


Figure 4: Capture et transmission de l'énergie lumineuse dans les antennes collectrices.

Ainsi, de proche en proche, l'énergie est transmise vers la chlorophylle *a* (Figure 5). Le rôle des caroténoïdes consiste en la protection de l'appareil photosynthétique contre la photooxydation. Lors des fortes intensités lumineuses, la violaxanthine est réduite (déépoxydée) en zéaxanthine. L'excès d'énergie non utilisée par l'antenne collectrice (Figure 4) est alors éliminé évitant, par la suite, la production d'oxygène singulet nuisible pour la cellule. Sous une intensité lumineuse réduite, la zéaxanthine est de nouveau oxydée en violaxanthine (Figure 6).

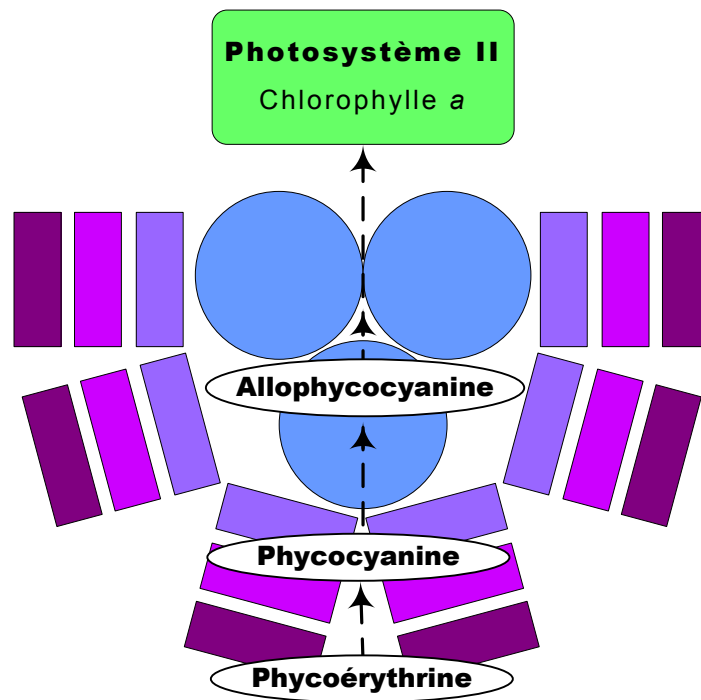


Figure 5: Disposition des phycobilines dans un phycobilisome.

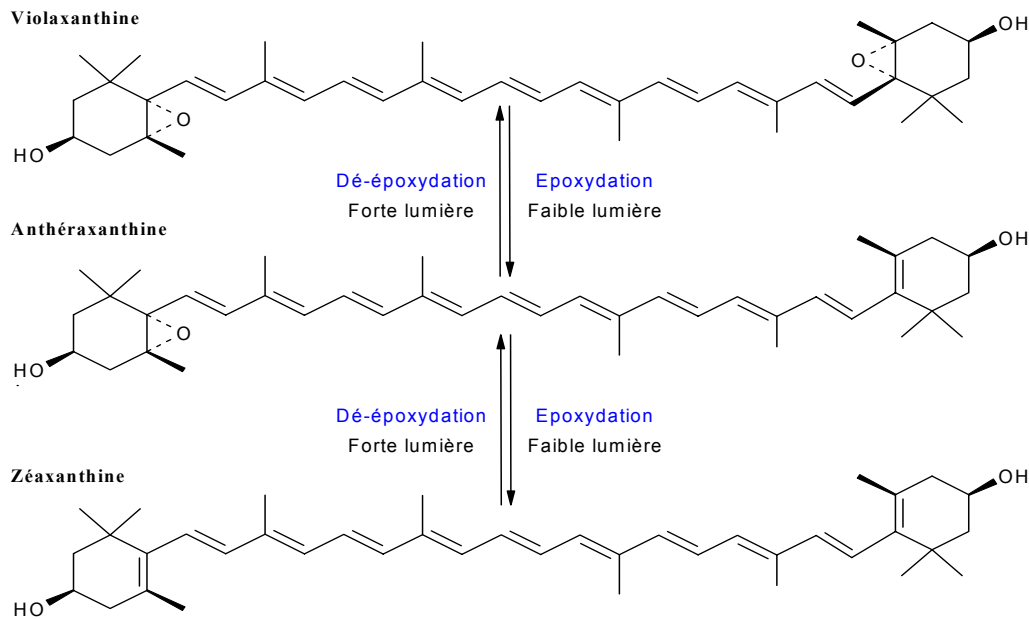


Figure 6: Cycle des xanthophylles contre la photo-oxydation.

Dès le début du 20<sup>ième</sup> siècle, il a été admis que la composition pigmentaire des algues marines benthiques\* soit la cause de leur répartition altitudinale. Ainsi, il était facile d'admettre que les algues vertes, riches en chlorophylle absorbant dans le rouge, étaient limitées aux zones peu profondes tandis que les algues brunes et rouges, possédant respectivement des caroténoïdes et des phycoérythrine absorbant dans le bleu-vert, étaient localisées plus profondément (Figure 7). Or cette répartition ne coïncide pas avec les observations. Saffo (1987)<sup>12</sup> pense que cette répartition dépend de l'intensité lumineuse et de la quantité totale de pigments. Il apparaît également que la capacité à capter de l'énergie lumineuse en profondeur soit également en relation avec la forme des algues et la présence de nutriments.

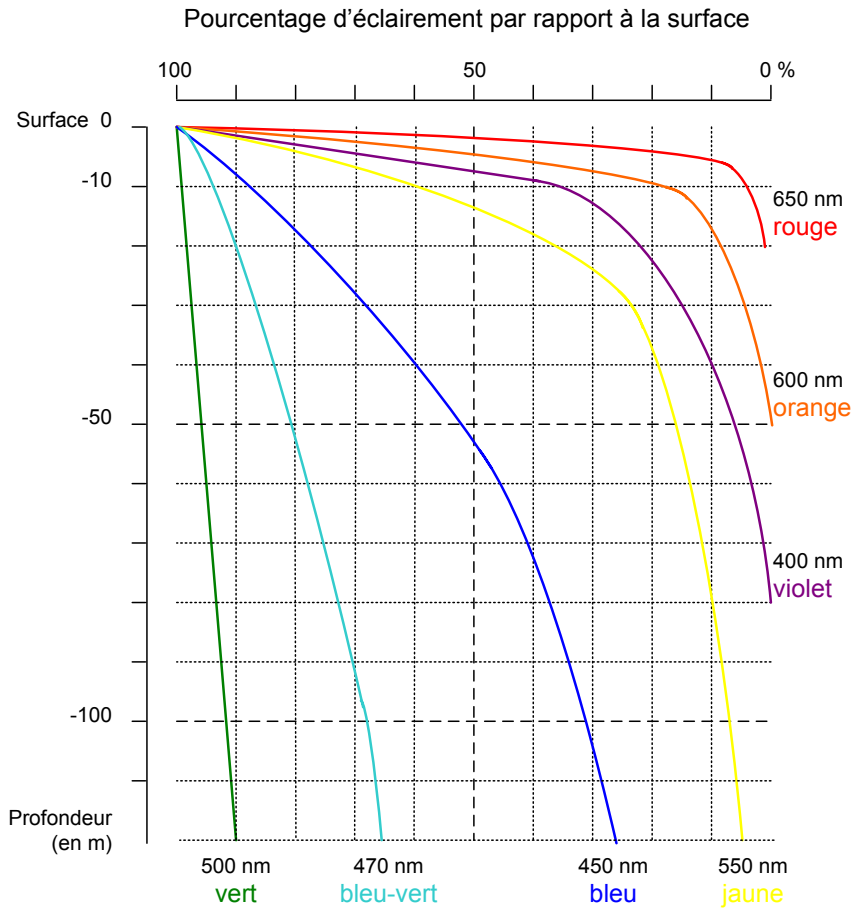


Figure 7: Absorption des radiations du spectre visible par l'eau en fonction de la profondeur, d'après Gayral et Cosson, 1986.<sup>13</sup>

## 2. Les polysaccharides de réserve

Rappelons que les polysaccharides ou glucanes sont des polymères de glucides qui résultent du mécanisme photosynthétique. Il en existe deux familles, les polysaccharides de réserve et les polysaccharides pariétaux. Il existe des glucanes de réserve solubles en solution dans les vacuoles\* et d'autres insolubles qui forment des grains observables en microscopie. Composés de D-glucose, les glucanes de réserve se rencontrent sous deux formes : liés en  $\alpha$ -1,4 ils appartiennent à la catégorie des amidons et liés en  $\beta$ -1,3 ils font parti de la catégorie des laminarines.

### 2.1. L'amidon

L'amidon est la forme principale de réserve carbonée chez les végétaux. Il est stocké en grande quantité sous forme de grains dans les organes de réserve dont la taille et la forme diffèrent selon les espèces végétales considérées. L'amidon est constitué d'amylose et d'amylopectine.

#### 2.1.a. L'amylopectine

L'amylopectine, constituant majoritaire du grain d'amidon (70 à 80 %), est formé de chaînes glucidiques liées en  $\alpha$ -1,4 ramifiées en  $\alpha$ -1,6 toutes les 12 unités glucidiques environ (Figure 8). La masse moléculaire élevée de ce polymère ( $10^7$  à  $10^8$  Da) dépend de l'origine et des conditions de culture du matériel biologique étudié.<sup>14, 15</sup>

**Amylopectine**

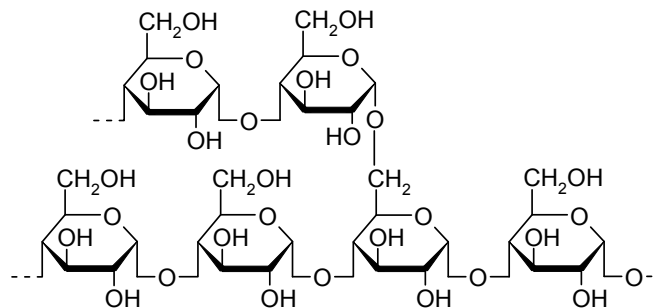


Figure 8: Structure ramifiée de l'amylopectine.



### 2.1.b. L'amylose

L'amylose constitue une fraction mineure du grain d'amidon (20 à 30 %). Polymère linéaire de glucoses liés en  $\alpha$ -1,4 (Figure 9) ayant une masse moléculaire comprise entre  $10^4$  et  $10^5$  Da, l'amylose a la particularité de présenter une affinité pour l'iode. En effet, le complexe iode-amylose se colore en bleu contrairement à l'amylopectine qui se colore en brun acajou en présence d'iode.

#### Amylose

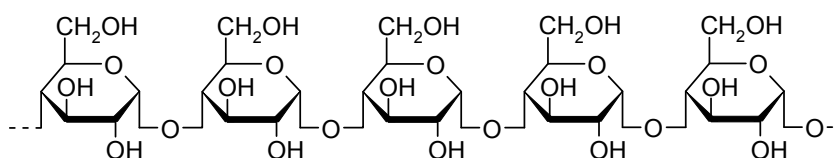


Figure 9: Structure linéaire de la molécule d'amylose.

Contrairement aux autres algues, les chlorobiontes, auxquels appartiennent les algues vertes, ont la particularité de contenir de l'amidon intraplastidial. Ainsi, en fonction de la localisation de la coloration de l'amidon par l'iode, il est possible de conclure quant à l'appartenance ou non de l'échantillon observé au règne des chlorobiontes. Des algues comme les algues rouges possèdent de l'amidon floridéen (glucane de réserve voisin de l'amylopectine) et se colorent en brun acajou par le lugol\*. En forme de grains dans le cytoplasme\*, il est ainsi possible de distinguer les Rhodophycées des Cryptophytes par exemple, dont les grains sont situés dans le compartiment périplastidial.

## 2.2. Les laminarines

D'autres glucanes de réserve de la famille des chrysolaminarines (Figure 10), composés de D-glucose liés en  $\beta$ -1,3 et plus ou moins ramifiés en  $\beta$ -1,6 ne répondant pas au test du lugol, sont spécifiques de certains embranchements tels que les Chromophytes (algues brunes).

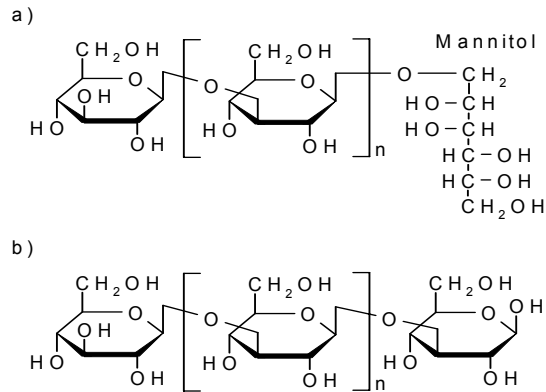


Figure 10: Structure des laminarines. La laminarine (a) présente en position terminale une molécule de mannitol ; la chrysolaminarine (b) ne comporte qu'une chaîne de glucanes  $\beta$ -1,3 qui peut être ramifiée en  $\beta$ -1,6 dans le cas du paramylon.

Une observation au microscope des algues permet une approche rapide de l'identification des algues par le test au lugol : les glucanes  $\alpha$ -1,4 colorables et les glucanes  $\beta$ -1,3 non colorables.

### 3. Les polysaccharides pariétaux

La classification des grandes familles d'algues repose également sur la nature chimique des colloïdes qu'elles produisent à la périphérie de leurs cellules.<sup>16</sup> La paroi des cellules végétales est parfois considérée par les biologistes comme un organe à part entière. La paroi des algues diffère significativement de celles des autres organismes végétaux par son organisation et sa composition. Elle peut être interprétée comme étant généralement une structure biphasique composée d'une phase fibrillaire cristalline squelettique et d'une phase matricielle dont les structures, de compositions variables selon les espèces, sont parmi les plus complexes connues dans la nature.<sup>17</sup>

#### 3.1. La phase fibrillaire

La phase fibrillaire est ordonnée et enrobée dans une matrice amorphe mucilagineuse, l'espace intercellulaire étant occupé par ce même mucilage. Les microfibrilles sont généralement composées de  $\beta$ -1,4-glucopyranoses qui forment des chaînes cellulosiques arrangées en feuillets et stabilisées par des liaisons hydrogènes.<sup>18, 19</sup> D'autres polymères comme des xylanes plus ou moins ramifiés participent, au même titre que la cellulose, à la structuration de la paroi cellulaire et protègent les cellules de l'hydrodynamisme auquel elles sont soumises.

### 3.2. La phase matricielle

La phase matricielle hydrosoluble, de nature mucilagineuse, parfois associée à des protéines est de nature très complexe. La matrice amorphe des Chlorophytes (algues vertes), constituée d'un polysaccharide polyanionique sulfaté<sup>20</sup> de haut poids moléculaire (entre 10<sup>5</sup> et 10<sup>6</sup> Da)<sup>21</sup> est composée principalement par des oses neutres (Xyl, Glc, Gal, Rha) et en plus faible quantité d'acides uroniques (GlcA, GalA). En l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'en rapporter la structure à une unité structurale plus ou moins répétitive. Seuls certains galactanes d'algues rouges (agars, carraghénanes) ou polyosides d'algues brunes (fucoïdanes, alginates) d'intérêts économique ont été caractérisés.

### 3.3. Rôles biologiques des polysaccharides extracellulaires

La lumière, indispensable aux organismes photosynthétiques, permet la synthèse des glucides utilisés comme agent de structuration des parois cellulaires ou comme polysaccharides de réserve. La forte proportion de composés polysaccharidiques extracellulaires anioniques sulfatés par rapport aux composés fibrillaires suggère que ceux-ci aient des rôles biologiques spécifiques en milieu marin.<sup>22-24</sup> Plusieurs hypothèses ont été envisagées à ce sujet.

Dans la zone de balancement des marées, les algues se trouvent émergées d'autant plus longtemps qu'elles sont situées en hauteur. Sur les côtes atlantiques, lors des fortes marées, certaines algues vont émerger près de 12 h. Ces conditions sélectives soumettent les algues à un stress hydrique important et induisent un gradient vertical de peuplement. La dessiccation, première conséquence de l'émersion, est amplifiée par le vent, la chaleur ou le gel. Certaines algues comme les *Porphyra* et les *Pelvetia* supportent très bien la déshydratation (jusqu'à plusieurs jours). Les polysaccharides anioniques situés au niveau des parois cellulaires sont responsables de cette résistance en limitant l'évaporation de l'eau dont ils sont imbibés.<sup>25</sup> *Laminaria hyperborea* illustre le rôle majeur des polysaccharides extracellulaires puisqu'elle sécrète activement du mucilage dès qu'elle est émergée. La majeure partie des travaux sur ce sujet a été réalisée chez les algues brunes où le rôle des galactanes sulfatés comme tampon vis-à-vis des variations de potentiel hydrique a été démontré.<sup>24</sup>

Une seconde conséquence de l'émersion est liée à la salinité. La dessiccation, ou au contraire la pluie, influent fortement sur la salinité du milieu et par conséquent sur la pression osmotique de la cellule. Bien qu'incapable de réguler sa pression osmotique à l'aide de

processus métaboliques, *Porphyra* résiste malgré tout à la contrainte. Les groupements anioniques associés aux polysaccharides extracellulaires contribueraient de façon passive à la régulation ionique en liant sélectivement des cations qui formeraient ainsi un gradient au travers de la paroi cellulaire.

Il a été par ailleurs démontré que la structure des polysaccharides pariétaux des Rhodophycées était corrélée à l'environnement physique.<sup>26</sup> Il existe en effet, une corrélation entre l'étagement de la végétation marine et la composition des mucilages en acides uroniques et en sulfates.<sup>24</sup> D'après Kloareg et *al.* (1988), il existe deux relations linéaires liant la profondeur avec le taux de sulfate et le taux d'acides uroniques respectivement. La première relation évolue négativement dans le cas des sulfates et la seconde positivement en fonction de l'étagement de la végétation marine dans le cas des acides uroniques (Figure 11).

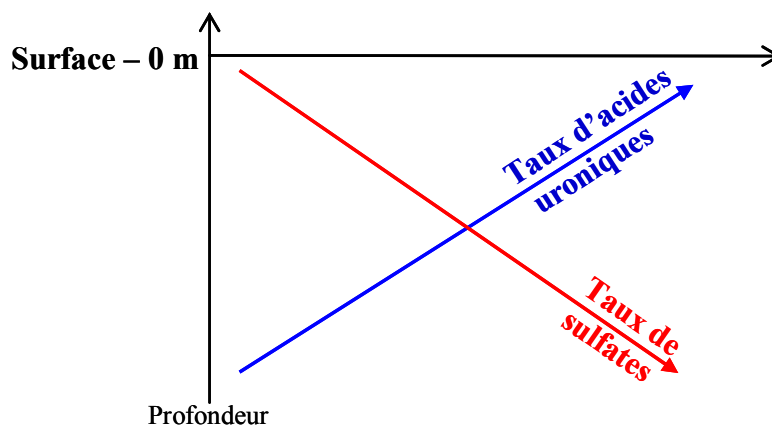


Figure 11: Variation de la composition polysaccharidique en acides uroniques et en sulfates en fonction de l'étagement de la végétation marine, d'après Kloareg et *al.*, 1988.<sup>24</sup>

#### 4. Classification des principales lignées d'algues

Ainsi, malgré leur extrême diversité et complexité tant structurale que morphologique, il est possible de réaliser, sur la base de caractères chimiques, une classification des principales lignées d'algues (Tableau 1).<sup>8</sup>

Tableau 1: Caractéristiques des principales lignées d'algues, d'après Reviere, 2002.<sup>8</sup>

PC : phycocyanine ; PE : phycoérythrine ; APC : allophycocyanines.

Embranchements	Caractéristiques		
	Type de Chlorophylles <sup>a</sup>	Phycobiliprotéines <sup>b</sup>	Polysaccharides de réserve
Bacillariophyta	<i>a, c</i>	-	<i>Chrysolaminarane</i>
Chlorophyta	<i>a, b</i>	-	<i>Amidon intraplastidial</i>
Chrysophyta	<i>a, c</i>	-	<i>Chrysolaminarane</i>
Cryptophyta	<i>a, c</i>	<i>PE</i>	<i>Amidon périplastidial</i>
Cyanophyta	<i>a</i>	<i>PC, PE</i>	<i>Glycogène</i>
Dinophyta	<i>a, c</i>	-	<i>Amidon cytoplasmique</i>
Euglenophyta	<i>a, b</i>	-	<i>Paramylon cytoplasmique</i>
Phaeophyta	<i>a, c</i>	-	<i>Laminarane, mannitol</i>
Rhodophyta	<i>a, d</i>	<i>PC, PE, APC</i>	<i>Amidon floridéen</i>
Xantophyta	<i>a, c</i>	-	<i>Chrysolaminaranes</i>

<sup>a</sup> voir Figure 1; <sup>b</sup> voir Figure 2.

## **II. Les Rhodophycées, des producteurs de composés à potentialités biotechnologiques**

De quelques micromètres de long pour les unicellulaires, la plupart des Rhodophycées mesurent quelques centimètres ou décimètres de longs et se rencontrent sous toutes les latitudes. Elles sont toutefois moins nombreuses dans les mers arctiques que dans les zones proches des tropiques. On en dénombre environ 4 000 espèces<sup>27</sup> réparties en 700 genres.<sup>28</sup>

### **1. Habitat et diversité**

En majorité marines, les Rhodophycées d'eau douce sont peu nombreuses et se rencontrent dans les eaux courantes et peu minéralisées. On n'en recense qu'une vingtaine de genres réparties en 150 espèces environ.<sup>29</sup> Les Rhodophycées sont majoritairement benthiques\* excepté 3 genres de Porphyridiales unicellulaires (*Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodorus*) qui sont planctoniques.<sup>30</sup> Généralement fixées sur les rochers, elles peuvent être épiphytes\*, endophytes\* (*Schmitziella endophloea*) ou parasites d'autres algues (*Polysiphonia lanosa*). Grâce à leurs pigments surnuméraires (phycoérythrine en particulier) qui leur permettent d'absorber dans le vert (entre 500 et 565 nm), elles peuvent vivre jusqu'à 250 m de profondeur.<sup>31</sup>

### **2. Classification**

Isolées des autres groupes d'algues car ne possédant pas de cellules flagellées, les Rhodophycées ou algues rouges forment un embranchement bien défini par un ensemble de caractères communs. En effet, les phycologues, sur des bases de phylogénie moléculaire, entre autres critères, s'accordent à considérer les algues rouges comme monophylétiques. Ainsi, les Rhodophycées se répartissent en deux classes, celle des Floridophycideae comprenant 10 ordres et 23 familles, et celle des Bangiophycideae subdivisée en 3 ordres et 6 familles (Tableau 2).<sup>32</sup>

Tableau 2: Classification de la division des Rhodophyta, d'après Van Den Hoek et al., 1996.<sup>32</sup>

Classe des Bangiophycideae	Classe des Floridophycideae	
<b>Ordre Porphyridiales</b>	<b>Ordre Batrachospermales</b>	<b>Corallinales</b>
<i>Famille Porphyridiaceae</i>	<i>Famille Batrachospermaceae</i>	Corallineaceae
Goniotrichaceae	<b>Palmariales</b>	<b>Gigartinales</b>
<b>Compsopogonales</b>	Palmariaceae	Solieriaceae
Compsopogonaceae	<b>Nemadiales</b>	Gigartinaceae
Erythropeplidaceae	Acrochaetiaceae	Phylloporaceae
Boldiaceae	Nemaliaceae	Gracilareaceae
<b>Bangiales</b>	Helminthocladiaceae	<b>Rhodymeniales</b>
Bangiaceae	Chaetangiaceae	Champiaceae
	<b>Gelidiales</b>	<b>Ceramiales</b>
	<b>Bonnemaisoniales</b>	Ceramiaceae
	Bonnemaisoniaceae	Dasyaceae
	<b>Cryptonemiales</b>	Delesseriaceae
	Dumontiaceae	Rhodomelaceae
	Glosiphoniaceae	
	Cryptonemiaceae	
	Kallymeniaceae	
	Choreocolaceae	

### 3. Des molécules d'intérêt économique

Les algues ont été tout d'abord utilisées par l'homme pour son alimentation. Largement consommées en Extrême-Orient où elles sont utilisées comme légumes, elles sont de plus en plus utilisées dans les préparations alimentaires des pays occidentaux. En progression constante depuis 1984<sup>33, 34</sup>, la production des algues et des végétaux aquatiques a atteint près de 10 millions de tonnes en 2000 pour près de 6 milliards de dollars de chiffre d'affaire selon le Food and Agricultural Organisation (2003).<sup>2</sup>

#### **3.1. Les macroalgues**

##### **3.1.a. Les phycocolloïdes**

Les principales applications industrielles des phycocolloïdes sont liées à la structure macromoléculaire et à la charge des polysaccharides qu'elles contiennent. Ces caractéristiques leur donnent la possibilité de conférer aux produits dans lesquels ils sont associés une consistance plus ou moins épaisse ou gélifiée. Leurs structures sont décrites comme étant un squelette linéaire d'unités galactoses pouvant porter des substitutions (esters sulfates, méthyles, etc.).

### *i. Les carraghénanes*

Les carraghénanes sont principalement extraits des genres *Chondrus*, *Gigartina* et *Euchema*. Ils comprennent un groupe complexe de polysaccharides linéaires constitués de molécules de galactopyranoses alternativement liés en  $\beta$ -1,3 et  $\alpha$ -1,4 et plus ou moins substituées (20 à 38 % de sulfates). Les familles de carraghénanes ont d'abord été distinguées en fonction de leur solubilité dans une solution de chlorure de potassium<sup>35</sup> puis en fonction du nombre et de la position des sulfates sur le galactose de la partie glycanique.<sup>36</sup> Trois familles ont ainsi pu être regroupées selon la position des groupements sulfates et en fonction de la présence ou non de 3,6-anhydrogalactopyranose.<sup>36-38</sup>

#### *(i) Famille du $\kappa$ -carraghénane*

Les  $\kappa$ -carraghénanes résultent de liaisons  $\alpha$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 entre le D-Galp sulfaté en 4 et le 3,6-anhydro-D-Galp (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.-a**). Cette famille de polymère, la moins sulfatée des carraghénanes, offre des propriétés gélifiantes.

#### *(ii) Famille du $\iota$ -carraghénane*

Les  $\iota$ -carraghénanes sont caractérisés par la présence de deux groupements sulfates en position 4 d'un D-Galp et 2 d'un 3,6-anhydro-D-Galp respectivement (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.-b**). L'augmentation de la teneur en sulfate entraîne un pouvoir gélifiant inférieur aux  $\kappa$ -carraghénanes.

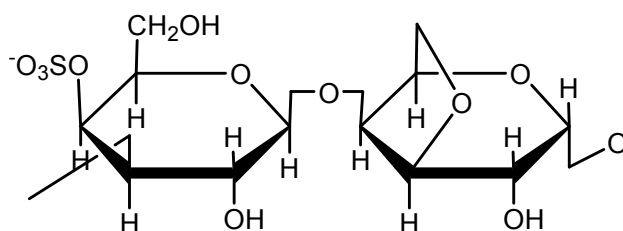
#### *(iii) Famille du $\lambda$ -carraghénane*

Les  $\lambda$ -carraghénanes sont sulfatés en position 2 et sont dépourvus de 3,6-anhydro-D-Galp (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.-c**). Ainsi, le polymère ne possède plus de propriétés gélifiantes mais des propriétés épaississantes.

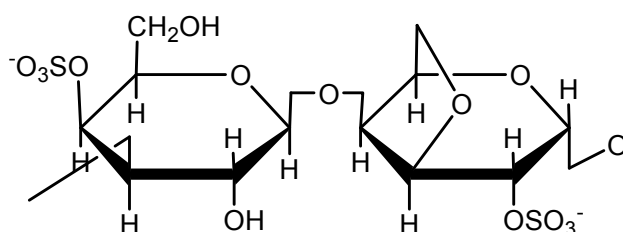
Dans la paroi des Rhodophycées, il n'existe cependant pas de structure pure de carraghénanes même si dans certaines algues une structure est majoritairement présente.



(a)  $\kappa$ -carraghénane



(b)  $\iota$ -carraghénane



(c)  $\lambda$ -carraghénane

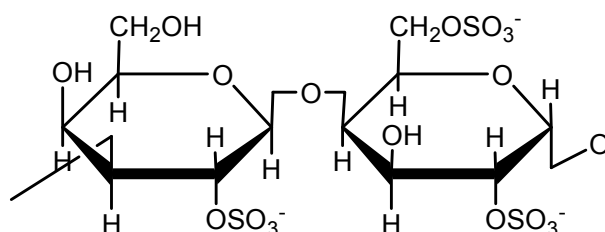


Figure 12: Structure des unités répétitives de différents types de carraghénanes.

Les carraghénanes possèdent une réactivité liée à l'abondance des groupements hydrophiles ( $-\text{OSO}_3^-$ ) et à la présence des ponts hydrophobes ( $-\text{CH}_2-\text{O}-$  de l'anhydrogalactose). Sous leur nom commercial E 407, ils sont employés sous forme de sels de Ca, Na ou K en tant qu'épaississant. Ils sont traditionnellement utilisés dans l'industrie laitière car ils interagissent avec la caséine du lait pour former un gel. Ils sont également utilisés afin de stabiliser les soupes ou des émulsions eau-graisse. Ils trouvent aussi des applications dans des secteurs industriels comme la cosmétique ou la pharmacologie. Leur principale utilisation non alimentaire est le dentifrice. Ils permettent de stabiliser l'émulsion de la pâte de dentifrice en bloquant l'abrasif à l'intérieur.

## ii. Les agars

Principalement extrait des Gracilaires et Gelidiales<sup>39, 40</sup> le groupe des agars comprend une vaste gamme de polysaccharides principalement constitués d'une unité répétitive disaccharidique constituée d'un D-Galp et d'un 3,6-anhydro-L-Galp respectivement liés en  $\beta$ -1,4 et  $\alpha$ -1,3<sup>41</sup> (Figure 13). Les agars peuvent être considérés comme des analogues des carraghénanes (et vice-versa) tant sur le plan chimique que biologique<sup>19</sup> et différent des carraghénanes par une plus faible quantité de sulfates (moins de 5 %).<sup>42</sup> Ces colloïdes, d'une masse moléculaire pouvant atteindre 1000 kDa<sup>43, 44</sup>, peuvent être selon leur origine<sup>19, 45, 46</sup>, leur âge<sup>47, 48</sup>, les saisons<sup>49-52</sup> ou leur méthode d'extraction<sup>53</sup> substitués par des groupements sulfates, méthyles, carboxyles ou pyruvates.<sup>54-56</sup> Leurs propriétés gélifiantes, variables en fonction de leur composition<sup>57, 58</sup>, sont dues aux conformations hélicoïdales des chaînes polysaccharidiques en milieu aqueux.

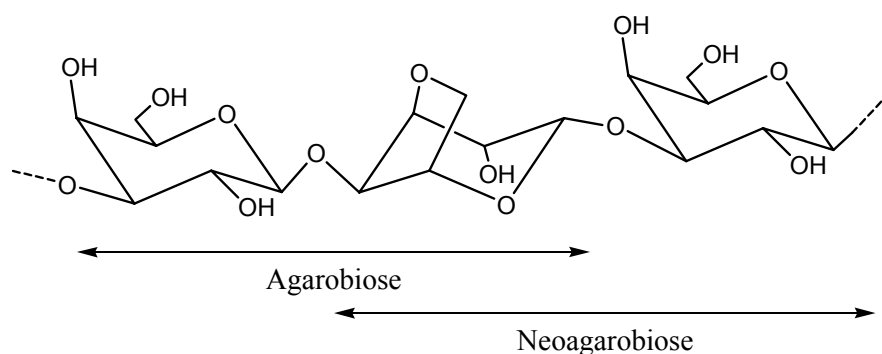


Figure 13: Structure du polymère d'agar et dénomination des dimères selon Araki, 1956.<sup>41</sup>

Ces polymères à haute valeur ajoutée ont, sous l'appellation E406, de nombreuses propriétés comme en témoigne les 111 000 tonnes de matière sèche d'agarophytes récoltées en 1998.<sup>59</sup> Soluble dans l'eau bouillante, les utilisations de l'agar résultent de son aptitude à former des gels à basse température. Ainsi, 90 % de la production d'agar est valorisée par les industries agro-alimentaires pour ses propriétés stabilisantes, gélifiantes et leurs faibles valeurs nutritionnelles. Les 10 % restant trouvent des applications en biotechnologie et bactériologie comme gels d'électrophorèse ou supports de cultures cellulaires.<sup>60, 61</sup>

## 3.2. Les microalgues

Les microalgues sont d'excellents convertisseurs d'énergie solaire en produisant un grand nombre de composés dont les potentialités industrielles font apparaître un large spectre d'applications touchant principalement à l'alimentation, la santé, l'environnement et même l'énergie. Contrairement aux macroalgues qui sont récoltées *in situ*, les microalgues sont exclusivement produites en culture ou dans des photobioréacteurs dans des conditions d'apports nutritifs stériles et contrôlés.<sup>62, 63</sup> Les coûts relativement élevés de ces productions orientent leurs utilisations vers des applications à haute valeur ajoutée.

### 3.2.a. Les pigments

Les pigments qui retiennent les plus grands intérêts sont les phycobiliprotéines (Figure 2) et les caroténoïdes (Figure 3). Les propriétés colorantes et fluorescentes de la phycoérythrine (pigment rouge) et de la phycocyanine (pigment bleue) sont exploitées pour le diagnostic médical comme immunotraceurs.<sup>64</sup> Le marché annuel de ces pigments, principalement extraits à partir de cyanobactéries (spiruline) et de microalgues rouges (*Porphyridium cruentum*), est estimé à 50 millions de dollars. De plus, la consommation directe des algues contenant ces pigments constitue un apport protéique essentiel chez les populations dont la ration alimentaire est pauvre en protéines d'origine animale.

Les caroténoïdes, quant à eux, au travers du  $\beta$ -carotène (pigment orange) et de l'astaxanthine (pigment rose) sont utilisés comme additifs et agents colorants dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques.

### 3.2.b. Les antioxydants

L'assimilation de l'oxygène par les organismes peut engendrer la formation de dérivés dangereux parmi lesquels l'oxygène singulet et les radicaux libres. Ces formes très réactives de l'oxygène ont un rôle important dans diverses pathologies chroniques (cancer, athérosclérose\*, arthrose\*, Parkinson...) ou aiguës (inflammation, choc septique...)<sup>65</sup>

Dans le domaine des applications biomédicales, l'activité anti-radicalaire des superoxydes dismutases (SOD) abondamment produits par *Porphyridium cruentum*<sup>66</sup> présente, outre l'intérêt économique de la culture de cette microalgue, un intérêt majeur dans le traitement de pathologies chroniques s'accompagnant d'une augmentation du taux de radicaux libres et de formes actives de l'oxygène telles que le SIDA et certaines formes de

cancers.<sup>67-69</sup> La question des thérapies antioxydantes est largement ouverte <sup>70</sup> comme en témoigne le développement en France d'un site de production de SOD à partir de la microalgue *Porphyridium cruentum* (sociétés Thallia et Scotia Pharmaceuticals). La formulation de soins cosmétiques, anti-âge en particulier, exploite les propriétés antiradicalaires d'origine microalgale.

### **3.2.c. Les acides gras**

Les triglycérides et les acides gras sont exploités industriellement pour des applications agroalimentaires ou pharmaceutiques. Ils ont notamment une importance dans la nutrition humaine et dans la prévention et le traitement de certaines maladies comme l'artériosclérose\*. Les huiles de poissons constituent la principale source de ces composés. Les lipides des microalgues partagent avec les huiles de poissons la présence d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI) de la série des  $\omega 3$  tels que l'acide eicosapentaénoïque ou EPA (20 :5  $\omega 3$ ) et l'acide docohexaénoïque ou DHA (22 :6  $\omega 3$ )<sup>71-73</sup> mais s'en distinguent soit, par une composition mono spécifique, soit par la présence de composés appartenant à d'autres séries comme la série des  $\omega 6$  avec l'acide arachidonique (20 :4  $\omega 6$ ) présent chez *Porphyridium cruentum*.<sup>74, 75</sup> Les huiles issues des microalgues trouvent un intérêt commercial lié à leurs faible taux de cholestérol et à la diversité de leurs AGPI <sup>76</sup> qui présentent l'avantage d'être inodores.

Les phospholipides constituent également une opportunité de valorisation intéressante des microalgues. Présents dans tous les organismes, ils participent à des fonctions cellulaires diverses. Sous le nom générique de lécithine, ils font l'objet d'une commercialisation importante dans les secteurs agroalimentaires et pharmaceutiques.

### **3.2.d. Des substances à activités biologiques**

Dans le domaine marin, la prospection de nouvelles substances ayant une activité biologique potentielle a été initiée dès les années 50 avec la détection de composés antibiotiques. Les investissements de firmes pharmaceutiques telles que Roche (Suisse), Sea Pharm (USA) ou Kirin Brewery (Japon) ont permis de mettre en évidence de très nombreuses molécules bioactives possédant des propriétés antivirales, antibiotiques et antiprolifératrices. L'étude des microalgues dans ce domaine n'a été que récemment initiée par Moore en 1988 <sup>77</sup> et Kellam en 1989 <sup>78</sup> et trouve désormais de nombreuses voies de valorisation.

Des activités antibiotiques <sup>77</sup> ont été décrites chez toutes les microalgues pour des classes de molécules extraites aussi bien en phase aqueuse qu'en phase organique. Si la majorité des tests réalisés *in vitro* montrent des activités intéressantes, leurs toxicités ou inactivités *in vivo* réduisent leurs potentielles applications médicales. De plus, les substances actives ont été rarement isolées et identifiées. Toutefois, ces composés peuvent servir de modèles moléculaires et orienter le criblage antibiotique vers la recherche de nouveaux principes actifs.

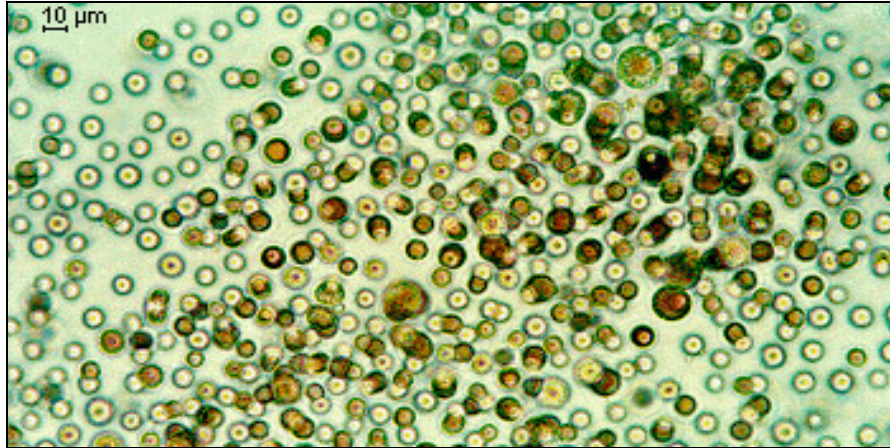
### **III. Étude des polysaccharides extracellulaires sécrétés par les microalgues rouges**

Rappelons que les microalgues sont des végétaux d'une dizaine de micromètres de long dont on ne distingue que quelques rares manifestations, notamment lors de leur prolifération active ou "bloom" lorsque les conditions climatiques sont favorables. Ainsi, on peut observer des marées rouges ou marées "sanglantes" quand une colonie de Porphyridiales s'échoue sur le rivage. Malgré de spectaculaires apparitions et une importance majeure dans l'écosystème planétaire avec la production de dioxygène, de biomasse et de substances nutritives, les microalgues restent un groupe de microorganismes largement inexplorés.

#### **1. Informations générales sur les Porphyridiales**

##### ***1.1. Présentation des espèces***

Les algues rouges unicellulaires sont les organismes eucaryotes phototrophes les plus primitifs de la division des Rodophyta. Elles font partie de la classe des Bangiophycideae et appartiennent à l'ordre des Porphyridiales. Les genres les plus connus sont les *Porphyridium* (Photo 1) et les *Rhodella* (Photo 2). Leurs cellules d'une couleur rouge variable selon l'âge et les conditions de culture sont enrobées dans une gaine mucilagineuse de nature polysaccharidique (Photo 3).



*Photo 1: Culture de Porphyridium cruentum.*



*Photo 2: Rhodella reticulata.*

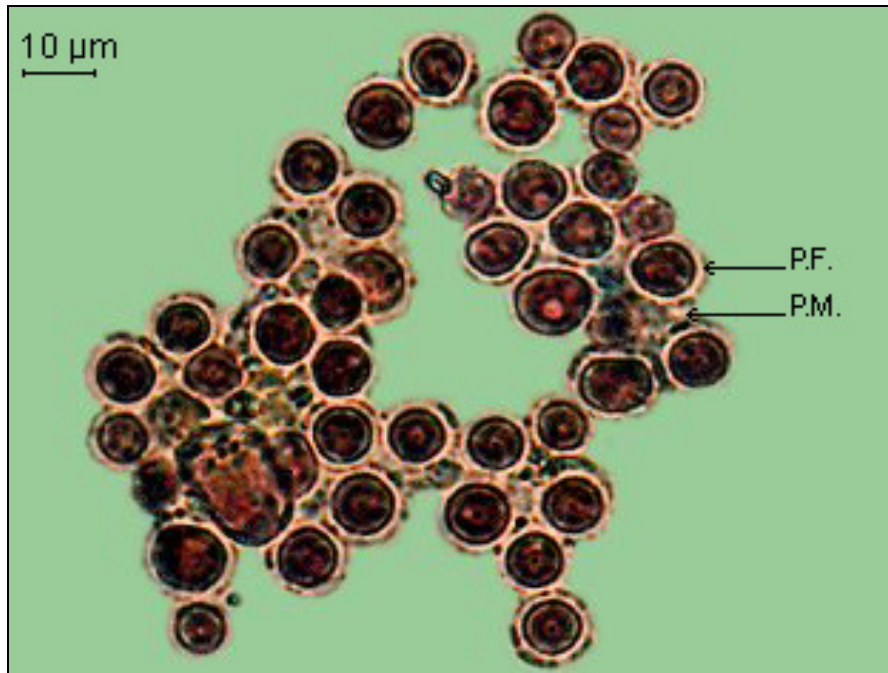


Photo 3: Vue en détail d'un mucilage d'une colonie de *Porphyridium cruentum*.

*P.F.* = Phase Fibrillaire ; *P.M.* = Phase Matricielle.

Les caractérisations des propriétés physico-chimiques de ces algues, dans le but d'une exploitation industrielle, sont en progression constante. De nombreuses études et brevets décrivent les conditions optimales de culture et les procédés d'extraction des composés d'intérêts.

## **1.2. Culture en photobioréacteur**

Les algues ont besoin de lumière pour se développer et nécessitent, comme les autres microorganismes, une maîtrise poussée de la microbiologie afin d'assurer des cultures exemptes de toute contamination. Les cultures peuvent être conduites "en batch" ou en photobioréacteur. Dans le premier cas, il s'agit d'inoculer un milieu stérile dans des conditions de pH, de salinité et de température ajustées afin d'éviter une contamination par des microorganismes parasites ou prédateurs.<sup>79</sup> S'ensuit alors la récolte en fin de croissance exponentielle. La productivité (quelques kg de matière sèche par mois) et les concentrations faibles nécessitent néanmoins des investissements et une main d'œuvre importante pour des coûts de revient variant entre 200 et 1 000 \$ US / Kg.<sup>80</sup>

Un photobioréacteur (Figure 14) comporte un récepteur solaire constitué d'une tuyauterie transparente en polypropylène dans laquelle circule un milieu de culture contenant les microalgues et les éléments nutritifs (CO<sub>2</sub>, nitrates, urée, sels d'ammonium...). Le système est alimenté ou non en continu par une eau de mer artificielle de concentration en NaCl supérieure à 0,2 M. Le pH du milieu nutritif est ajusté à 7,5 et enrichie en oligo-éléments tels que le phosphate, le potassium ou l'azote.<sup>81</sup> La température du milieu est thermostatée entre 20 et 30°C et l'éclairement contrôlé. La biomasse est ensuite acheminée vers une cuve de stockage ou d'enrichissement en fonction des composés à extraire puis dirigée vers une structure d'extraction.

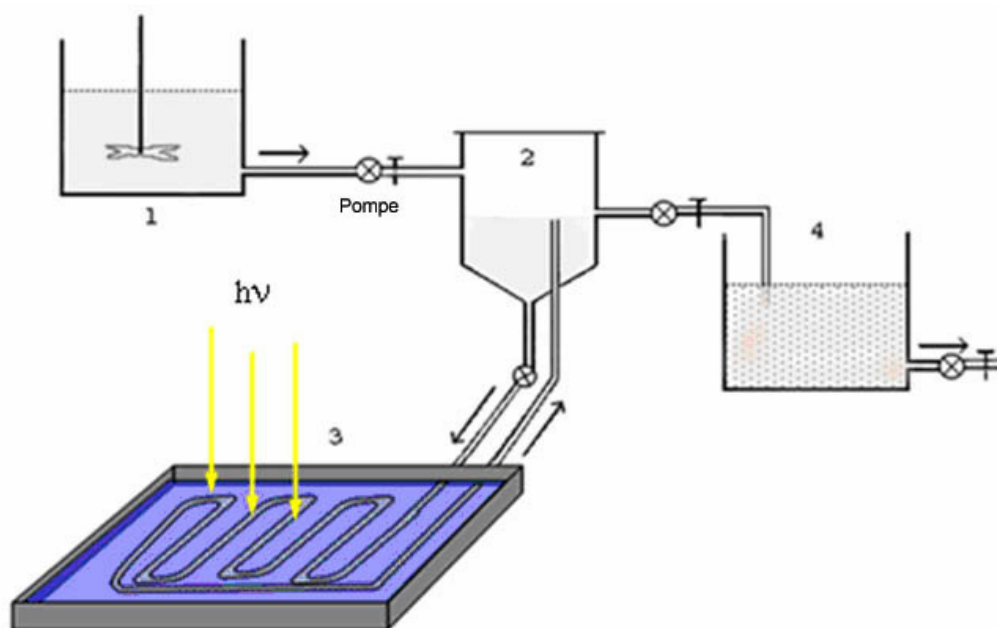


Figure 14: Schéma d'un photobioréacteur tubulaire, d'après Barnier et al., 1988.<sup>63</sup>

1 : Cuve de préparation des éléments nutritifs ; 2 : Bioréacteur ; 3 : Photobioréacteur solaire ;  
4 : Cuve de récolte et/ou d'enrichissement.

Contrairement aux cultures en batch, la culture en photobioréacteur développée pour l'aquaculture et pour un usage préparatif de molécules à haute valeur ajoutée (S.O.D., acides gras, phycoérythrine, ou polysaccharide) exige une grande technicité et un contrôle rigoureux du pH, des nutriments, de la température et du taux de dioxyde de carbone et d'oxygène. Il en résulte néanmoins une productivité nettement accrue pour un coût de revient très inférieur. La culture à grande échelle de microalgues rouges est aujourd'hui contrôlée et l'on est en mesure d'orienter la culture vers la formation d'un composé majoritaire d'intérêt économique en fonction des conditions de culture des cellules.



### **1.3. Une composition biochimique variable**

#### **1.3.a. Les acides gras**

Les microalgues marines sont souvent riches en acide gras poly-insaturés à longue chaîne qui peuvent constituer entre 9 et 14 % de la masse sèche.<sup>73</sup> Les Rhodophycées telles que *Porphyridium* contiennent majoritairement trois acides gras : un acide gras saturé, l'acide palmitique (16 :0) et deux acides gras poly-insaturés, l'acide arachidonique (20 :4 $\omega$ 6) et l'acide eicosapentaénoïque (20 :5 $\omega$ 3) qui représentent respectivement 32,5 %, 20,0 % et 9,5 % des acides gras totaux.<sup>82</sup> Ahern et *al.* en 1983<sup>74</sup> puis Cohen et *al.* en 1988<sup>83</sup> ont montré que la teneur en acides gras poly-insaturés chez *Porphyridium* augmente fortement en fonction des conditions de culture, notamment pour des températures comprises entre 5 et 15°C. Il est alors possible d'orienter la production vers un taux optimal de lipides poly-insaturés en entreposant la biomasse dans une enceinte réfrigérée en sortie du photobioréacteur.<sup>84</sup> Après cette étape d'enrichissement, les lipides sont extraits par un solvant organique usuel comme l'hexane ou le chloroforme.

#### **1.3.b. La pigmentation**

La coloration des microalgues, due à la présence combinée de caroténoïdes<sup>85</sup> et d'un excès de phycoérythrine par rapport à la chlorophylle<sup>86</sup>, est dépendante des conditions de culture. Des études *in vitro* ont montré que sous une faible énergie lumineuse, les algues augmentaient leur quantité de pigments. La nature de l'irradiation intervient également. En effet, les algues cultivées sous une lumière verte ajustent leur composition pigmentaire en produisant de la phycoérythrine.<sup>87</sup> Le taux d'irradiation lumineux influe sur le pouvoir métabolique de la cellule et donc sur la quantité de pigments, mais pas seulement. Frabregas et *al.* en 1998<sup>88</sup> ont montré que la concentration en pigments est limitée lorsque que le taux d'azote est élevé dans le milieu de culture. Il est également possible d'augmenter notablement le taux de phycoérythrine, dans le cas d'une culture en photobioréacteur, en paramétrant un taux de renouvellement élevé du milieu.

### ***1.3.c. Les polysaccharides***

Les microalgues rouges sont enrobées d'un polysaccharide hydrosoluble qui, lors de la phase stationnaire de croissance, s'accumule et rend le milieu de culture très visqueux.<sup>89</sup> L'influence des paramètres environnementaux et la composition du milieu de culture sur la production de polysaccharides sont bien documentées. Ainsi, un milieu de culture privé de nitrates et de sulfates inhibe complètement dans un cas et partiellement dans l'autre cas le développement cellulaire et, par conséquent, la sécrétion des polysaccharides extracellulaires chez *Rhodella*.<sup>90</sup> Par ailleurs, Arad et al. (1992)<sup>91</sup> ont observé une production importante de polysaccharides dans des conditions de cultures déficientes en azote et sulfate. You et al. (2004)<sup>92</sup> ont également montré qu'il existe une dépendance entre l'énergie lumineuse et la distribution spectrale de la lumière incidente sur le taux de production par *Porphyridium cruentum* de polysaccharides dans le milieu de culture. Il existe donc une gamme d'intensités lumineuses et de longueurs d'ondes, principalement la lumière bleue et la lumière rouge, dans laquelle il est possible d'accroître très significativement (de 10 à 50 %) le taux de sécrétion en polysaccharides.<sup>93</sup> Par ailleurs, le stress mécanique ou hydrodynamique engendré par les pompes des photobioréacteurs<sup>94</sup> ou un taux élevé de prélèvement de la biomasse s'opposent au développement des polysaccharides extracellulaires dans le milieu. Comme en attestent de nombreuses études, il est possible en fonction des conditions opératoires d'obtenir une production optimale de polymères au sein d'un photobioréacteur. De nombreux brevets décrivent également des processus de production et d'extraction. Le brevet de Barnier et al.<sup>63</sup> déposé en 1988 fait office de référence par sa simplicité et sa sélectivité vis-à-vis de l'extraction des polysaccharides extracellulaires qui représentent 70 à 75 % des polysaccharides totaux.

En terme de développement, les avantages des microalgues sont liés à leur court cycle de reproduction et à la possibilité de les cultiver dans des conditions précises afin d'en extraire les produits désirés.

## **2. Les polysaccharides extracellulaires des microalgues rouges, de nombreuses applications en chimie, biologie et biotechnologie**

Les polysaccharides sécrétés par les microalgues forment une gangue protectrice autour de la cellule en retenant l'eau et en piégeant les cations (Cf. § I.3.3). Ces propriétés d'adsorption ont suggéré des applications biotechnologiques dans le domaine de l'environnement au travers de la décontamination des milieux aqueux par les métaux lourds (Pb, As, Hg, Cd). Les caractéristiques physico-chimiques de ces polymères comme les propriétés viscosantes et lubrifiantes ont été mises en avance pour des applications antifriction en mécanique ou pour la clarification de l'eau ou la récupération assistée du pétrole.<sup>95</sup> Dans ce dernier cas, les polysaccharides sont utilisés pour leurs propriétés rhéologiques. Additionnés à l'eau de mer, ils permettent de diminuer la tension superficielle entre l'eau et le pétrole facilitant ainsi sa récupération. La viscosité de ces polymères en solution leur confère également un large spectre d'applications comme agents texturants ou stabilisants dans l'industrie agroalimentaire ou cosmétique.

Outre leurs capacités à former des gels en milieu aqueux, les polysaccharides extracellulaires des microalgues rouges sont connus pour leurs propriétés biologiques. Plusieurs travaux soulignent notamment l'activité antivirale du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium* sp.<sup>96-98</sup> Il a été montré que l'injection *in vitro* puis *in vivo* du polysaccharide extrait de *Porphyridium* sp inhibe, chez le rat et le lapin, l'infection cellulaire par les virus *Herpes simplex* et *Varicella zoster*. Le traitement des cellules infectées montre un taux d'inhibition optimal pour des concentrations faibles en polysaccharide (100 µg/mL). Des concentrations plus élevées, jusqu'à 2 mg/mL, n'ont par ailleurs pas montré d'effets cytotoxiques *in vivo*. Bien que le mécanisme de l'activité antivirale soit inconnu, plusieurs hypothèses ont été proposées. Le processus d'inhibition pourrait être lié à la sulfatation du polymère qui limiterait l'adhésion des virus à la surface cellulaire. Une seconde hypothèse, toujours relative à la charge du polymère, suggère que les polysaccharides anioniques exercent leur action en bloquant la synthèse des protéines virales.

Par ailleurs, les essais réalisés *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines issues du colon ont montré un taux d'inhibition supérieur à 95 % après 4 jours d'incubation en présence de polysaccharides.<sup>99</sup> L'effet de la consommation alimentaire de ce polymère sur la prévention du cancer du côlon a alors été réalisé *in vivo* chez le rat. Les résultats dans ce

domaine sont très prometteurs. La consommation de cette biomasse entraîne une diminution de 55 % de la taille et du nombre de tumeurs après 21 jours. Ainsi, un régime alimentaire contenant des polysaccharides sulfatés aurait un rôle bénéfique sur la santé en augmentant la quantité de muqueuses dans l'intestin.<sup>100</sup>

Malgré un intérêt grandissant, les données relatives à la structure chimique, les voies de synthèse ainsi que les propriétés biologiques des polysaccharides des microalgues demeurent incomplètes. L'émergence de la glycobiologie et les potentialités de développement de tels biopolymères dans des secteurs aussi variés que les secteurs agroalimentaires et médicaux justifient les études visant d'une part à caractériser la structure des polysaccharides issus des microalgues et, d'autre part, à établir des relations structures-fonctions.

### **3. Méthodologie d'étude des polysaccharides anioniques**

L'analyse structurale d'un polymère comprend plusieurs étapes : l'extraction, la purification, la détermination de la composition centésimale et molaire en monosaccharides et enfin, l'étude de la séquence en monosaccharides, la nature de leurs points de liaisons, leur anomérie et leur conformation. Les difficultés liées à l'analyse des polysaccharides sont généralement dues aux faibles quantités de matières extraites mais également au choix des méthodes de séquençage et de leurs combinaisons. L'analyse structurale des polysaccharides est un exercice souvent difficile ; elle nécessite la mise en œuvre de nombreuses méthodes complémentaires qui peuvent être chimiques et enzymatiques pour les dégradations, et physiques pour l'analyse.

#### **3.1. Extraction**

Compte tenu de la diversité des polysaccharides constitutifs de la paroi cellulaire, le protocole utilisé pour l'extraction des polysaccharides doit être suffisamment sélectif afin d'extraire une seule catégorie de macromolécules tout en préservant leur intégrité.

Il n'existe pas de protocole universel pour l'extraction des polysaccharides extracellulaires d'algues. Néanmoins, les procédés relatifs à l'extraction sélective des polysaccharides anioniques ont largement été décrit par Ramus (1972, 1973).<sup>18, 101</sup> Dans ce cas, les polymères anioniques isolés par extraction en solution aqueuse (à froid ou à chaud) sont précipités sélectivement par un sel de pyridinium (chlorure de cetylpyridinium, CPC) ou un sel d'ammonium quaternaire (bromure d'héxadécyltriméthylammonium, CTAB) (Figure

15). Ce fractionnement est fondé sur l'interaction ionique entre les ammoniums quaternaires et les fonctions acides. La chaîne aliphatique du sel permet quand à elle l'agrégation des polyanions et leur précipitation. Les complexes polysaccharide-cétylpyridinium ou polysaccharide-héxadécyltriméthylammonium ainsi formés sont lavés afin d'éliminer l'excès de sels. Le polysaccharide complexé est ensuite successivement dissocié dans des solutions de KCl ou CaCl<sub>2</sub> de concentration décroissante et précipité dans une solution d'éthanol. Cette étape permet de dissocier par échange d'ions le CTAB ou le CPC du polymère. Le polysaccharide est alors filtré, dialysé contre de l'eau distillée et enfin lyophilisé. Plusieurs types de cations mono- ou divalents peuvent être utilisés mais les sels de calcium ou de potassium semblent bien appropriés puisqu'ils sont solubles dans les solvants utilisés et facilement dialysables.

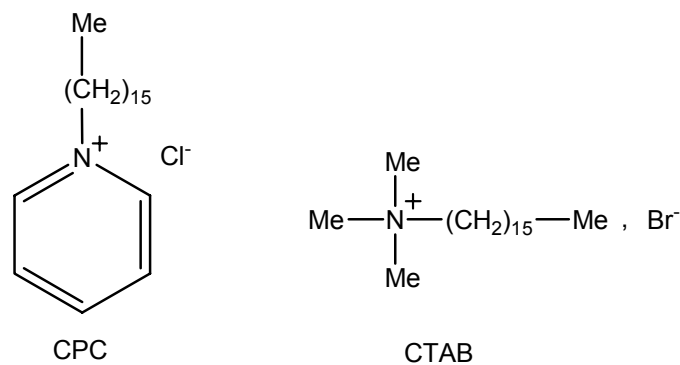


Figure 15: Structure du chlorure de cétylpyridinium (CPC) et du bromure d'héxadécyltriméthylammonium (CTAB).

En fonction de la nature de la biomasse, différentes variantes de ce protocole peuvent être adaptées. Il est par exemple souhaitable d'ajouter une étape de dépigmentation afin d'extraire préalablement toutes les molécules susceptibles de l'être, notamment les phycobilines qui sont hydrosolubles. Ainsi, on extrait à l'acétone les pigments hydrophobes et liposolubles (les chlorophylles ou caroténoïdes) puis les pigments hydrophiles par un solvant polaire comme l'éthanol ou l'isopropanol dans lequel les composés polysaccharidiques sont insolubles.

### 3.2. Étude de la composition des polysaccharides anioniques

Le dosage et l'identification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessitent la rupture de toutes les liaisons glycosidiques. L'analyse repose d'une part sur des techniques colorimétriques et d'autre part sur des techniques chromatographiques en phase gazeuse.

#### 3.2.a. Méthodes colorimétriques, dosage des oses neutres et acides uroniques

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.

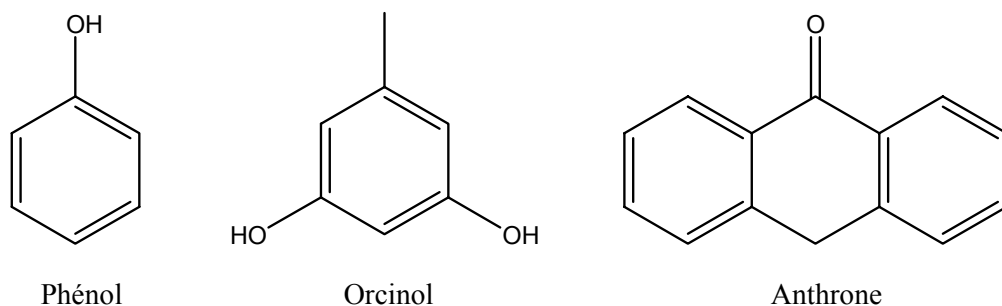


Figure 16: Exemples de chromogènes.

Le principe des dosages colorimétriques repose sur la condensation, par estérification, d'un chromogène (Figure 16) avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, 5-hydroxyméthylfurfural et de l'acide 5-formylfuroïque (Figure 17).

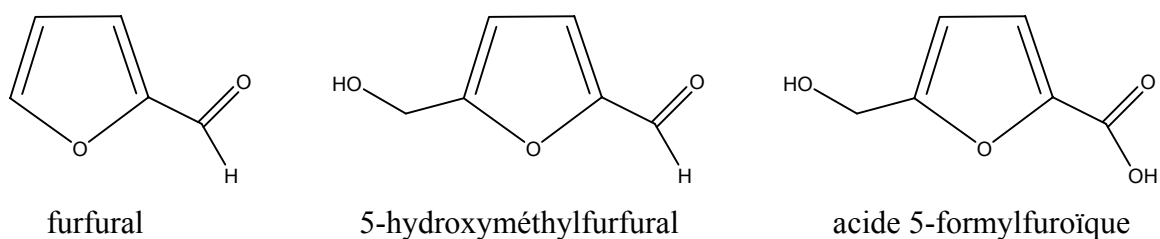


Figure 17: Dérivés furfuriques obtenus par déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques.

Les chromophores ainsi formés absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité de sucres présents. L'appréciation de la quantité de sucres totaux, mesurée selon la méthode de Dubois (1956)<sup>102</sup>, utilise le phénol plus sensible à la détermination quantitative des oses que des chromogènes tels que le naphthol ou l'anthrone. Le *mé*ta-hydroxydiphényle en présence de tétraborate de sodium a été utilisé comme chromophore sélectif lors du dosage des acides uroniques.<sup>103</sup>

Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques des solutions polysaccharidiques ont été déterminées par la méthode de correction développée par Montreuil et Spick (1963).<sup>104</sup> Il est alors possible de corriger les interférences des acides uroniques dans le dosage des sucres totaux et réciproquement.

### ***3.2.b. Méthodes chromatographiques***

Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse. Les monosaccharides libérés sont ensuite analysés aussi bien par HPLC que par CPG en utilisant diverses procédures de dérivation.

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

Le principe consiste à hydrolyser l'échantillon à analyser par un acide. La dépolymérisation peut être conduite avec des acides de forces et de concentrations variables sous diverses conditions opératoires (température, temps de réaction) selon la nature et la structure du polysaccharide. En effet, les différents types de liaisons osidiques présentent des taux d'hydrolyse variables en fonction de la stabilité relative des liaisons (1,6' > 1,4' > 1,3' > 1,2'). De même, la nature des liaisons glycosidiques entre deux unités osidiques contiguës présente une différence de stabilité par rapport au cas usuel de deux unités glucosidiques liées en 1,4' (Figure 18-I). Les liaisons glycosidiques entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique ou amine (Figure 18-II, III) seront plus difficiles à rompre que des liaisons entre un ose et un autre sous la forme furanose, anhydro ou deoxy (Figure 18-IV, V, VI).<sup>105</sup> Des acides minéraux forts peuvent être par exemple employés à chaud pour l'étude des dérivés cellulosiques mais, en raison des dégradations non spécifiques inhérentes à la force de l'acide, l'acide trifluoroacétique est préféré à l'acide sulfurique. Il présente de plus l'avantage d'être simplement éliminé par co-évaporation avec du méthanol.

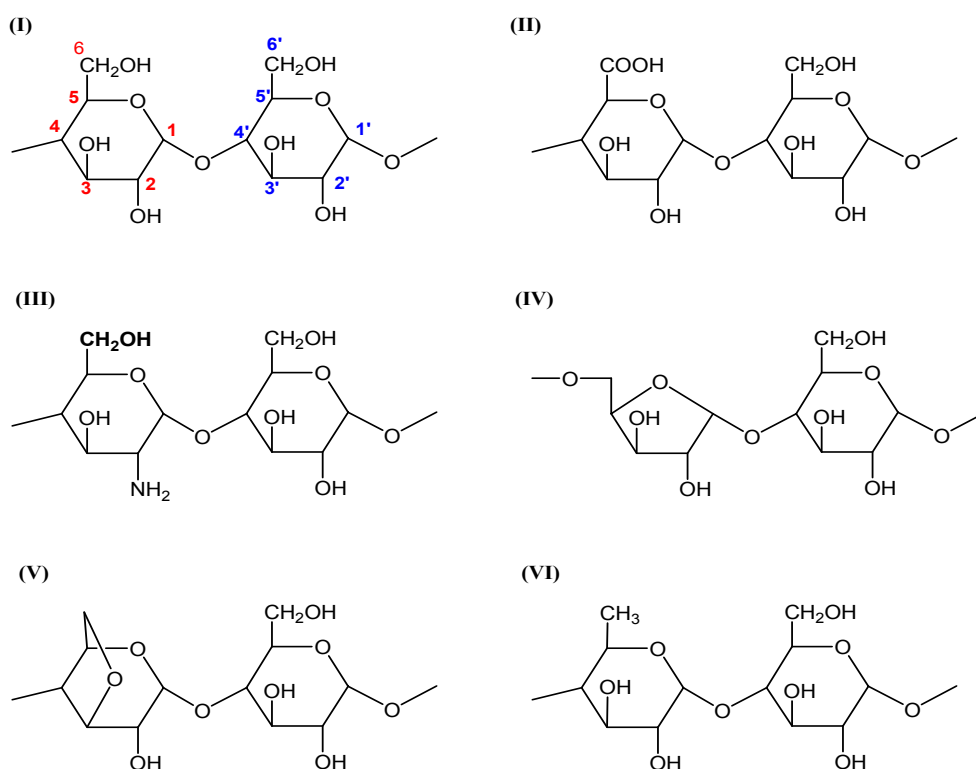
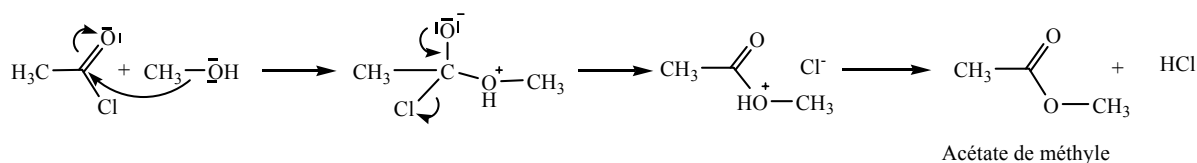


Figure 18: Différents types de liaisons glycosidiques entre différentes unités osidiques.

Le rendement d'hydrolyse est très dépendant des conditions opératoires. En effet, une température trop élevée du milieu réactionnel provoque la dégradation de certains oses, notamment le xylose.<sup>106</sup> La force de l'acide peut également entraîner une dégradation des acides uroniques par décarboxylation. La stabilité des monosaccharides libres en solution, variant fortement d'un ose à l'autre, nécessite la mise au point de conditions optimales d'hydrolyse pour chaque type de monosaccharides. Pour pallier aux difficultés d'une hydrolyse acide non quantitative, la méthanolyse a été choisie comme méthode de clivage efficace des liaisons glycosidiques entraînant peu de dégradation.<sup>107</sup> Ne pouvant être appliquée à l'analyse d'échantillons cristallins, la méthanolyse présente néanmoins l'avantage d'une conversion quasi-totale en méthylglycosides après 24 heures de réaction à 80°C en présence de méthanol chlorhydrique 1M (Figure 19). Les méthylglycosides présentent en outre une très forte stabilité en solution.



**a) Préparation du méthanol chlorydrique**



**b) Libération des O-méthylglycosides**

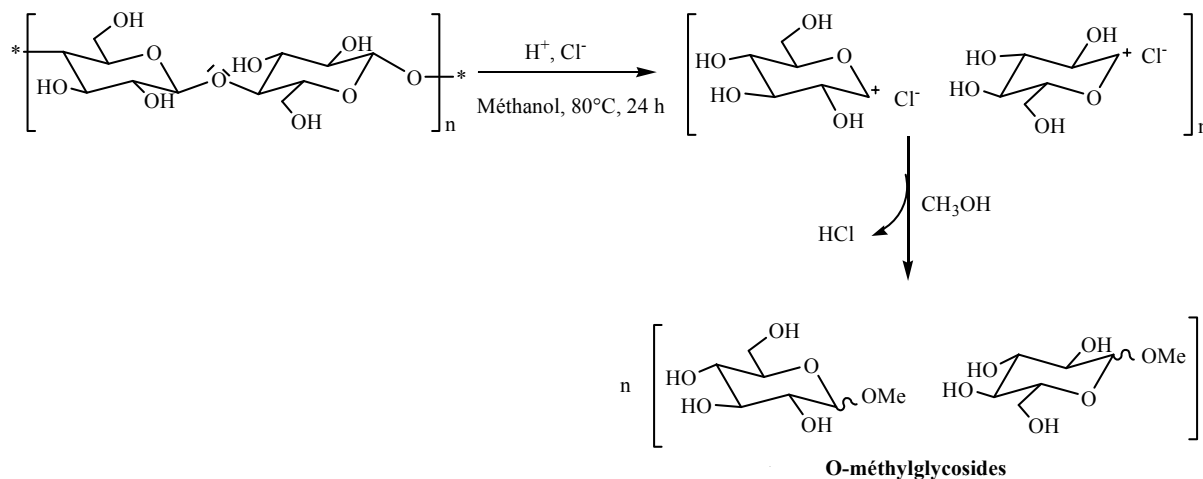


Figure 19: Préparation des méthylglycosides selon la méthode proposée par Kamerling et al., 1975.<sup>108</sup>

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

La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse rapide, qui du fait de sa grande sensibilité, et de sa capacité à séparer des mélanges complexes permet d'apprécier qualitativement et quantitativement la composition de différents extraits glucidiques. Contrairement à la chromatographie liquide haute performance qui permet de réaliser directement la séparation de différents monosaccharides, la chromatographie en phase gazeuse doit être réalisée sur des composés modifiés rendus plus volatils. Pour cela, les techniques de dérivation sont nombreuses (Tableau 3). Les méthodes les plus courantes sont 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. Les dérivés aldonitriles acétates et trifluoroacétates ont été également couramment décrits et les méthylloximes acétates sont parfois employés. Les produits volatils obtenus sont ensuite séparés sur colonnes capillaires puis détectés par CPG équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les phases

stationnaires utilisées pour la séparation des dérivés glucidiques sont apolaires et greffées par des dérivés siloxanes.

Tableau 3: Méthodes de dérivation des monosaccharides.

Méthodes de dérivation	dérivés
Pertriméthylsilylation	TMS
Acétylation	acétates
Trifluoroacétylation	trifluoroacétates
Réduction/acétylation	alditols acétates
Oximation/acétylation	aldonitriles acétates
O-méthoxylation/acétylation ou triméthylsilylation	O-méthoxyime acétates ou O-méthoxyime TMS

En fonction de la méthode d'analyse sélectionnée, les oses seront observés sous la forme d'un ou plusieurs pics. En effet, en solution, les oses existent en équilibre dynamique entre leurs formes cycliques et ouvertes. Lors de l'équilibre mutarotationnel, deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent être formés pour chacune des formes furanose et pyranose (Figure 20). Ainsi, jusqu'à quatre isomères peuvent être observés par monosaccharides.

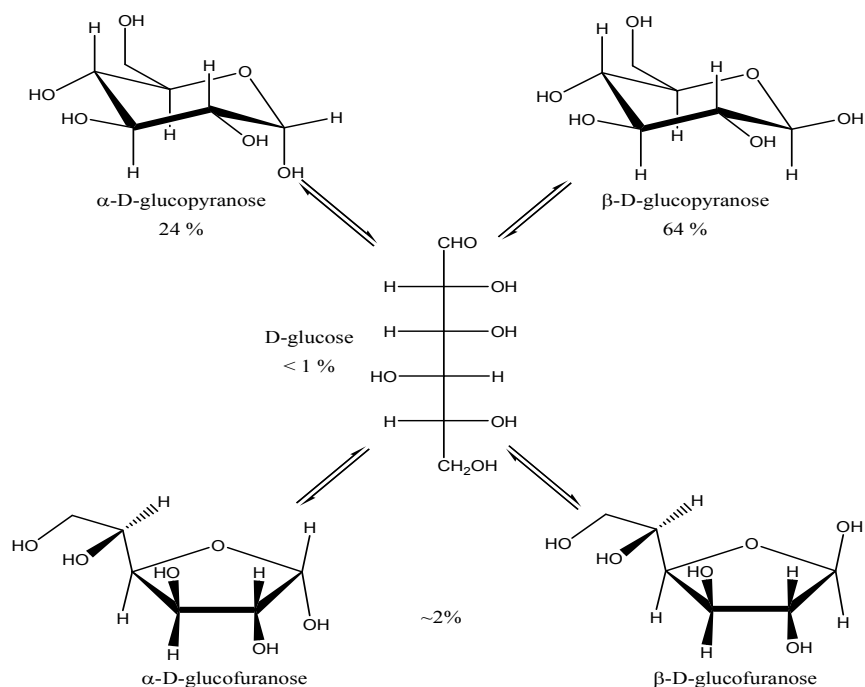


Figure 20: Équilibre mutarotationnel du glucose.

La méthode des alditols acétates nécessite la réduction préalable des monosaccharides par le borohydrure de sodium puis leur acétylation en présence d'anhydride acétique dans de la pyridine (Figure 21).<sup>109</sup> Cette méthode est très souvent employée du fait de la stabilité des composés formés et de leur bonne résolution chromatographique. Dans ce cas, chaque monosaccharide modifié sera identifié sous la forme d'un pic.

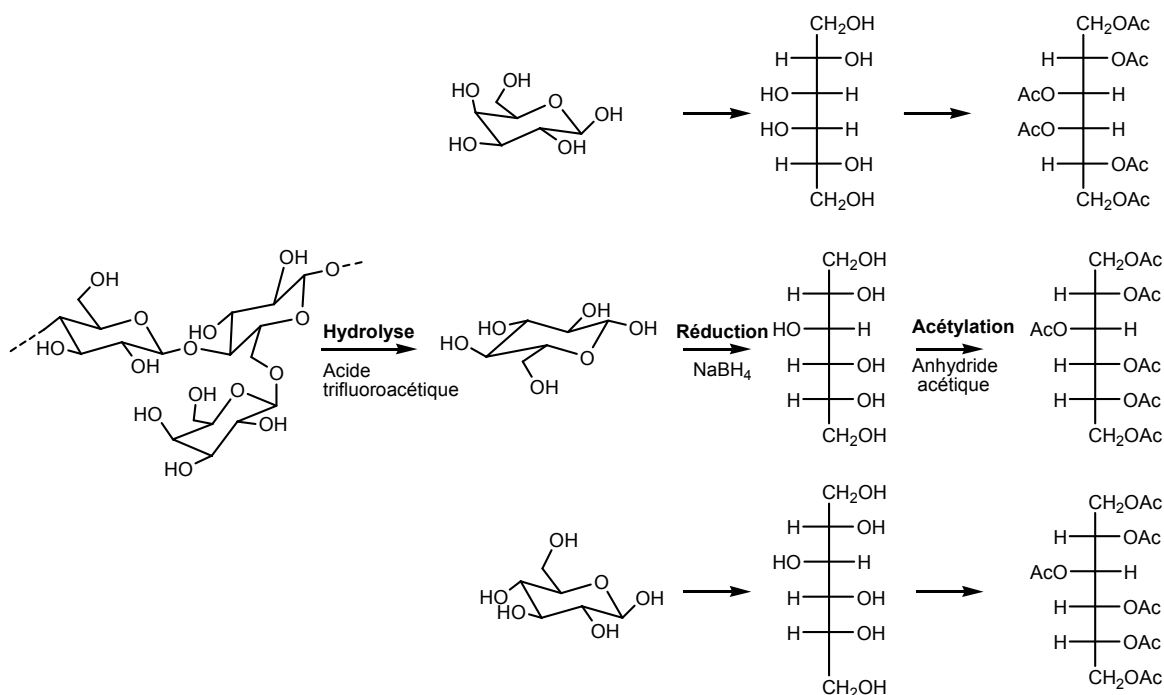


Figure 21: Méthode de préparation des alditols acétates.

Contrairement à la méthode précédente, la silylation d'un *O*-méthylglycoside conduira à la formation de plusieurs isomères. Cette méthode est cependant souvent employée puisqu'elle présente l'avantage de permettre une identification simultanée des hexoses, déoxyhexoses, pentoses, acides uroniques et osamines. Les dérivés triméthylsilylés sont obtenus selon la méthode de Kamerling et *al.* (1975)<sup>108</sup>, modifiée par Montreuil et *al.* (1986)<sup>110</sup>, par réaction des *O*-méthylglycosides avec du BSTFA (*N,O*-bis-triméthylsilylacétamide) 95 % stabilisé par du TMSCl (chlorure de triméthylsilane) 5 % dans de la pyridine anhydre (Figure 22).

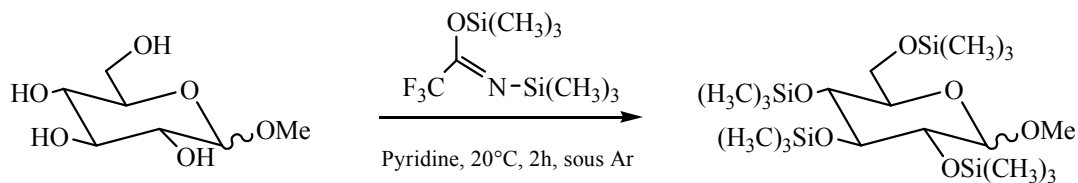


Figure 22: Méthode de triméthylsilylation des *O*-méthylglycosides, d'après Kamerling et al., 1975.<sup>108</sup>

### 3.2.c. Taux de sulfatation

Les techniques mises en œuvre pour la détermination du taux de sulfates sont nombreuses, mais peu d'entre elles sont adaptées à l'étude de la sulfatation des polysaccharides. Bien qu'étant très précises, les méthodes gravimétriques sont à exclure en raison des quantités de matière nécessaire pour l'analyse (souvent plusieurs grammes). Notre choix s'est naturellement orienté vers l'utilisation de méthodes moins coûteuses en matières premières. Deux méthodes sont fréquemment employées.

La méthode de Rochas et al. (1986)<sup>111</sup> a été adaptée à l'analyse des agars et carraghénanes. Elle est basée sur l'intensité de la bande d'absorption correspondant à la vibration d'élongation asymétrique de la fonction ester sulfate à  $1250\text{ cm}^{-1}$ . Connaissant la structure des polymères, ces auteurs ont déterminé le degré de substitution en sulfate ( $DS_S$ ) en rapport avec l'absorption de la bande à  $2920\text{ cm}^{-1}$  caractéristique des fonctions hydroxyles. L'allure du spectre IR indique néanmoins que l'estimation en sulfate n'est précise que pour des valeurs de  $DS_S$  inférieures à 0,8. Melo et al. (2002)<sup>112</sup> ont validé cette méthode en montrant que les valeurs des  $DS_S$  calculés par IR ou microanalyse étaient très voisines avec une incertitude de moins de 5 %. Par contre, pour des polymères plus faiblement sulfatés ( $DS_S$  mesurés par microanalyse inférieur à 0,15) la précision de la méthode infrarouge décroît fortement et pourra s'écarter de près de 60 % de la valeur obtenue par microanalyse. Ainsi, la gamme de validité de la méthode de dosage par IR semble trop restreinte pour être employée au cours de notre d'étude.

Le second procédé, largement utilisé, nécessite l'hydrolyse totale du polysaccharide par de l'acide chlorhydrique 2 M suivi du dosage des sulfates inorganiques libérés. Comme précisé précédemment, l'estimation gravimétrique de la sulfatation sous forme de sulfate de baryum n'est pas satisfaisante. En revanche, la méthode développée par Dodgson<sup>113, 114</sup> permet de doser par turbidimétrie à 360 nm le sulfate de baryum stabilisé dans une solution de

gélatine. Outre le fait d'être rapide, cette méthode mise au point sur de nombreux types de polymères présentant un taux de sulfatation hétérogène (de l'ordre de 5 à 40 % massique) a l'avantage d'utiliser de faibles quantités de polymère (quelques milligrammes) pour des résultats équivalents à ceux mesurés par gravimétrie. L'une des principales limites de cette méthode semble liée aux incertitudes de pesée.

### **3.3. Analyse structurale des polysaccharides anioniques**

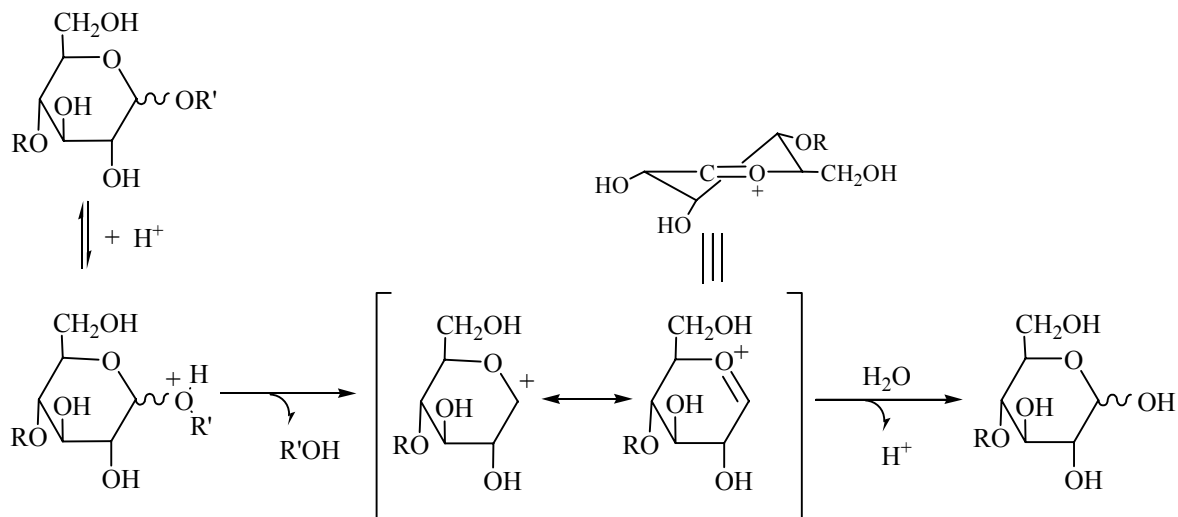
#### ***3.3.a. Obtention d'oligosaccharides***

La méthodologie d'analyse d'un polysaccharide repose sur l'obtention d'unités oligosaccharidiques plus faciles à caractériser par les techniques de RMN et de spectrométrie de masse. Cependant, dans le cas des polysaccharides contenant des acides uroniques, la stabilité de la liaison uronosidyle rend souvent délicate l'application des méthodes classiquement utilisées en Chimie des sucres. Les liaisons engageant un ou plusieurs acides hexuroniques peuvent néanmoins constituer une zone de rupture privilégiée. Cette propriété est souvent mise à profit pour le développement de méthodes spécifiques applicables aux polysaccharides natifs contenant des acides uroniques.

Les méthodes les plus efficaces sont celles qui font appel aux enzymes spécifiques qui vont permettre l'obtention d'unités de répétitions plus facilement analysables. Ce mode de préparation est particulièrement bien adapté à des polymères tels que les pectines qui sont composées d'enchaînements homogènes d'acides galacturoniques. En revanche, un grand nombre de phycolloïdes présentent des structures complexes qui faute d'enzymes appropriées limitent l'utilisation de cette méthode de dégradation.

#### *i. Hydrolyse acide ménagée*

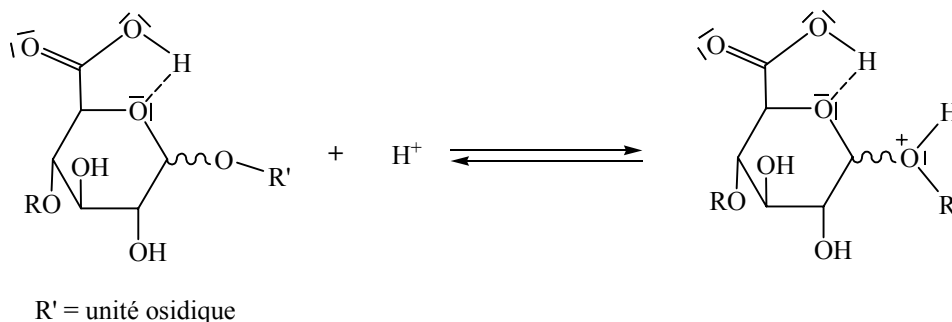
En l'absence d'endo-enzymes spécifiques capables de libérer sélectivement des motifs de répétitions caractéristiques de la structure du polymère, nous nous sommes orientés dans une première approche vers l'utilisation de l'hydrolyse acide. Cette méthode basée sur la résistance différentielle des liaisons glycosidiques permet en théorie de libérer des fragments oligosaccharidiques de masses molaires variables. Le mécanisme général comprend 3 étapes successives (Figure 23). En milieu acide, l'oxygène anomérique est protoné. Il s'en suit la décomposition de l'acide conjugué en ion oxonium, stabilisé par résonance sous la forme conformationnelle de demi-chaise. L'extrémité réductrice est enfin régénérée par addition d'eau.



R, R' = Aglycone ou chaîne glucidique

Figure 23: Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides, d'après BeMiller, 1967.<sup>115</sup>

Dans le cas des polysaccharides acidocarboxylés, la stabilité chimique des liaisons impliquant les acides uroniques confère aux polymères une certaine résistance aux acides forts, y compris à température élevée. On observe alors une cinétique relative faible dans le cas de l'hydrolyse d'un polymère engageant des liaisons uronosidyles. La stabilité de ces liaisons à l'hydrolyse acide s'explique par les effets inducteurs et conformationnels du groupement carboxyle en C-5 (Figure 24).<sup>116</sup> Les électrons du doublet de l'oxygène du cycle forment une liaison hydrogène avec le proton carboxylique diminuant par la même la capacité du doublet de l'oxygène à se délocaliser sur la liaison O-C<sub>1</sub> par effet mésomère. L'état de transition est dans ce cas peu favorisé.



R' = unité osidique

Figure 24: Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide, d'après Timell et al., 1965.<sup>116</sup>

## *ii. Autohydrolyse*

L'autohydrolyse des polysaccharides est une méthode de dégradation extrêmement douce qui suit le même mécanisme qu'une hydrolyse acide. L'acidité est ici apportée par les fonctions carboxyles et/ou sulfates du polysaccharide. Rapportée en 1938 par Hirst et Jones<sup>117</sup> pour l'analyse de gommages végétales, l'autohydrolyse a ensuite largement été employée lors de l'étude des phycocolloïdes et des polysaccharides sulfatés. La sensibilité et la sélectivité du polymère à l'autohydrolyse sont directement dépendantes de la nature des liaisons glycosidiques (Cf. § 3.2.b.i, Figure 18) et de la répartition des charges sur le polysaccharide. Des études relatives au mécanisme de l'autohydrolyse indiquent des différences majeures entre le rôle des sulfates et des groupements carboxyles sur la sélectivité de la réaction. En effet, les groupements sulfatés se dissocient totalement pour des valeurs de  $\text{pH} < 7$  contrairement aux groupements carboxyliques qui s'ionisent en deçà de  $\text{pH} 5$ . De plus, les groupements carboxyliques sont stables en milieu acide à température ambiante ; les acides uroniques ne se décomposent qu'après une période de chauffage prolongée, alors que les groupements sulfate sont rapidement hydrolysés et convertis en acide sulfurique. Ciancia et Cerezo (1993)<sup>105</sup> ont montré une certaine sélectivité de l'autohydrolyse. Contrairement à l'acidité apportée par les sulfates qui n'est pas localisée en un point précis du polymère, la fonction carboxyle catalyse la réaction d'hydrolyse au niveau des liaisons 1→4 précédant un acide uronique (Figure 25).

Très facile à mettre en œuvre, l'autohydrolyse nécessite au préalable la mise sous forme acide des polysaccharides par simple passage sur résines acides échangeuses d'ions. Les protocoles se déroulent ensuite dans des conditions de température et de pression variables qui sont directement dépendantes de la résistance des polysaccharides à l'hydrolyse. Classiquement, les conditions retenues vont de la température ambiante sous pression atmosphérique jusqu'à des températures de 190°C à 13 bars dans le cas du vapocraquage du bois. Une telle méthode conduit à la libération d'oligosaccharides de DP variable. Enfin, en raison de son caractère non agressif, l'autohydrolyse protège les substitutions non carbonées des polysaccharides. Elle limite par exemple les phénomènes de dé-sulfatation des phycocolloïdes ou dé-acétylation des xylanes ce qui, du point de vue de l'analyse structurale, apporte des renseignements précieux.

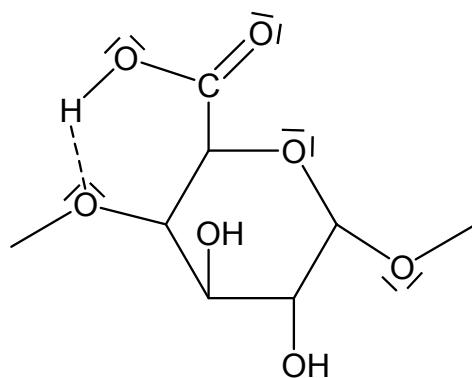


Figure 25: Catalyse intramolécule par un groupement carboxyle d'une liaison 1→4 précédant un acide uronique, d'après Ciancia et Cerezo, 1993.<sup>105</sup>

### iii. Dégradations chimiques spécifiques

Plus délicate à mettre en œuvre, les méthodes de ruptures chimiques sélectives, notamment des acides uroniques, existent parmi lesquelles la dégradation au lithium ou la dégradation alcaline en milieu réducteur qui conduisent respectivement à la libération d'oligosaccharides natifs et modifiés.

#### (i) Dégradation au lithium

Cette technique de dégradation spécifique des acides uroniques présents dans les polysaccharides a été décrite pour la première fois par Mort et Bauer en 1982.<sup>118</sup> À partir d'un polysaccharide produit par *Rhizobium japonicum* contenant un acide galacturonique dans sa chaîne principale, le lithium métal dans l'éthylène diamine a permis l'obtention d'un oligosaccharide correspondant à l'unité de répétition dépourvue de l'acide uronique. Lau *et al.* (1987)<sup>119</sup>, par une étude plus approfondie, ont démontré que le lithium provoque une rupture sélective de la liaison uronosidyle ainsi que la libération des substituants en 1 et 4 de ces monosaccharides. Ils rapportent également l'élimination des groupements non glucidiques tels que les acétates, les pyruvates, les sulfates et les méthoxyles déjà décrit par Monneret *et al.* (1974).<sup>120</sup> Cette technique a été employée sur divers polysaccharides d'origine bactérienne et végétale en obtenant des rendements satisfaisants (de 50 à 80 %) sauf lorsque les acides uroniques sont substitués en 3 ce qui est en contradiction avec les résultats de Mort et Bauer. Cette méthode a été appliquée plus récemment et avec succès sur les pectines<sup>121</sup> ou les polysaccharides de cyanobactéries.<sup>122</sup>



Le mécanisme réactionnel de la dégradation au lithium n'est pas connu. Toutefois, le lithium en présence d'ammoniaque, d'une alkylamine ou encore d'une diamine est un réducteur, notamment des fonctions carboxyliques.<sup>123, 124</sup> Au cours de cette réaction, le lithium agirait sous forme cationique. La présence d'électrons dans le milieu ainsi que le développement d'une coloration bleue pendant la réaction donne des indications quant à la nature radicalaire du phénomène. La présence supposée d'un radical sur l'acide uronique entraînerait la rupture de la liaison glycosidique par ouverture ou dégradation du cycle.

### *(ii) Dégradation alcaline en milieu réducteur*

La dégradation alcaline est une méthode antérieure aux méthodes d'analyses liées à la méthylation et a été développée au début du 20<sup>ème</sup> siècle pour l'étude structurale des polysaccharides et notamment les xylanes et les xyloglucanes. En milieu alcalin, il est connu qu'il peut survenir des réarrangements sur l'extrémité réductrice d'un polysaccharide, s'accompagnant de phénomènes de "peeling" par des mécanismes de  $\beta$ -élimination. En effet, sous l'action d'une solution alcaline, on observe une rupture des liaisons glycosidiques en C-4 d'un ose en position terminale réductrice. Les hydroxyles en position terminale réductrice jouent un rôle clé dans la dégradation alcaline des polysaccharides. La réaction de peeling, comme indiquée Figure 26 pour la cellulose ou d'autres polysaccharides liés en 1→4 est initiée par l'énolisation de l'hydroxyle en position terminale réductrice pour former les intermédiaires ènediol (**a**) et (**b**).<sup>125</sup> L'intermédiaire (**b**) subit alors le processus de  $\beta$ -élimination résultant du départ du substituant en C-4. Le composé (**c**) peut conduire par réarrangement de type benzylique à l'acide isosaccharinique (**d**) et à l'acide lactique (**f**) par clivage de la liaison entre le C-3 et le C-4 de la forme (**e**) suivie d'un réarrangement de type benzylique.

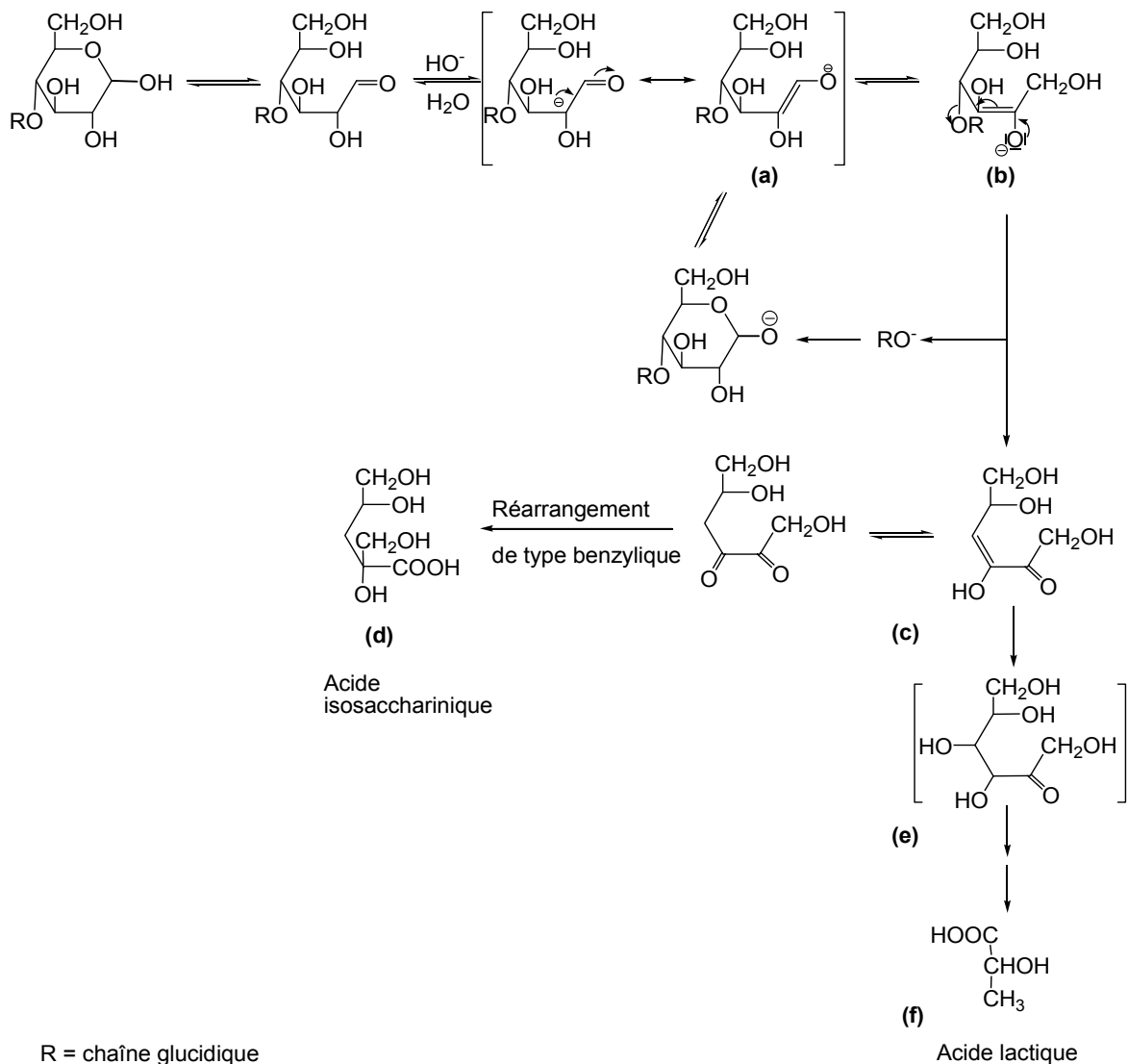


Figure 26: Dépolymérisation en milieu basique ou peeling d'un glycané lié en 1→4, d'après Lai, 2000.<sup>125</sup>

Le traitement alcalin d'un polymère glucidique est susceptible d'induire de nombreuses modifications structurales (peeling, clivage des liaisons glycosidiques, saponification...). Afin de limiter ces réactions parasites et de rendre sélective la réaction de dégradation, une solution consiste à travailler en milieu réducteur. La présence de borohydrure de sodium dans le milieu réactionnel permet de réduire les oses en position terminale réductrice, limitant ainsi les réactions de peeling tout en orientant la sélectivité de la réaction vers les acides uroniques. En effet, un groupement carboxylique est un centre électroattracteur qui en présence d'une base permet une réaction de  $\beta$ -élimination conduisant à la libération du substituant en C-4.<sup>126</sup> L'application de cette méthode au niveau d'un acide uronique d'un polysaccharide a été effectuée pour la première fois par Mc Cleary et al. en 1967<sup>127</sup> puis par Lawson et

al. en 1969.<sup>128</sup> Le mécanisme décrit Figure 27 a été détaillée par l'équipe de Lindberg.<sup>126, 129, 130, 131</sup>

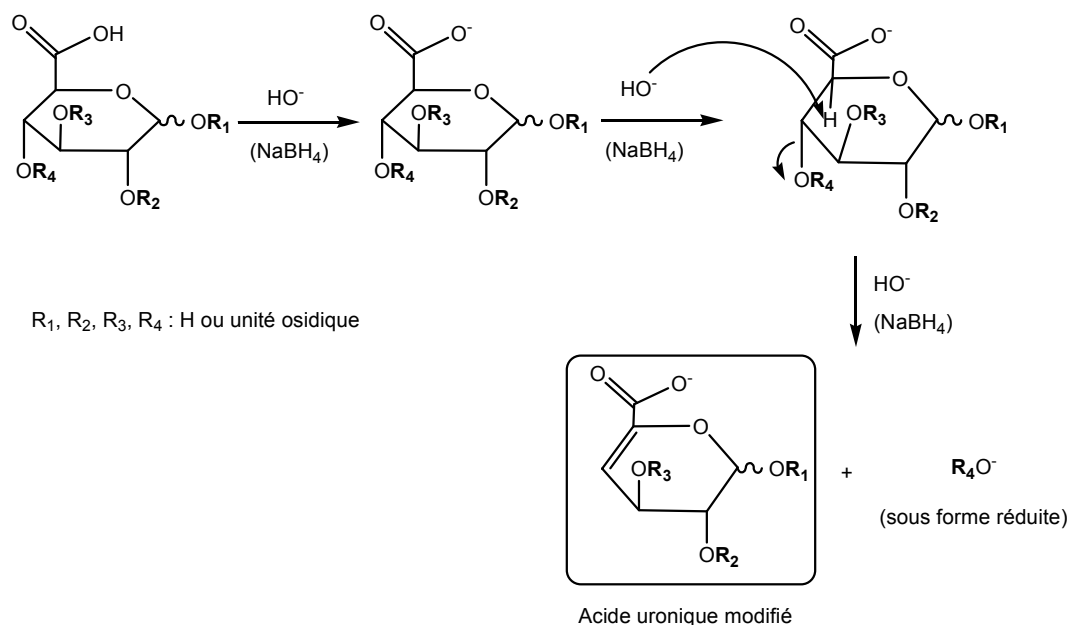


Figure 27: Dégradation alcaline en milieu réducteur d'un polysaccharide acide, d'après Lindberg et al., 1973.<sup>126</sup>

Si dans un second temps, une hydrolyse acide ménagée est réalisée à la suite de la dégradation alcaline, les unités osidiques engagées en C-1, C-2 et C-3 de l'acide uronique modifié sont libérées selon le schéma réactionnel suivant (Figure 28).

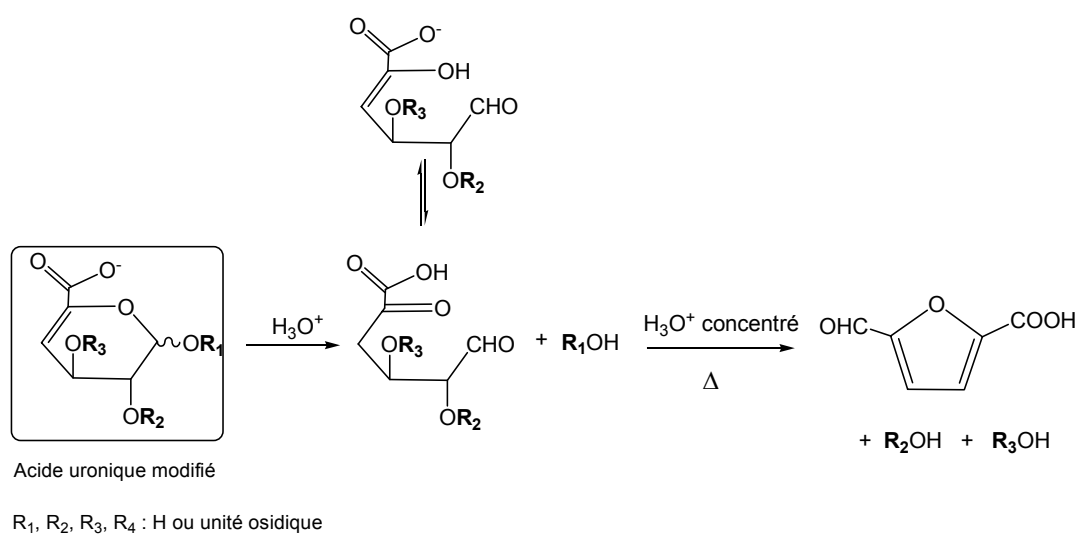


Figure 28: Libération des substituents R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> en milieu acide après la  $\beta$ -élimination, d'après Lindberg et al., 1973.<sup>126</sup>

### ***3.3.b. Détermination structurale des oligosaccharides***

Les méthodes précédemment décrites permettent l'obtention d'oligosaccharides plus faciles à analyser par spectroscopie. Néanmoins, il faut préalablement purifier ces mélanges complexes par diverses techniques chromatographiques : l'exclusion stérique en fonction de la masse moléculaire des composés ; la chromatographie d'échange d'ions en fonction de la charge des molécules.

#### *i. Analyse infrarouge*

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu de quantité de matière à analyser. Basée sur les transitions entre les états vibrationnels et rotationnels d'une molécule, elle peut être employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés. Certains groupements ou liaisons, considérés comme marqueurs (sulfates, pont 3,6-anhydro), peuvent révéler la présence de certaines catégories de polysaccharides (agar, carraghénanes).<sup>132</sup>

#### *ii. Analyse des liaisons glycosidiques*

L'étude de la méthylation d'oligosaccharides ou polysaccharides par CPG-SM permet de déduire l'enchaînement des unités osidiques et leurs points de branchements. Cette méthode nécessite la méthylation préalable de toutes les fonctions hydroxyles par de l'iode de méthyle suivi de la libération, par hydrolyse acide, des monosaccharides partiellement méthylés. Ils sont ensuite réduits par du NaBD<sub>4</sub> afin de pouvoir différencier le C-1 du C-6 puisque seule la fonction réductrice est porteur d'un deutérium. Les alditols partiellement méthylés sont acétylés afin de pouvoir déterminer, par CPG-SM, les fonctions hydroxyles engagées dans une liaison osidique (Figure 29).

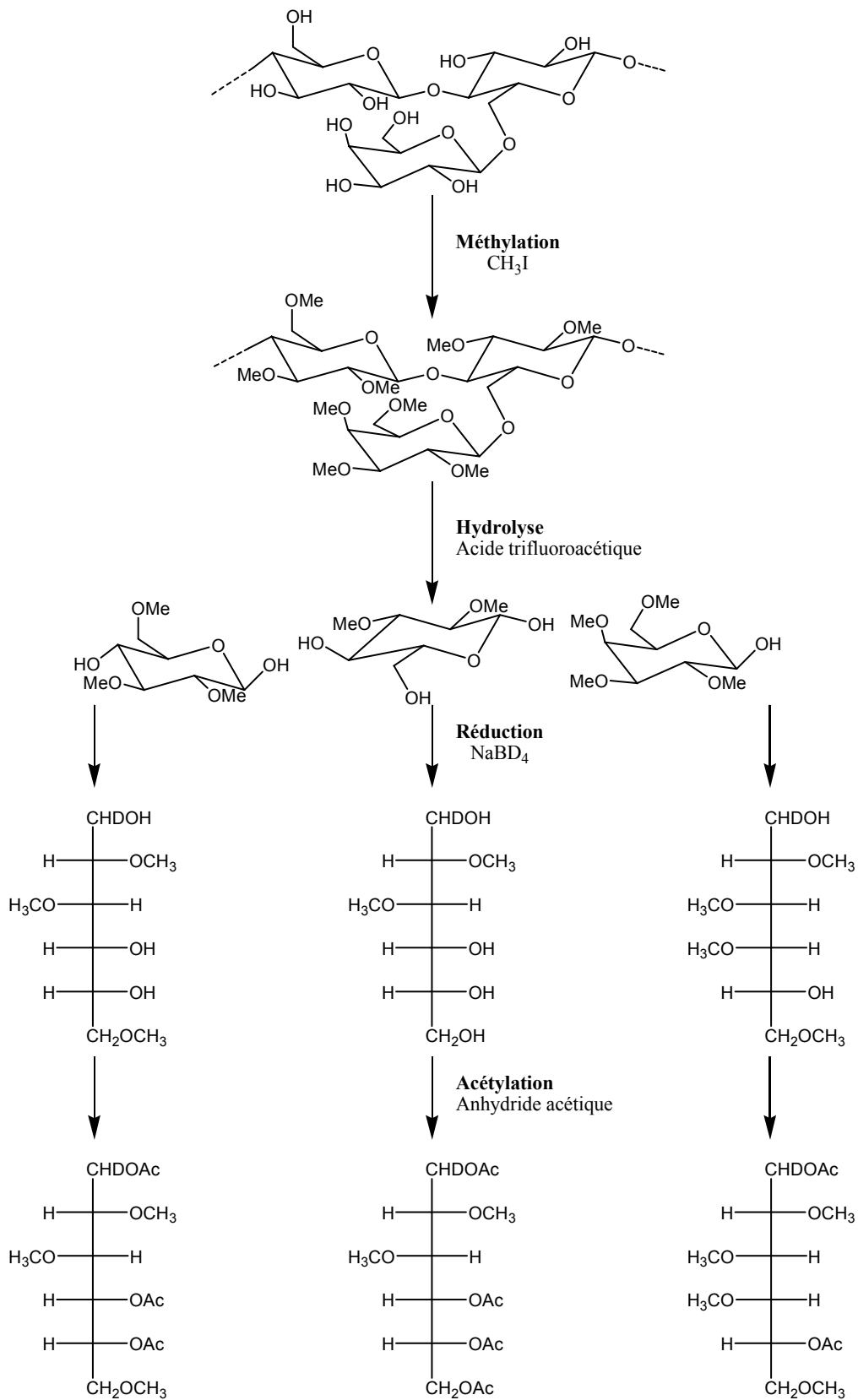


Figure 29: Analyse de l'enchaînement des monosaccharides.

### *iii. Analyses RMN*

La spectroscopie RMN est une méthode physicochimique non destructive permettant, à partir de quelques micromoles de polysaccharide, de réaliser le dosage et l'identification de chacun des monosaccharides, d'en préciser l'enchaînement, leurs points de branchement et leurs anoméries.<sup>133, 134</sup> Cette étude peut être conduite selon deux directions. Si les déplacements chimiques des protons de la molécule isolée correspondent à ceux déjà décrits, alors l'analyse est terminée. Cette technique nommée "Finger-Print" a été développée par Vliegthart et *al.* (1983)<sup>135</sup> pour la caractérisation des glycanes des glycoprotéines. Si au contraire la comparaison des déplacements chimiques avec la banque de données ne permet pas d'identifier les monosaccharides, leurs substitutions et/ou leurs liaisons, il faut alors étendre l'analyse RMN à des séquences bidimensionnelles. Nous nous sommes ici particulièrement intéressés aux formes pyranoses des sucres.

Le spectre RMN monodimensionnel du proton donne des informations primaires sur la valeur des déplacements chimiques des protons identifiables et permet de les comparer avec ceux déjà décrits dans les banques de données. Il renseigne également sur le nombre de résidus monosaccharidiques par l'intégration des protons anomériques qui se présentent sous forme de doublets entre 4,4 et 5,4 ppm. Les constantes de couplage peuvent être mesurées discriminant l'anomérie  $\alpha$  ou  $\beta$  des sucres.

L'élucidation des structures glycosidiques résulte ensuite de l'utilisation de différentes séquences d'impulsions qui dans une première étape permettent une attribution complète des déplacements chimiques des protons et carbones de la molécule. Les expériences COSY (COrrrelation SpectroscopY) homonucléaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permettent notamment de mesurer toutes les constantes de couplage entre les différents protons qui résonnent dans la "bulk region" entre 3,2 et 4 ppm. Cette zone renferme de nombreux protons dont les fréquences de résonance sont voisines ce qui rend leur identification délicate. Néanmoins, il est possible de distinguer les protons portés par les carbones impliqués dans une liaison osidique qui sont généralement déblindés. La nature du cycle (pyranose ou furanose) et l'anomérie peuvent également être précisées par le couplage  $^3\text{J}$  des protons anomériques. La distinction entre un  $\alpha$ -pyranose et un  $\beta$ -pyranose sera fonction de la valeur de la constante de couplage entre le proton anomérique et le H2. Une constante de couplage comprise entre 2 et 4 Hz, dans le cas d'un H2 axial est spécifique d'un  $\alpha$ -pyranose alors que la constante de couplage d'un  $\beta$ -pyranose varie entre 7 et 9 Hz. Pour un proton équatorial en position 2, les variations sont

réduites. Les emplacements des liaisons sont ensuite précisés par les déplacements chimiques des  $^{13}\text{C}$  résonnant entre 3 et 10 ppm, mais lorsqu'ils sont engagés dans des liaisons 1→x ils sont déblindés. D'une manière générale, les carbones anomériques des cycles sous forme pyranose portant un substituant axial résonnent vers 100 ppm. Les autres cycles pyranoses résonnent vers 105 ppm tandis que les formes furanoses sont caractéristiques des déplacements chimiques autour de 110 ppm.

La séquence de la chaîne oligosaccharidique peut ensuite être déterminée par différentes méthodes. Classiquement, elle peut être déduite des interactions dipolaires entre le proton anomérique et les protons adjacents de l'unité osidique (NOE, ROESY). L'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) fournit généralement des pics de corrélation intenses entre les protons H1 et Hx de deux sucres reliés par une liaison 1→x. Au travers du ROESY (Rotating Frame Overhauser Spectroscopy), il est possible de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux voisins proches d'au plus de 5 Å. L'expérience TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) permet le transfert de la magnétisation sur tous les protons d'un monosaccharide mais présente une lecture délicate des constantes de couplage. Dabrowski en 1989<sup>136</sup> a proposé de combiner les séquences ROESY et TOCSY afin de relier tous les protons anomériques et ainsi déterminer la séquence des unités osidiques. Les spectres HMQC (Heteronuclear MultiQuantum Coherence) permettent de corréler chaque proton avec le carbone auquel il est lié. 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.

Les spectres HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) donnent les couplages  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  et les constantes  $^3\text{J}$  associées. Il est alors possible de corréler les noyaux distants de 3 liaisons covalentes, notamment les constantes  $^3\text{J}_{\text{H1-Cx}}$  où x est la position du carbone du monosaccharide voisin inclus dans la liaison glycosidique (Figure 30). Ainsi, on peut préciser l'enchaînement des monosaccharides et donc, la séquence de l'oligosaccharide.

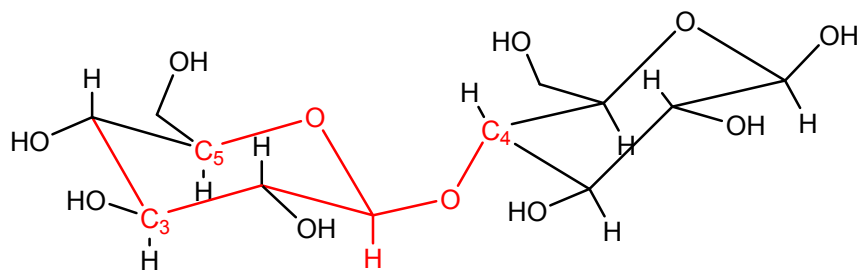


Figure 30: Schéma représentant les corrélations  $^3J_{H,C}$  carbone/proton observées à partir du proton H-1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison glycosidique.

#### iv. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse aux applications variées qui n'a vu son champ d'utilisation s'étendre aux macromolécules que depuis peu de temps. Cette technique requiert l'ionisation préalable en phase gaz des molécules analysées. La mesure des rapports masse/charge ( $m/z$ ) des ions moléculaires ou des fragments ainsi générés permet de déterminer la masse moléculaire des composés étudiés et ainsi collecter des informations structurales. L'étape d'ionisation classique par impact électronique (I.E.) ou ionisation chimique (I.C.), parfaitement maîtrisée pour la formation d'ions à partir de petites molécules volatiles, est inadaptée et est restée longtemps problématique pour l'étude de macromolécules biologiques polaires non volatiles, thermolabiles et de masses moléculaires élevées. Cependant, avec l'évolution des techniques d'ionisation, il est devenu possible de vaporiser des molécules telles que les protéines, les acides nucléiques ou les oligosaccharides tout en respectant leurs conformations en solution et en maintenant des interactions non covalentes avec leurs ligands. De plus, la précision et la sensibilité de cet outil permet de mesurer des masses avec une précision de 1 Da pour 20 000 Da dans le domaine des zeptomoles ( $10^{-21}$  moles).

Parmi les techniques d'ionisation, la technique de désolvatation-ionisation par bombardement d'atomes neutres rapides (FAB) permet l'analyse des molécules polaires comme les sucres ou les peptides de quelques kilodaltons. Plus récemment, deux autres méthodes ouvrant un domaine de masse accessible très supérieur à 100 kDa ont été mises au point notamment pour couvrir le domaine de masse des protéines et acides ribonucléiques.



(i) Ionisation par MALDI

Le MALDI ou Desorption-Ionisation Laser Assisté par Matrice est une méthode d'ionisation introduite par Karas et Hillenkamp en 1988.<sup>137</sup> Permettant d'analyser des molécules de masse moléculaire supérieures à 300 kDa, elle est particulièrement adaptée à l'étude des *N*- ou *O*-glycanes.<sup>138</sup> Actuellement, le mécanisme exact du MALDI n'est pas décrit avec précision. Un échantillon solide est cocristallisé avec une matrice puis irradié par des photons émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice. Les matrices sont des chromophores à faible enthalpie de sublimation devant absorber l'énergie du laser tout en favorisant l'ionisation par transferts de protons et assurant une bonne séparation des molécules en réduisant les forces intermoléculaires. Les matrices les plus utilisées sont les dérivés des acides cinnamiques et benzoïques (Figure 31).

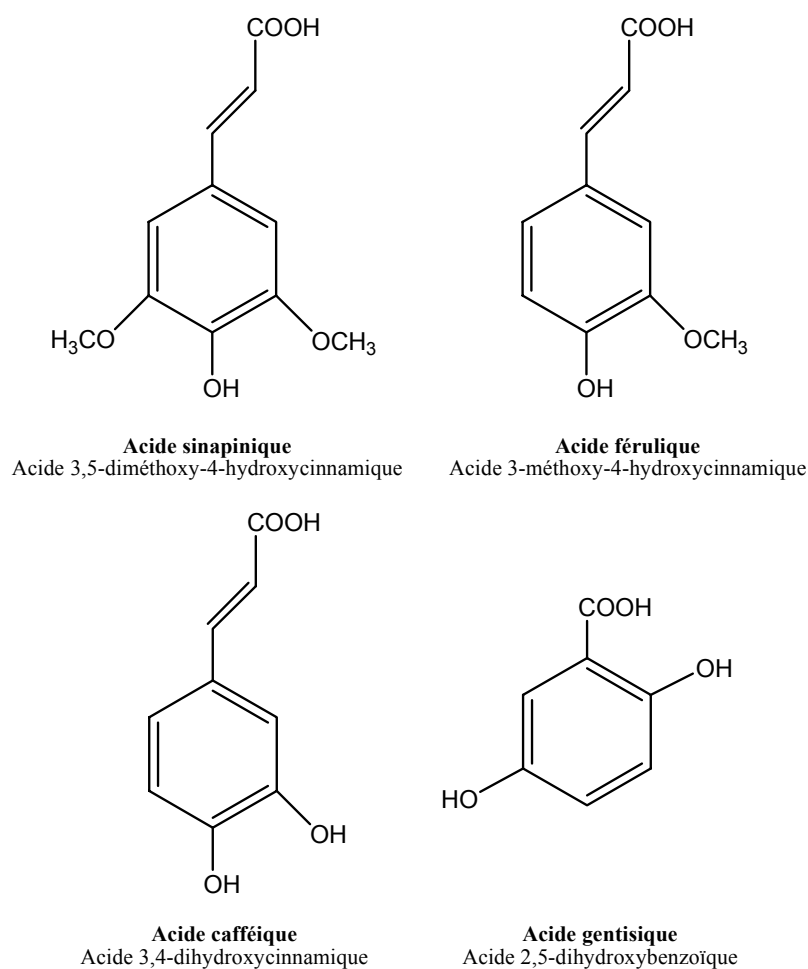


Figure 31: Matrices courantes pour l'analyse MALDI.

Le choix de la matrice est important puisqu'il permet de jouer d'une part sur la production des ions et, d'autre part, sur la résolution du spectre dans des gammes où on observe un bruit de fond important dû à la matrice. L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque est particulièrement adapté à l'étude des oligosaccharides puisqu'il permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du faisceau laser incident. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice et cet apport d'énergie provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillon à analyser (Figure 32). L'échantillon est alors ionisé majoritairement par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules du plasma tels que les sels de sodium. Les ions sodium favorisent l'ionisation des polymères par complexation.

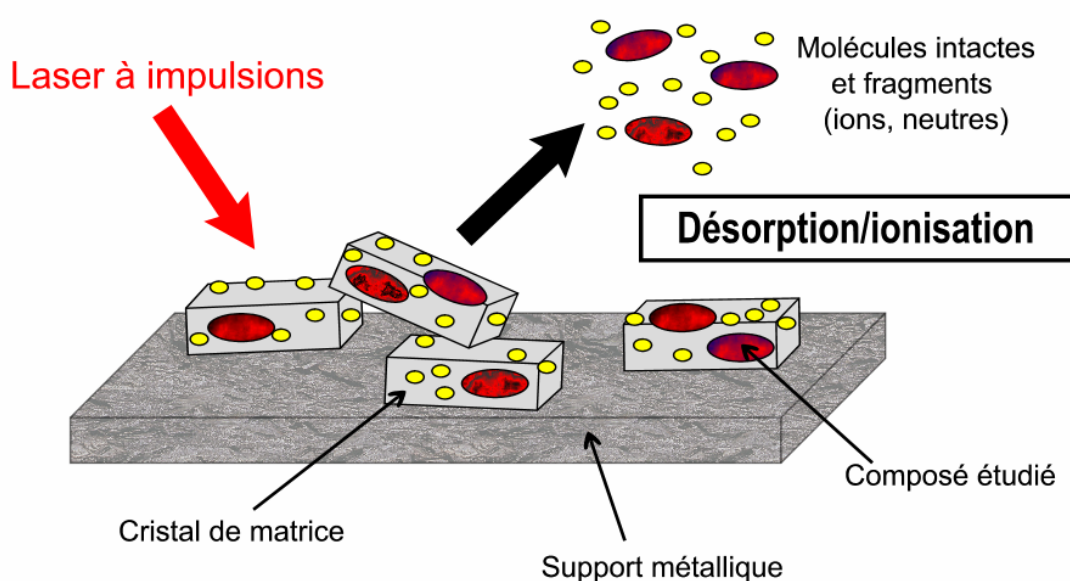


Figure 32: Principe du MALDI, d'après Karas et al., 1990.<sup>139</sup>

Les complexes chargés ainsi formés sont accélérés et envoyés dans un tube de vol jusqu'au détecteur. En général, la source MALDI est utilisée avec un analyseur à temps de vol (Time Of Flight). Celui-ci est proportionnel à la racine carrée des rapports  $m/z$ . Outre sa grande sensibilité (0,01 % à partir de moins d'un picomole de produit), cette technique permet d'analyser des molécules natives pures ou en mélange.

#### (ii) Ionisation par électrospray

Le principe de l'électrospray (ES) repose sur la création d'un brouillard électriquement chargé à partir d'un flux continu de liquide dans une enceinte à pression atmosphérique. Une solution d'échantillon est introduite dans un capillaire dont une extrémité est soumise à un fort champ électrique. Ce champ électrique intense provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Le brouillard résultant est entraîné par un gaz vecteur qui élimine progressivement le solvant des gouttelettes. La diminution du rayon des gouttelettes augmente leur densité de charge électrique et induit une désorption des ions dans la phase gazeuse. Les mesures de masse sont ensuite effectuées au travers du rapport  $m/z$ . Ainsi, dans le cas d'une molécule possédant plusieurs sites ionisables ou polaires, les ions formés sont multichargés et la gamme de masses accessibles est grande sur un instrument donné. Comme pour le MALDI, l'électrospray bénéficie d'une excellente résolution de l'ordre de 1 Da pour 10 000, d'une grande sensibilité (de l'ordre de la picomole) et engendre peu de fragmentations.

#### 4. Composition et structure des polysaccharides extracellulaires sécrétés par les microalgues rouges de la famille des Porphyridiaceae

Les microalgues rouges sont encapsulés dans une matrice mucilagineuse de nature polysaccharidique de poids moléculaire variable selon les espèces,  $4 \times 10^6$  Da pour le polysaccharide de *Porphyridium cruentum* contre  $5 \times 10^6$  Da pour celui de *Porphyridium aeruginum*.<sup>140</sup>

Les premières données sur la nature chimique du mucilage de *Porphyridium aeruginum* ont été présentées par Ramus en 1973.<sup>18</sup> Après hydrolyse acide du polymère en présence d'acide chlorhydrique et d'acide trifluoroacétique, il a montré par CCM la présence majoritaire de galactose, xylose, et glucose. Un taux de sulfatation voisin de 7 % en masse a par ailleurs été relevé après précipitation au baryum. Le marquage au  $^{14}\text{C}$  et  $^{35}\text{S}$  du polysaccharide a par ailleurs permis de préciser, après électrophorèse et chromatographie d'exclusion stérique, qu'il s'agissait principalement d'un polymère hétérogène hautement sulfaté dont la nature est très différente des galactanes des macroalgues rouges. En 1976, Heaney-Kieras et Chapman<sup>141</sup> ont confirmé, chez *Porphyridium cruentum* par

chromatographie sur papier, les compositions déterminées par Ramus chez *Porphyridium aeruginum*. Ces deux polymères sont composés, selon les conditions de culture, d'environ 36 % d'hexoses, 30 % de pentoses, 8,5 % d'acides uroniques, 9 % de sulfates et 1,5 % d'acides aminés. Il a par ailleurs été montré l'existence de liaisons covalentes entre les polysaccharides extracellulaires et les protéines.<sup>142-144</sup> Plus récemment, le groupe d'Arad<sup>145</sup> a montré que les protéines n'étaient pas engagées par des liaisons covalentes avec les sucres mais liées par des liaisons de faible énergie de type électrostatique.

L'oxydation *periodique* (Figure 33) du polysaccharide natif<sup>140</sup> d'une part et l'analyse par CPG-SM des polysaccharides méthylés<sup>141</sup> d'autre part permettent de préciser la nature des liaisons et des branchements.

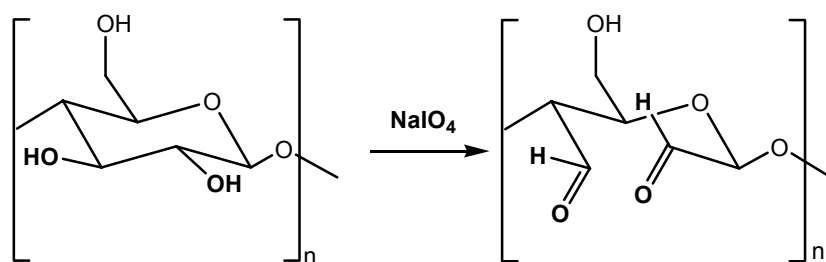


Figure 33: Principe de l'oxydation periodique.

Ainsi, le xylose et le galactose du polysaccharide de *Porphyridium sp.* sont liés en 1→4 et sont branchés respectivement en C-3, et C-3 et C-6. Le glucose et l'acide glucuronique sont liés en 1→3 mais seul le glucose peut être substitué en C-6. La méthylation du polysaccharide précise de plus la position terminale réductrice d'unités xyloses, galactoses et glucoses.

Quelques données structurales sur ces polymères sont disponibles ; elles ont été avancées dès 1976 par Heaney-Kieras et Chapman.<sup>141</sup> Après hydrolyse acide puis purification du mélange oligosaccharidique par chromatographie échangeuse d'ions, trois disaccharides acides et un monosaccharide acide méthylé ont été isolés. Ils ont été analysés et caractérisés conjointement après réduction par du borohydrure de sodium, digestion enzymatique et oxydation au tétraacétate de plomb (Figure 34).

2-O-Me-D-GlcpA

3-O-( $\alpha$ -D-GlcpA)-L-Gal

3-O-(2-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA)-D-Glc

3-O-(2-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA)-D-Gal

Figure 34: Structure d'acides aldobioniques présents chez *Porphyridium cruentum*, d'après Heaney-Kieras et Chapman, 1976.<sup>141</sup>

La configuration des différents monosaccharides constitutifs a été déduite des résultats obtenus par digestion enzymatique du polysaccharide par la D-glucose oxydase, D-galactose oxydase et  $\beta$ -D-glucosiduronase. L'anomérisation a été, quant à elle, déterminée par rapport au pouvoir rotatoire d'échantillons témoins. Les résultats de Percival et Foyle (1979)<sup>140</sup> confirment les résultats précédents tout en précisant la richesse des polymères extracellulaires en L-galactose dont le rapport avec le D-galactose est égal à 90/10. Percival et Foyle ont également validé par CPG-SM après méthylation, réduction et hydrolyse des oligosaccharides libérés par hydrolyse acide, la structure des acides aldobioniques (Figure 34) communs à *Porphyridium cruentum* et à *Porphyridium aeruginum*. La structure du 3-O-(2-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA)-D-Gal proposée par Heaney-Kieras et Chapman revue par Percival et Foyle (1979)<sup>140</sup> présente en fait la structure suivante : 4-O-(2-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA)-L-Gal.

La structure et les propriétés biologiques des polysaccharides produits par les microalgues *Porphyridium* sp. et *Rhodella* sp. ont fait l'objet de travaux suivis par le groupe de Arad.<sup>146-148</sup> Après hydrolyse acide du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium* sp. et purification par chromatographie sur colonne, Lupescu et al. (1991)<sup>146</sup> ont décrit la structure de 3 hexoses sulfatés (Figure 35).

6-O-SO<sub>3</sub>-Glc

6-O-SO<sub>3</sub>-Gal

3-O-SO<sub>3</sub>-Gal

Figure 35: Structure de sucres sulfatés présents chez *Porphyridium* sp., d'après Lupescu et al., 1991.<sup>146</sup>

Lors de l'étude de la contamination des cultures des microalgues *Porphyridium* sp. par *Gymnodium* sp., une dinoflagelle, Ucko et al. (1989)<sup>79</sup> ont observé une diminution de la viscosité du milieu. La présence d'hydrolases spécifiques synthétisées par *Gymnodium* sp. et conduisant à la dégradation sélective du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium* sp. a été suspectée et mis à profit dans le cadre d'une étude structurale du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium* sp.<sup>149</sup> Bien que les enzymes de *Gymnodium* sp. entraînent une diminution de la viscosité du polymère en solution et l'augmentation concomitante du nombre d'extrémités réductrices, elles ne présentent malheureusement pas d'activité endo permettant la libération d'oligosaccharides utiles à l'élucidation de la structure du polymère. Des études prospectives sur de nouvelles sources d'enzymes ont également été menées à partir des bactéries du sol.<sup>150</sup> Les activités enzymatiques de ces bactéries se révèlent spécifiques du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium* sp. ; elles conduisent à une chute de 95 % de la viscosité du milieu. En revanche, aucune activité n'a été observée sur les polysaccharides sécrétés par *Porphyridium aerugineum* et *Rhodella reticulata*. Contrairement à *Gymnodium* sp., ces enzymes bactériennes n'induisent pas l'augmentation du nombre d'unités réductrices ni même l'abaissement significatif du degré de polymérisation du polysaccharide. D'après Arad et al. (1993)<sup>151</sup>, l'abaissement de la viscosité du polymère serait majoritairement dû au clivage des liaisons covalentes entre le polysaccharide et les protéines, mais aussi à la rupture de liaisons intra- et/ou inter- moléculaires.

L'absence d'hydrolase spécifique connue, le caractère acido-labile et la grande complexité structurale de ce polysaccharide rendent donc difficile l'obtention et l'exploitation des données expérimentales. Seule l'hydrolyse acide non spécifique a conduit à la caractérisation chimique d'acides aldobiuroniques (Figure 36) dont un, l'acide 3-O-( $\alpha$ -D-GlcpA)-L-Galp, qui semble par ailleurs être une caractéristique commune des polysaccharides produits par les algues rouges unicellulaires voisines (Figure 37).<sup>147, 148</sup>

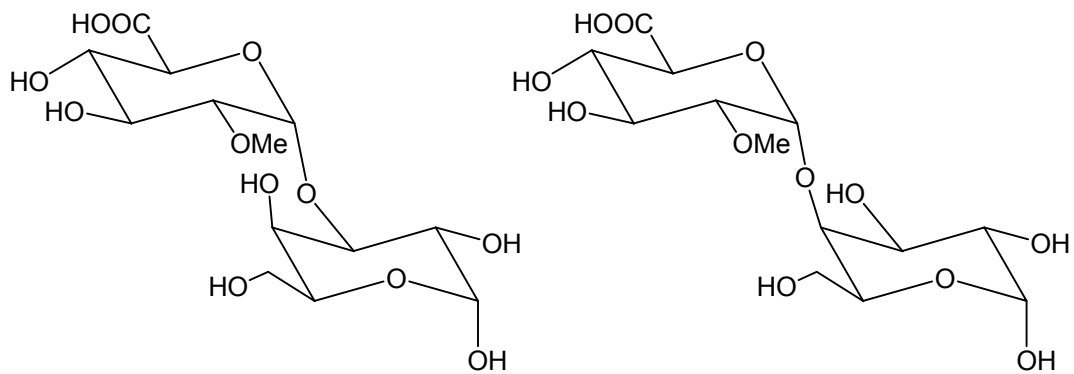


Figure 36: Structures développées d'acides aldobiuroniques présents chez *Porphyridium cruentum* et *Porphyridium aerugineum*, d'après Percival et Foyle, 1979.<sup>140</sup>

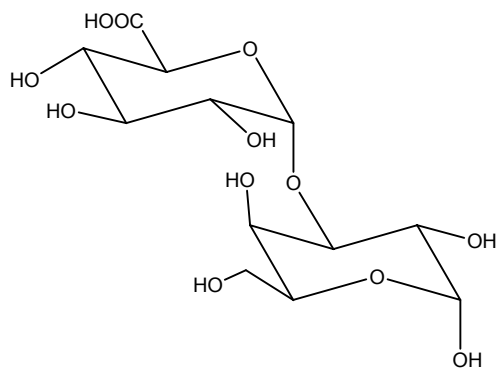


Figure 37: Figure développée de l'acide aldobiuronique 3-O-( $\alpha$ -D-GlcpA)-L-Galp commun aux microalgues rouges.

Les données structurales sur ces polymères étant incomplètes, nous avons entamé leur étude afin d'en proposer une structure. Ces substrats modèles ont ensuite servi de support à une phase de valorisation.





## Chapitre II

**Méthodologie d'extraction et de détermination  
structurale de polysaccharides extracellulaires  
sécrétés par les microalgues rouges**



# Chapitre II : Méthodologie d'extraction et de détermination structurale de polysaccharides extracellulaires sécrétés par les microalgues rouges

---

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, les microalgues rouges *Porphyridium cruentum* et *Rhodella reticulata* sont des producteurs de polysaccharides à potentialités dont on maîtrise la culture en photobioréacteur. Faute de données structurales suffisantes les concernant, les voies de valorisations sont limitées. Nous nous proposons alors de les caractériser et d'étudier leurs différences comme critère taxonomique.

## **I. Extraction du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum***

La méthodologie employée (Figure 38) pour l'extraction séquentielle et sélective des polysaccharides a été adaptée de Ramus (1973).<sup>18</sup> La première phase consiste en la dépigmentation de l'algue par de l'acétone et de l'éthanol respectivement. Quantitativement, le polysaccharide extracellulaire, recueilli après extraction à l'eau chaude de l'algue brute et purification, présente une part significative de la biomasse sèche. La moyenne établie à partir de trois séquences d'extraction indique que le polysaccharide matriciel produit par *Porphyridium cruentum* représente 14 % de la matière sèche ce qui est en accord avec les valeurs déjà publiées.<sup>141</sup>

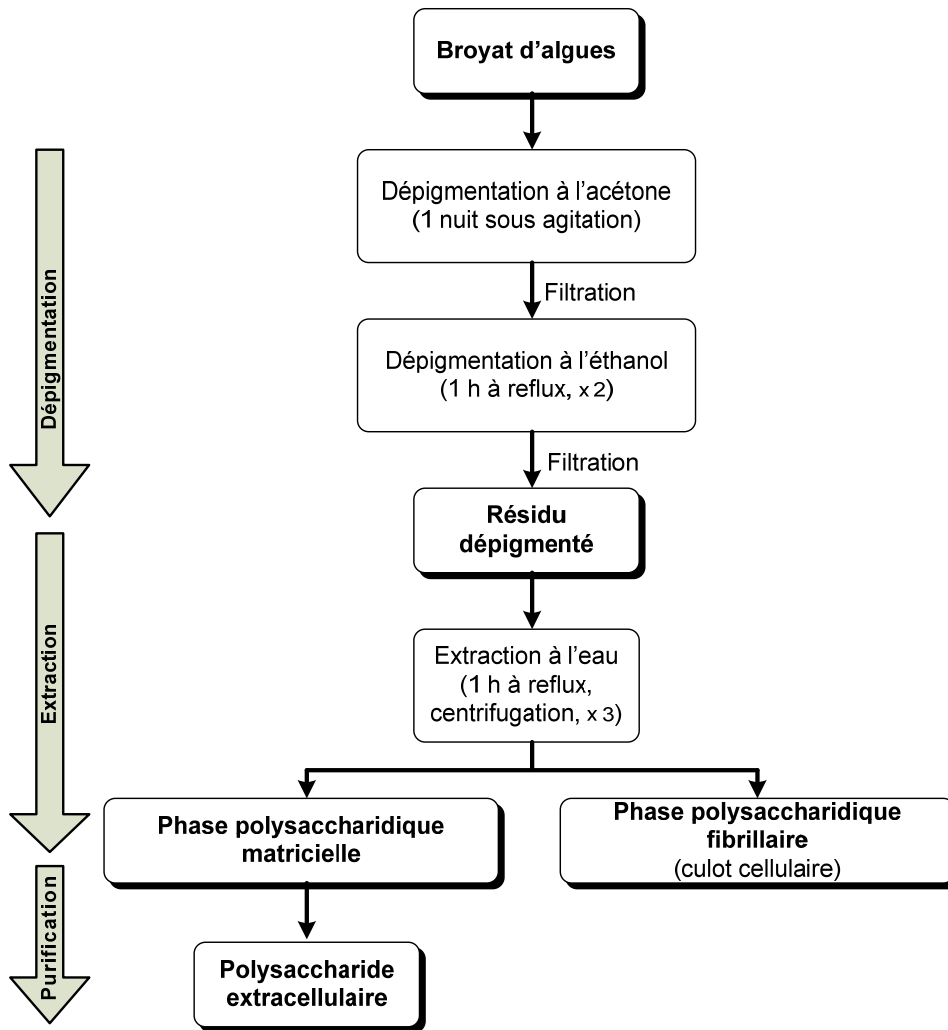


Figure 38: Méthodologie d'extraction et purification des polysaccharides extracellulaires.

## II. Caractérisation chimique

### 1. Composition centésimale

Les dosages colorimétriques des sucres totaux et des acides uroniques corrigés par la méthode de calcul décrite par Montreuil et Spik (1963)<sup>104</sup> nous renseignent sur la part des acides uroniques dans le polymère. Les résultats obtenus montrent que le polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum* est composé de 8 % (M/M) d'acides uroniques et 92 % (M/M) d'oses neutres. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques publiées notamment par le groupe d'Arad et *al.*<sup>152</sup>

## 2. Identification et dosages des monosaccharides par CPG

Comme nous l'avons mentionné dans la partie bibliographique, la technique des méthylglycosides triméthylsilylés développée par Kamerling et *al.* (1975)<sup>108</sup> (Figure 19 et Figure 22) permet, par CPG, l'identification simultanée et le dosage des hexoses (Gal, Glc, Man), pentoses (Xyl, Ara), acides uroniques (GalA, GlcA), déoxyhexoses (Rha, Fuc) et osamines (GlcNAc) qui entrent dans la composition des extraits osidiques analysés. Rappelons toutefois qu'en raison de la stabilité relative des liaisons glycosidiques il n'est pas possible de quantifier tous les monomères constitutifs d'un échantillon. La cellulose n'est par exemple pas quantifiée par cette méthode au même titre que certains acides uroniques engagés dans des liaisons uronosidyles fortes (Figure 24).

L'analyse de la composition monosaccharidique des différents extraits et résidus d'extraction par CPG révèle l'hétérogénéité du polymère (Tableau 4) ce qui se traduit par la grande diversité des monosaccharides qui entrent dans sa composition.

Tableau 4: Composition monosaccharidique (en % molaire) des différents résidus d'extraction isolés à partir de *Porphyridium cruentum*.

		Composition monosaccharidique (% molaire)					
		Xyl	Gal	Glc	GlcA	Ara	Man
<i>Porphyridium cruentum</i>	<b>Algue brute</b>	24,7	19,5	42,6	6,3	1,2	5,7
	<b>Algue dépigmentée</b>	29,9	16,9	42,7	5,8	1,2	3,5
	<b>Phase fibrillaire</b>	26,2	18,7	51,0	2,8	0	1,3
	<b>Polysaccharide extracellulaire</b>	56,9	19,0	17,7	6,4	0	0

Le polysaccharide matriciel produit par *Porphyridium cruentum* est composé très majoritairement de xylose, galactose, glucose et de façon accessoire d'acide glucuronique. Ces données expérimentales confirment les études de composition monosaccharidique des polysaccharides d'algues rouges unicellulaires déjà publiés.<sup>141</sup>

L'analyse de la composition de l'algue brute et des résidus d'extraction confirme enfin la sélectivité du protocole d'extraction employé. L'algue brute apparaît très riche en xylose, galactose et glucose. Ce dernier monosaccharide est d'ailleurs présent en quantité nettement plus importante que dans le polysaccharide extrait. Cette observation laisse supposer la présence d'autres polymères végétaux riches en glucose tels que les hémicelluloses qui participent à la structuration de la paroi cellulaire ou l'amidon qui participe au stockage de l'énergie métabolique. La cellulose qui n'est pas quantifiée par cette technique d'analyse est exclue de notre raisonnement. La composition monosaccharidique de la phase fibrillaire ainsi que le rapport entre le glucose et le xylose sont caractéristiques des hémicelluloses pariétales de type xyloglucane. Le protocole adopté préserve donc l'intégrité de la paroi cellulaire. Enfin, la similitude de composition monosaccharidique enregistrée entre l'algue brute et l'algue dépigmentée suggère que l'étape de dépigmentation préserve l'intégrité des structures polysaccharidiques de la paroi cellulaire.

### **3. Analyse infrarouge**

L'analyse infrarouge d'un échantillon d'origine biologique est une méthode qualitative rapide qui permet de révéler la présence de certains groupements fonctionnels caractéristiques. La Figure 39 présente l'empreinte infrarouge du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum* et le Tableau 5 répertorie les différentes bandes d'absorption.

L'analyse des différentes bandes caractéristiques souligne le caractère acide du polymère avec la large bande de vibration  $\nu(\text{C}=\text{O})$  des acides uroniques vers  $1640\text{ cm}^{-1}$  et la bande à  $1257\text{ cm}^{-1}$  spécifique des esters sulfates.

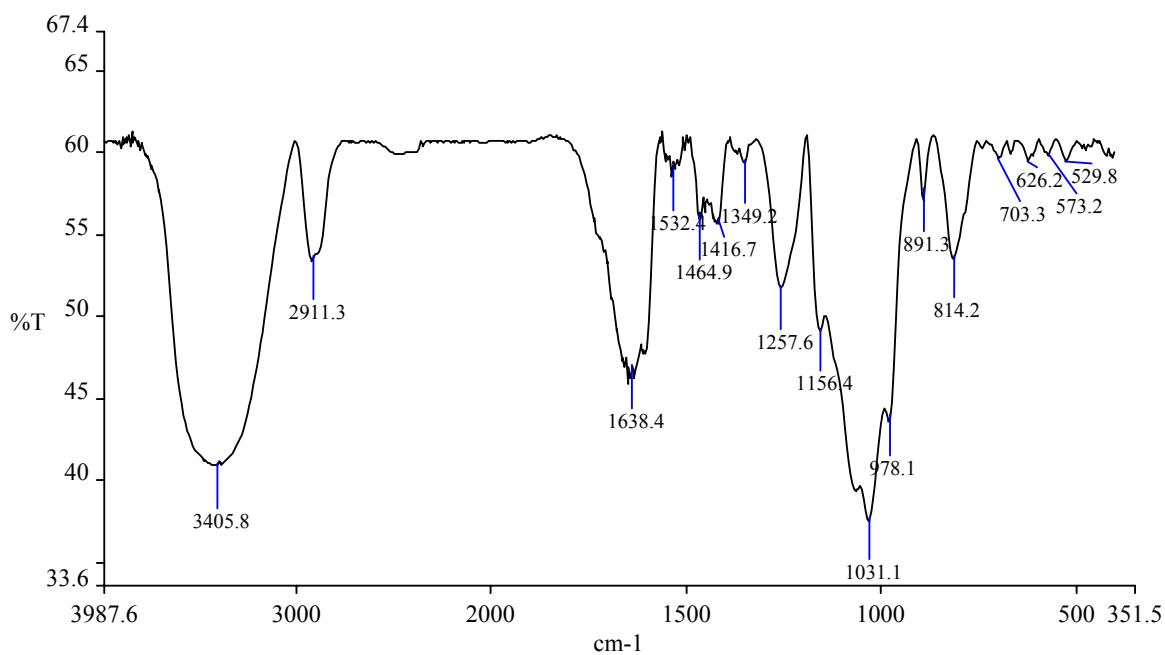


Figure 39: Spectre IR du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*.

Tableau 5: Bandes d'absorption caractéristiques du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*, d'après Chopin et al., 1999<sup>132</sup> et Knutsen et al., 1994.<sup>153</sup>

Longueur d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Type de liaison
3405	$\nu$ (O-H)
2911	$\nu$ (C-H)
1638	$\nu$ (C=O) sels d'acide, vibration antisymétrique ; eau résiduelle
1464	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) symétrique
1416	$\nu$ (C=O) sels d'acides, vibration symétrique
1349	Esters sulfates
1257	S=O
1156	Esters sulfates, $\nu$ (C-O-C); $\nu$ (C-C)
1031	$\nu$ (C-O) des esters sulfates et hydroxyles
891	$\delta$ (C-H) glycosidique
814	C-O-SO <sub>4</sub>

#### 4. Détermination du taux de sulfate

Le dosage du taux de sulfate a été réalisé selon la méthode turbidimétrique de Dodgson et Price (1962)<sup>113, 114</sup> décrite dans le chapitre I. La sulfatation du polymère évaluée à 5 % en masse (Tableau 6) est en accord avec les valeurs mesurées par Geresh *et al.* (2002).<sup>154</sup>

Tableau 6: Composition du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum*.

Type de dosage	CPG				Colorimétrique		Turbidimétrie
	Composition molaire (%)				% massique		% massique
	Xyl	Gal	Glc	GlcA	O.N.	A.U.	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>Polysaccharide extracellulaire</b>	56,9	19,0	17,7	6,4	92	8	5

*O.N.* = Oses Neutres ; *A.U.* = Acides Uroniques

### III. Obtention d'oligosaccharides et détermination structurale

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, l'analyse de la structure d'un polysaccharide nécessite l'obtention d'oligosaccharides plus faciles à analyser. Pour cela, la combinaison de différentes méthodes physicochimiques ou biochimiques est indispensable. L'hydrolyse enzymatique, lorsqu'elle est possible, s'avère la méthode la plus spécifique d'un substrat. En l'absence d'endo-enzymes spécifiques capables de dégrader ce polymère, nous nous sommes orientés dans une première approche vers l'hydrolyse acide ménagée non sélective, puis vers la mise en œuvre de méthodes de dégradations sélectives. L'obtention d'oligosaccharides est cependant soumise à certaines exigences et contraintes. En effet, les oligosaccharides doivent être libérés en quantité suffisante afin d'être représentatifs de la structure du polymère. De plus leurs DP ne doivent pas être trop important au risque de rendre difficile, ou impossible, l'interprétation des spectres RMN et donc l'identification des structures primaires.



# 1. Hydrolyse chimique non sélective du polysaccharide

## 1.1. Hydrolyse acide ménagée

L'hydrolyse acide (voir partie précédente) est basée sur la résistance différentielle des liaisons glycosidiques. Elle permet en théorie la libération de fragments oligosaccharidiques représentatifs d'une structure. Cette méthode simple à mettre en œuvre ne permet cependant pas de prévoir au préalable la zone de rupture. En raison du caractère acido labile du polysaccharide de *Porphyridium cruentum*, nous avons opté pour des conditions d'hydrolyse douces.

### 1.1.a. Suivi cinétique de l'hydrolyse

Le suivi cinétique d'une hydrolyse est une étape préliminaire indispensable afin de définir les conditions optimales de la libération d'oligosaccharides. Les modalités pratiques de sa mise en œuvre sont définies en termes de durée, de température et de concentration en acide. Le suivi par CCM de l'hydrolyse par HCl à 0,5 M a été mené sur une période de 120 minutes à 100°C. La Figure 40 atteste de la rapidité de la dépolymérisation du polymère. En effet, dès 30 minutes de réaction, le polysaccharide est totalement dépolymérisé.

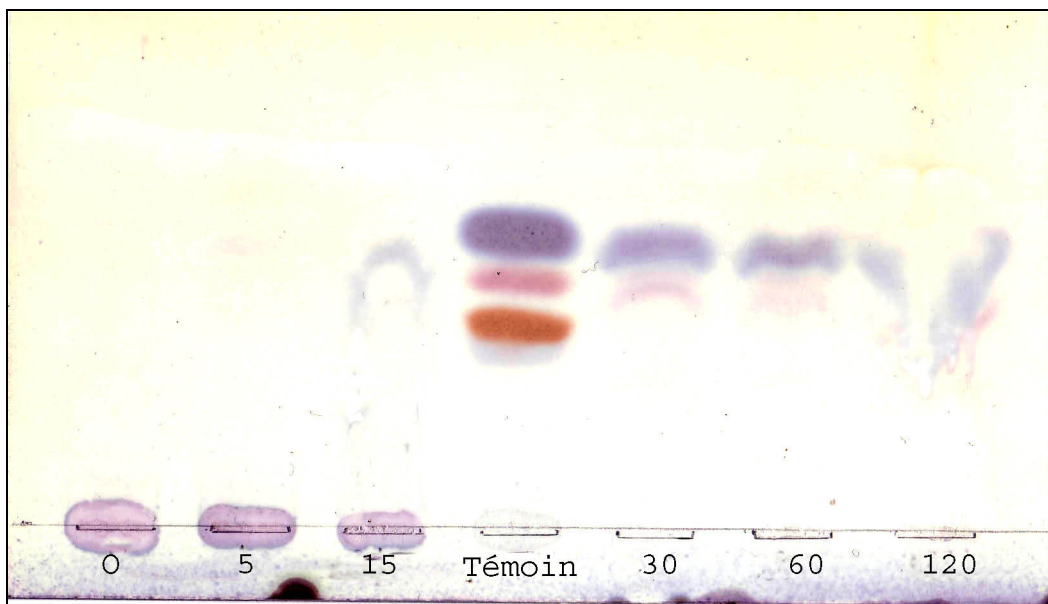
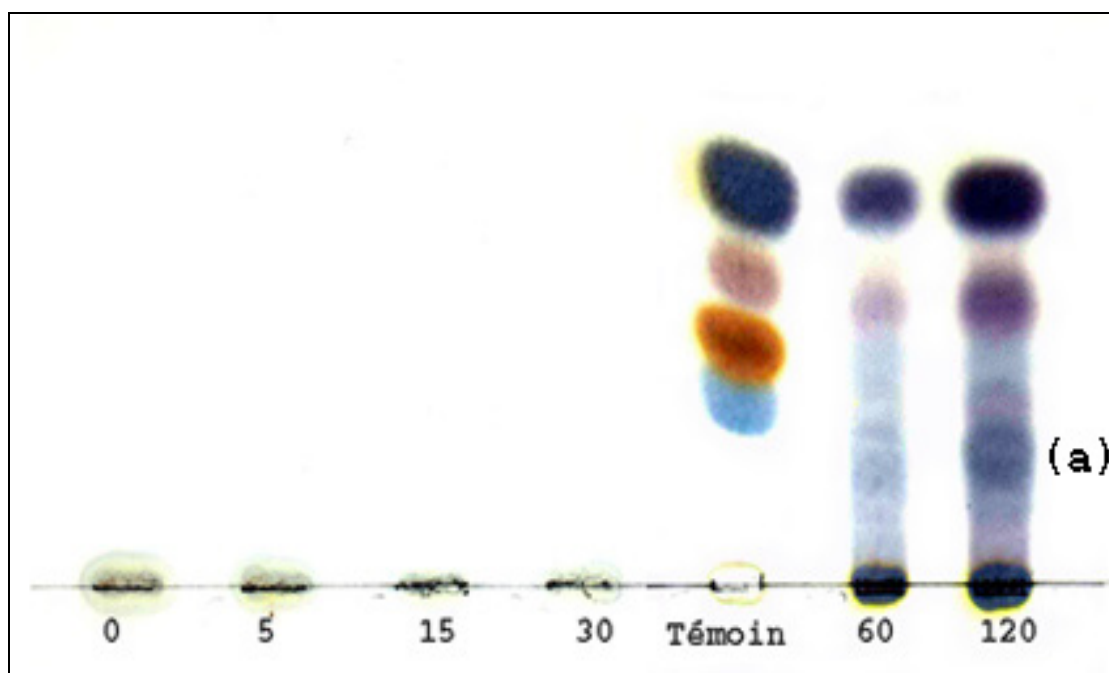


Figure 40: Suivi par CCM de l'hydrolyse en fonction du temps (en min) du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum* par HCl 0,5 M. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2/1/1 ; révélation : orcinol sulfurique.

En raison de la grande labilité en milieu acide de ce polymère, nous avons réalisé d'autres essais d'hydrolyse dans des conditions plus douces, notamment par l'utilisation de l'acide trifluoroacétique (TFA) dilué. L'emploi d'une solution de TFA à 0,05 M conduit à une dépolymérisation du saccharide à partir de 60 minutes de réaction à 100°C (Figure 41). Le renforcement de l'intensité relative des taches entre 60 et 120 minutes signifie qu'une augmentation du temps de réaction s'accompagne d'une libération accrue d'entités oligosaccharidiques (a). Une durée d'hydrolyse de 2 heures semble donc être un bon compromis entre l'obtention en quantité suffisante d'oligosaccharides (a) et une dépolymérisation trop importante du polysaccharide natif et des oligosaccharides libérés.

L'évolution du profil chromatographique en fonction du temps (Figure 41) indique que les liaisons glycosidiques du polymère présentent des stabilités variées. Cette constatation laisse supposer que ce polysaccharide est composé d'une séquence de répétition qu'il conviendra d'isoler et de caractériser.



### 1.1.b. Séparation et caractérisation des structures libérées

L'essai préliminaire de l'hydrolyse du polymère par du TFA dans les conditions précédemment définies étant concluante, la poursuite du travail a constitué en la production en quantité suffisante d'oligosaccharides pour l'analyse. Les différentes fractions oligosaccharidiques ont ensuite été séparées sur colonne échangeuse d'ions (Dowex 1×2) en fonction de la charge des composés, puis purifiées par tamisage moléculaire sur colonne de Biogel P2. Ainsi, deux composés majoritaires chargés ont pu être obtenus en quantité suffisante pour l'analyse (Figure 42).

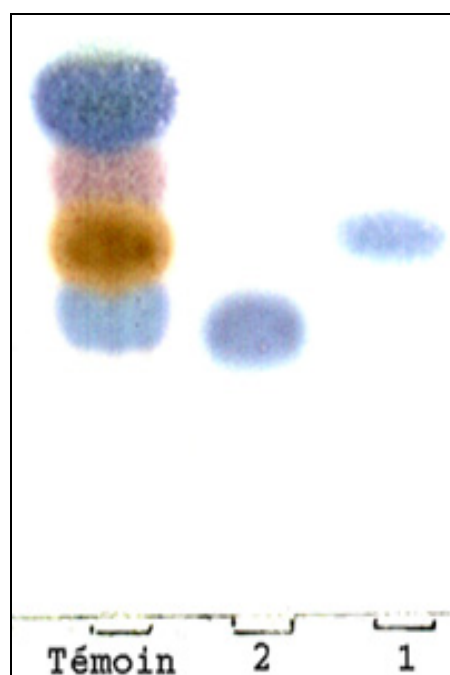


Figure 42: Composés **1** et **2** purifiés à partir de l'hydrolysate par l'acide trifluoroacétique du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique.

La réalisation et l'interprétation des spectres RMN ont été effectuées par le Docteur Gérard Streker du Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

L'analyse par spectroscopie RMN 2D des composés **1** et **2** a permis d'en préciser la structure.

## Composé 1

Sur la base des analyses de RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, le composé acide **1** a été identifié comme étant un xylose sulfaté en position 4 (Figure 44). La stéréochimie du monosaccharide a été établie par la considération des quatre premières valeurs de couplage vicinale <sup>3</sup>J et par la résonance des 2 protons H-5 (axial et équatorial) du pentose (Tableau 7). La position du groupement sulfate a été confirmée par l'observation de la résonance dans les champs faibles du H-4 et C-4. Ce monosaccharide sulfaté (Figure 43) n'a, à notre connaissance, jamais été décrit dans la structure d'un phycocolloïde et, plus largement, dans la structure d'un polysaccharide végétal. Il semblerait néanmoins que seul un β-1,3-xylane de synthèse sulfaté en C-4 ait été rapporté <sup>155</sup>, notamment pour des propriétés analogues aux antithrombines\* et des propriétés anticoagulantes six fois supérieures à l'héparine.

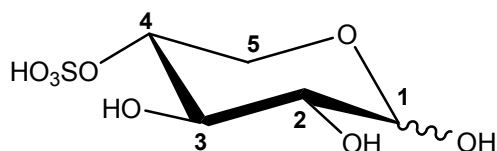


Figure 43: Structure du composé **1**.

Tableau 7: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) constitutifs du composé **1** (D<sub>2</sub>O).

	Déplacements chimiques (en ppm)	
	4-O-SO <sub>3</sub> -α-D-Xylp	4-O-SO <sub>3</sub> -β-D-Xylp
<b>H-1</b>	5,203	4,597
<b>H-2</b>	3,612	3,316
<b>H-3</b>	3,807	3,615
<b>H-4</b>	4,223	4,230
<b>H-5</b>	3,963/3,810	4,230/3,465
<b>C-1</b>	93,3	97,8
<b>C-2</b>	72,5	75,3
<b>C-3</b>	72	74,9
<b>C-4</b>	<b>77,5</b>	<b>77,5</b>
<b>C-5</b>	64,4	60,3

Les valeurs en gras correspondent aux carbones engagés dans les liaisons glycosidiques.

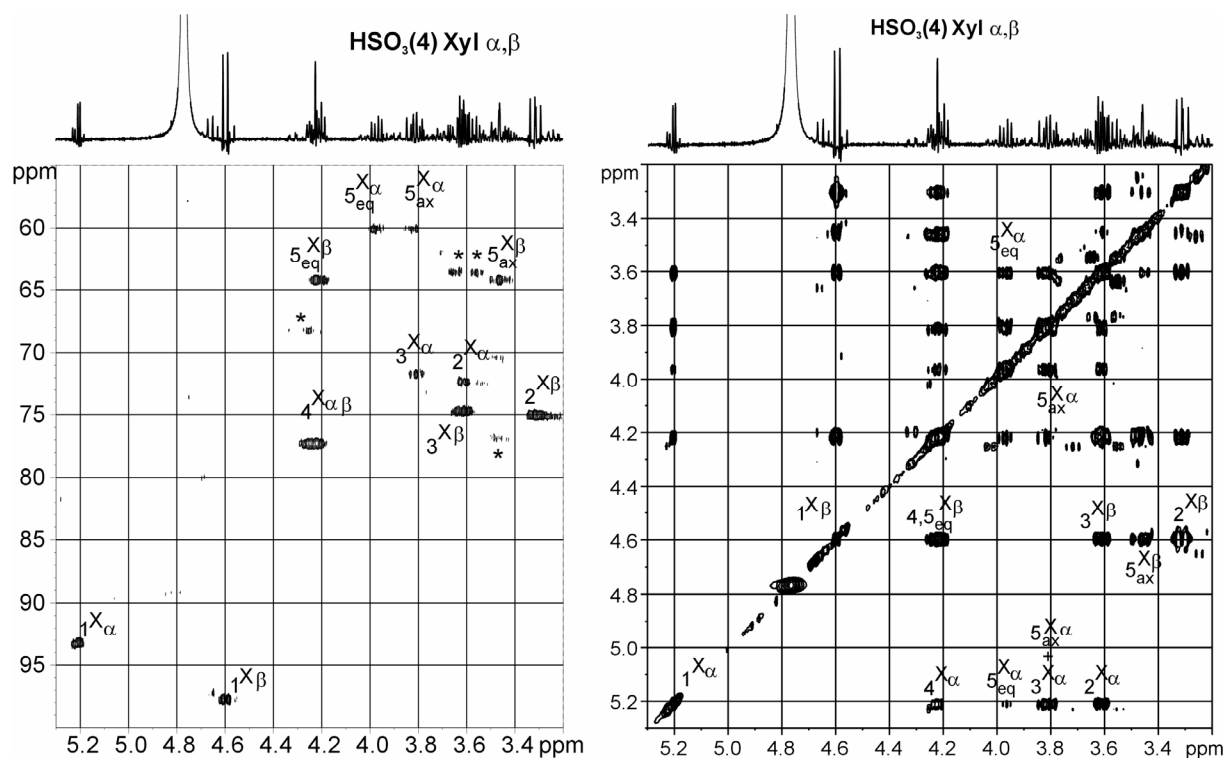


Figure 44: A gauche, agrandissement d'un spectre RMN hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC du composé **1** ( $\delta^1\text{H}=3,2-5,2$  ppm et  $\delta^{13}\text{C}=55-100$  ppm) ; à droite, agrandissement d'un spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonucléaire TOCSY du composé **1** ( $\delta^1\text{H}=3,2-5,2$  ppm).

## Composé 2

La combinaison des séquences RMN TOCSY, HMQC  $^1\text{J}$  et HMBC  $^3\text{J}$  a permis l'identification et la caractérisation du composé **2** (Figure 46, Tableau 8). Les 4 signaux présents dans la région anomérique (entre 4,4 et 5,4 ppm) sont attribués aux H-1 d'un disaccharide sulfaté, le  $\beta$ -Glc-(1 $\rightarrow$ 3)-Xyl, sur la base du système distinct de spin de l' $\alpha$ -Xylp, du  $\beta$ -Xylp, et du  $\beta$ -Glc p. La corrélation  $^3\text{J}_{\text{H-C}}$  observée sur le spectre HMBC permet de confirmer la séquence du disaccharide. Le déblindage des protons H-6 et H-6' et le déblindage du C-6 de l'unité glucose permettent d'établir la position de la sulfatation. Cet oligosaccharide qui présente une structure originale est présenté Figure 45.

Les données relatives à la nature des liaisons mais aussi les substitutions des monosaccharides constitutifs du polysaccharide de *Porphyridium cruentum* publiées par Medcalf et al. (1975)<sup>143</sup> à partir de l'analyse par CPG-SM du polysaccharide méthylé sont respectées. Le glucose sulfaté en position 6 avait déjà été mis en évidence par Lupescu et al. (1991)<sup>146</sup> lors de l'hydrolyse acide ménagée du même polymère.

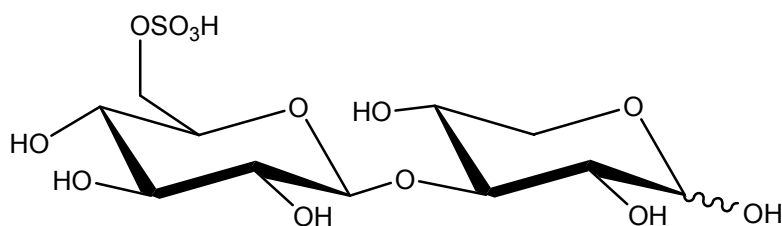


Figure 45: Structure du composé 2.

Tableau 8: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) des monosaccharides constitutifs du composé 2.

Déplacements chimiques (en ppm)				
	6-O-SO <sub>3</sub> -β-D-Glcp-(1→3)-α-D-Xylp		6-O-SO <sub>3</sub> -β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Xylp	
	Glc	Xyl	Glc	Xyl
H-1	4,702	5,188	4,726	4,612
H-2	3,376	3,713	3,376	3,414
H-3	3,542	3,850	3,542	3,663
H-4	3,490	3,711	3,490	3,716
H-5	3,696	3,736	3,696	3,981/3,348
H-6/H-6'	4,347/4,217		4,347/4,217	
C-1	103,9	93,2	103,9	97,5
C-2	74,5	71,9	74,5	74,4
C-3	76,6	<b>83,8</b>	76,6	<b>86,2</b>
C-4	70,4	69,2	70,4	69,2
C-5	74,9	62,1	74,9	65,9
C-6	<b>68,3</b>		<b>68,3</b>	

Les valeurs en gras correspondent aux carbones engagés dans les liaisons glycosidiques.

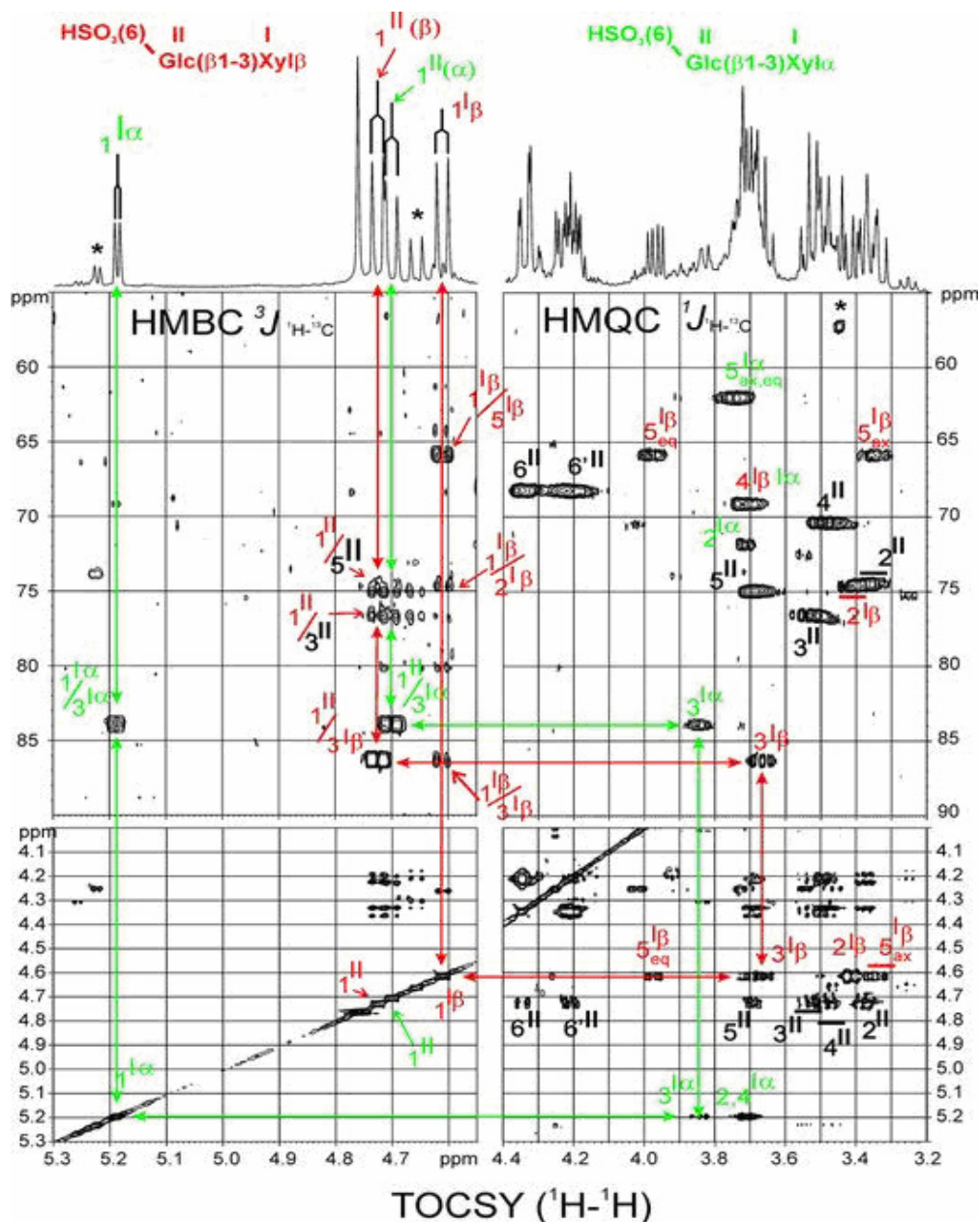


Figure 46: Spectres RMN homo et hétéronucléaires du composé 2. En haut à gauche : agrandissement d'un spectre HMBC entre  $\delta^1\text{H}=4,5-5,3$  ppm et  $\delta^{13}\text{C}=55-90$  ppm ; en haut à droite : agrandissement d'un spectre HMQC entre  $\delta^1\text{H}=3,2-4,2$  ppm et  $\delta^{13}\text{C}=55-90$  ppm ; en bas : agrandissement d'un spectre TOCSY entre  $\delta^1\text{H}=4,1-5,3$  ppm et  $\delta^1\text{H}=3,2-5,3$  ppm.

L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique dans des conditions opératoires pourtant très douces conduit à une dépolymérisation forte du polymère ; seulement un disaccharide sulfaté et un monosaccharide sulfaté sont recueillis. Afin de contrôler la dépolymérisation du polymère, nous avons appliqué une méthode d'hydrolyse acide encore plus douce : l'autohydrolyse.

## 1.2. Autohydrolyse

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

### 1.2.a. Obtention d'oligosaccharides

Les oligosaccharides sont ici obtenus après une phase de chauffage en phase aqueuse du polymère préalablement protoné sur une résine acide. L'autohydrolyse, réalisée à 100°C pendant 6 heures sur le polymère natif, produit un profil chromatographique complexe (Figure 47).

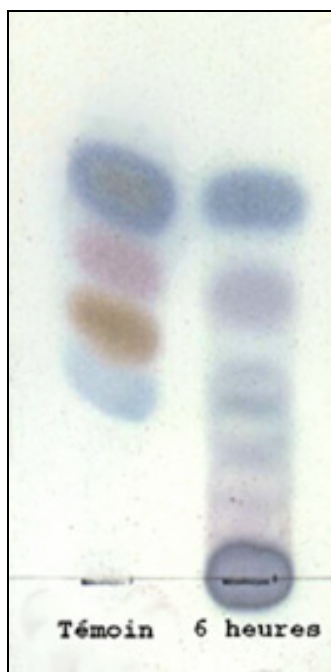


Figure 47: Autohydrolysats à 100°C pendant 6 heures du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum*. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique.

### 1.2.b. Séparation et caractérisation des différents fragments oligosaccharidiques

Le fractionnement des oligosaccharides acides est effectué sur une colonne cationique Dowex 1×2 équilibrée dans du formiate d'ammonium à 0,05 M selon le protocole défini par Nagel et Wilson (1969).<sup>156</sup> L'utilisation du formiate d'ammonium a néanmoins été préférée au



formiate de sodium moins volatil et donc plus difficile à éliminer. L'élution des oligosaccharides est ensuite réalisée comme décrite dans la partie expérimentale. Les produits d'hydrolyse sont alors séparés en deux fractions, l'une retenue, l'autre non retenue (Figure 48). Chacune d'entre elles a été par la suite purifiées par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Biogel P2 (Figure 50).

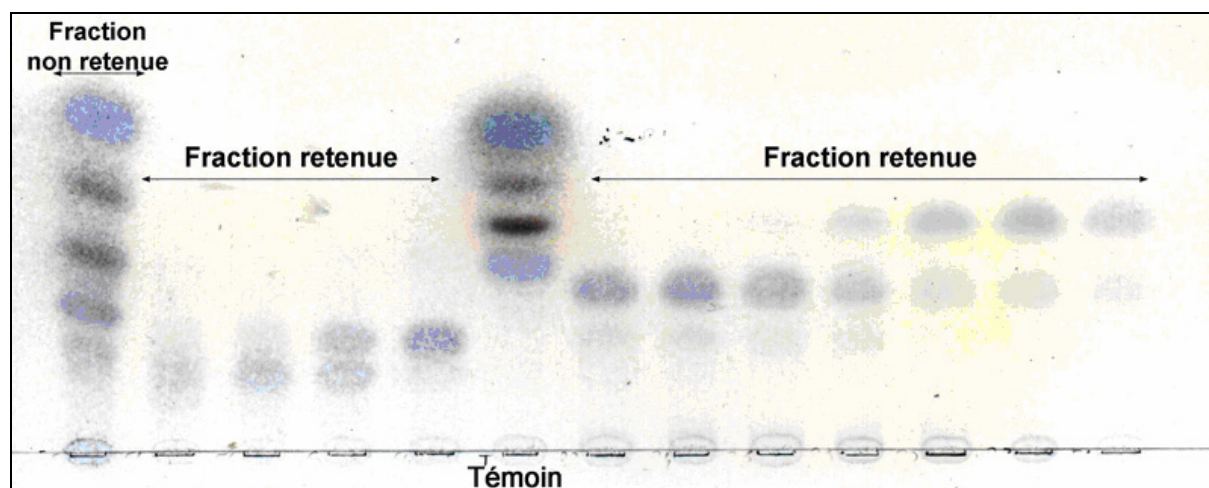


Figure 48: Séparation par chromatographie échangeuse d'ions des fragments oligosaccharidiques obtenus par autohydrolyse du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*.  
Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ;  
révélation : orcinol sulfurique.

Afin de comparer l'efficacité des méthodes d'hydrolyse (l'hydrolyse acide par le TFA dilué et l'autohydrolyse) sur le polysaccharide de *Porphyridium cruentum*, nous avons souhaité visualiser le profil chromatographique des hydrolysats recueillis à partir de l'une ou l'autre des méthodes par HPLC d'échange d'ions HPAE-PAD (High Performance Anion Exchange Pulsed Amperometric Detection) sur un système Dionex équipé d'une colonne analytique Carbopac-PA 1. Les hydrolysats ont été séparés dans la soude par un gradient d'acétate de sodium. Ils montrent un profil chromatographique similaire comme en témoigne les enregistrements présentés Figure 49. L'analyse détaillée de ces 2 profils met par ailleurs en évidence des variations sensibles des proportions relatives des différents oligosaccharides dans le mélange.

Dans des conditions d'hydrolyse contrôlées, et quelque soit la méthode retenue, le clivage du polymère apparaît alors comme sélectif et doit être associée à la stabilité relative des liaisons glycosidiques qui le compose. La cinétique d'hydrolyse dépend quand à elle de la force de l'acide utilisé ce qui permet d'envisager le contrôle de la dépolymérisation et donc les DP des oligosaccharides recueillis à des fins d'analyse structurale.

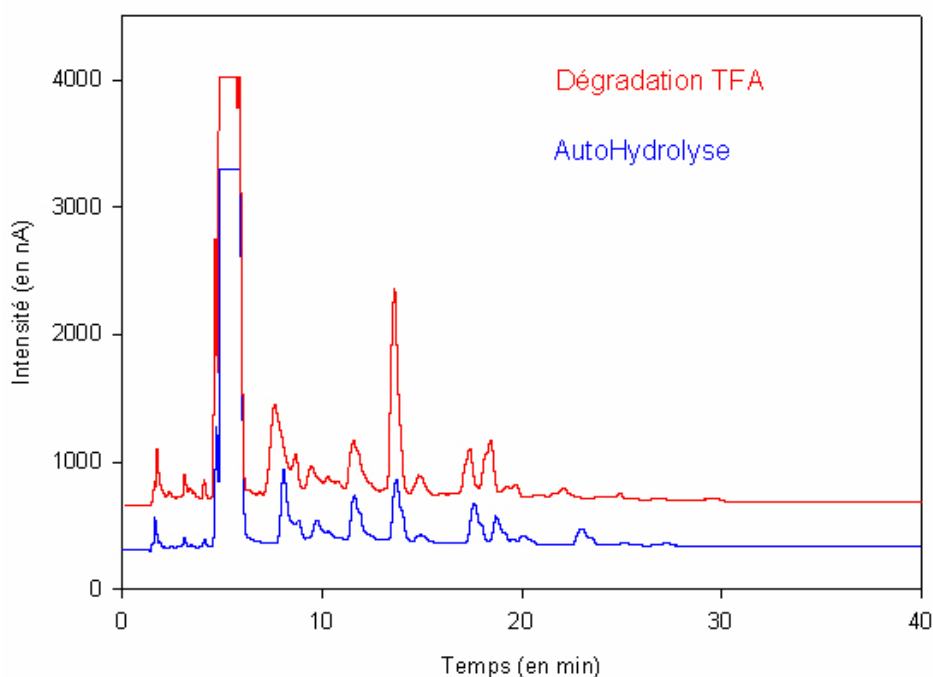


Figure 49: Contrôle des hydrolysats d'autohydrolyse et hydrolyse au TFA par HPAE-PAD effectué sous un gradient de NaOH à 100mM (A) et NaOH/acétate de sodium à 1M (B) ; à  $t=0$  min,  $A=99$  %;  $t=15$  min,  $A=90$  %;  $t=40$  min,  $A=80$  %;  $t=50$  min,  $A=50$  %;  $t=60$  min,  $A=99$  %; débit 1 mL/min.

Appliquée au polysaccharide de *Porphyridium cruentum*, l'autohydrolyse conduit à la libération d'un nombre important d'entités oligosaccharidiques que nous avons souhaité purifier par chromatographie d'échange d'ions et d'exclusion stérique. Cette étape de purification demeure fastidieuse et ne conduit souvent qu'à une purification partielle des oligosaccharides comme en témoigne les profils chromatographiques présentés en Figure 50.

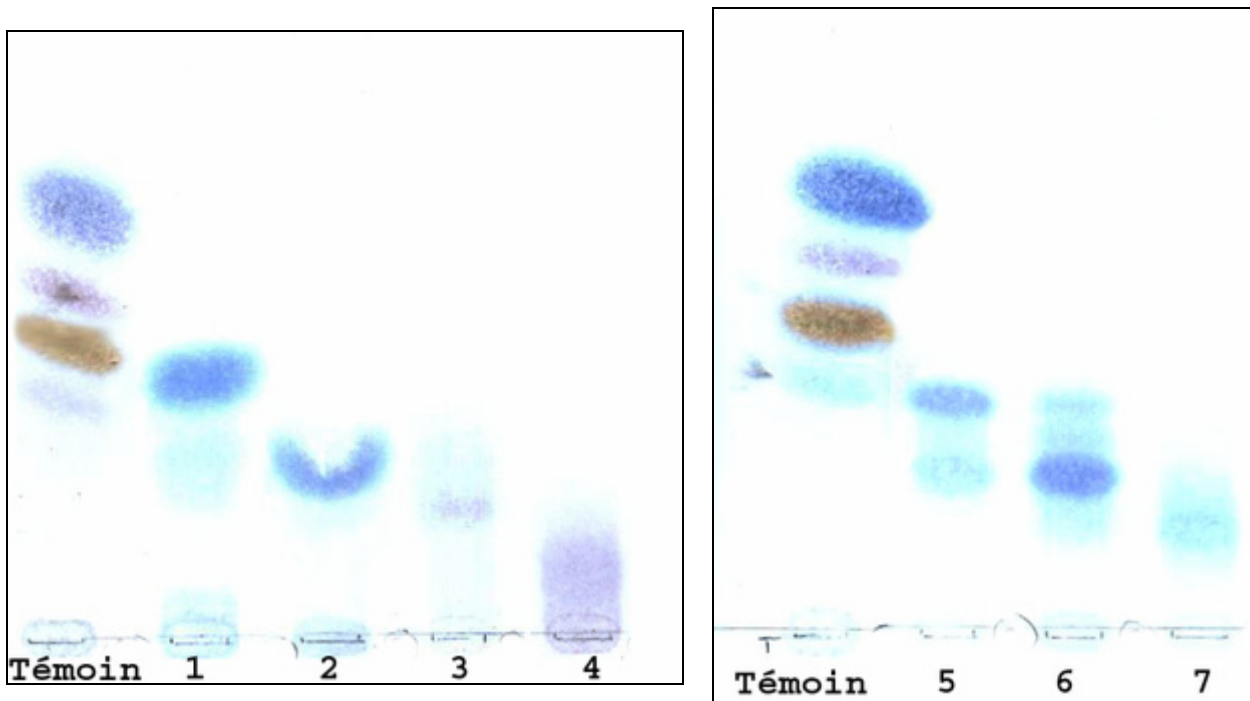


Figure 50: Oligosaccharides purifiés issus de l'autohydrolyse du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum*. A gauche : oligosaccharides retenus ; à droite : oligosaccharides non retenus.

Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ;  
révélation : orcinol sulfurique.

Compte tenu des trop faibles quantités recueillies ou de leurs trop grandes hétérogénéités, nous avons écarté les oligosaccharides **3**, **4**, **6** et **7** de l'analyse structurale.

L'analyse combinée par CPG et par RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C des composés **1** et **2** conduit à la caractérisation des **4-O-SO<sub>3</sub>-D-Xylp** et **6-O-SO<sub>3</sub>-β-D-Glcp-(1→3)-D-Xylp**, structures déjà obtenues par hydrolyse acide.

Le composé **5**, non retenu par chromatographie d'échange d'ions, est quant à lui isolé pour la première fois. Les paramètres RMN issus de l'analyse de cet oligosaccharide neutre sont présentés en Figure 52 et Tableau 9. Ils recouvrent ceux qui seront illustrés lors de l'analyse structurale de l'hexasaccharide neutre recueilli par dégradation au lithium (Tableau 11, Figure 57, p 92-93) et nous permettent, selon la méthode dite du "Finger Print" développée par Vliegthart<sup>135</sup>, de définir la structure d'un tétrasaccharide neutre dont la séquence est précisée Figure 51.

$\alpha$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-Glcp-(1→3)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xylp

Figure 51: Séquence de l'oligosaccharide 5 obtenu par autohydrolyse du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum*.

Tableau 9: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) des monosaccharides constitutifs du composé 5.

Déplacements chimiques (en ppm)					
$\alpha$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-Glcp-(1→3)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xylp					
	Gal	Glc	Xyl	Xyl $\alpha$	Xyl $\beta$
<b>H-1</b>	5,36	4,77	4,62	5,17	4,58
<b>H-2</b>	3,87	3,47	3,47	3,72	3,29
<b>H-3</b>	3,88	3,67	3,70	N.D.	3,43
<b>H-4</b>	4,00	3,66	3,71	N.D.	3,78
<b>H-5</b>	4,25	3,49	3,96/3,35	N.D.	N.D.
<b>H-6/H-6'</b>	3,75	3,91/3,71	-	-	-
<b>C-1</b>	100,25	103,80	97,50	93,30	97,50
<b>C-2</b>	69,85	73,60	73,60	72,10	75,10
<b>C-3</b>	70,50	<b>83,50</b>	<b>85,30</b>	N.D.	74,90
<b>C-4</b>	70,35	71,10	69,00	N.D.	<b>77,60</b>
<b>C-5</b>	72,00	76,80	66,10	N.D.	N.D.
<b>C-6</b>	61,10	61,80	-	-	-

Les valeurs en gras correspondent aux carbones engagés dans les liaisons glycosidiques.

N.D.= Non déterminé.

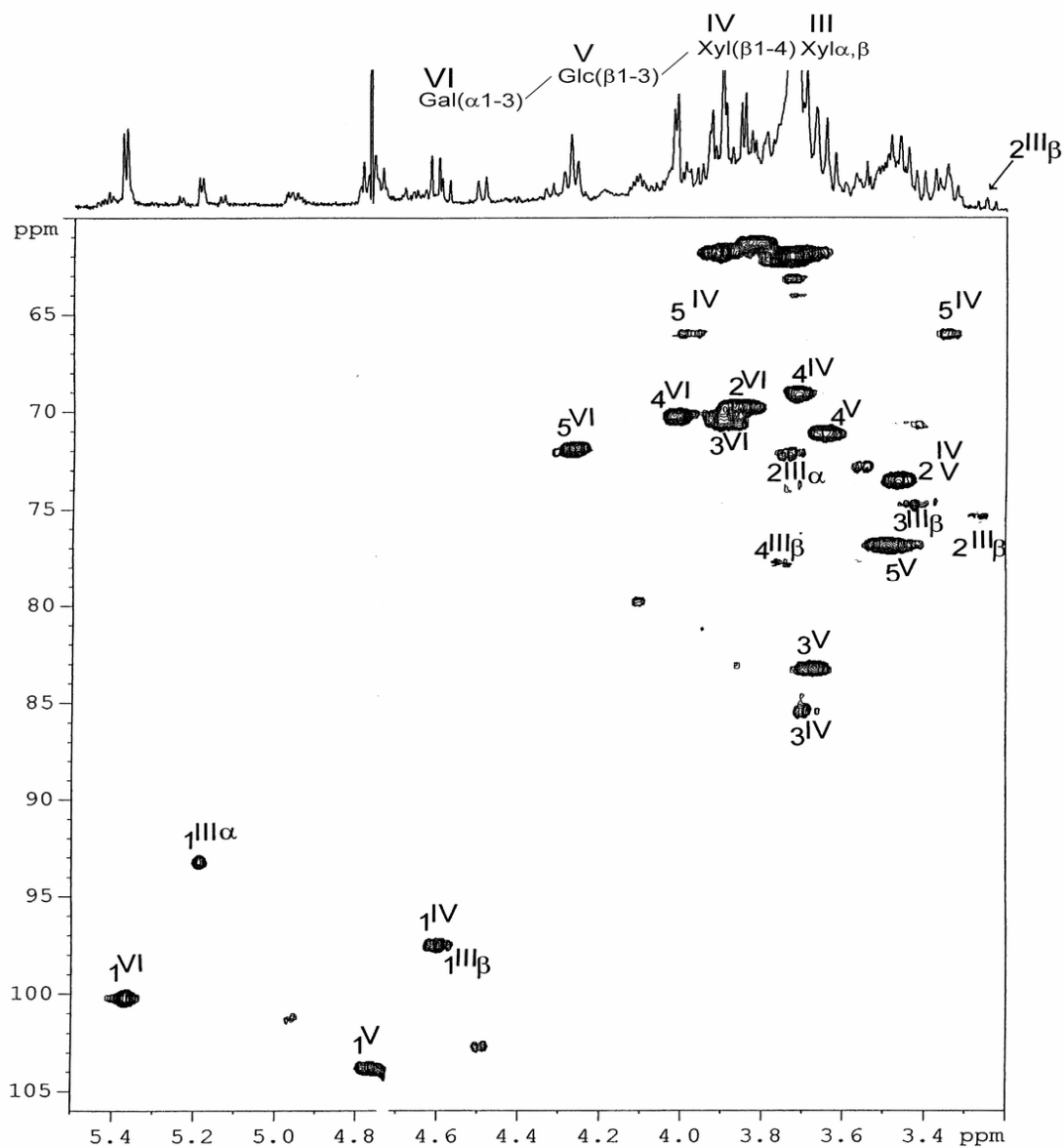


Figure 52: Agrandissement du spectre RMN hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC de l'oligosaccharide 5 entre  $\delta^1\text{H}$ =3,4-5,4 ppm et  $\delta^{13}\text{C}$ =60-106 ppm).

### 1.3. Acétolyse

L'acétolyse est une méthode complémentaire aux techniques conventionnelles d'hydrolyse acide. Cette technique nécessite l'acétylation complète du polymère et son hydrolyse "one pot" par une solution d'anhydride acétique, d'acide acétique et d'acide sulfurique (10/10/1 ; V/V/V). Dans ces conditions, les liaisons glycosidiques sont clivées sélectivement.<sup>157</sup> Il a été montré que l'acétolyse est retardée par la présence de groupements électronégatifs des parties aglycones et par le type de liaisons anomériques. Les composés osidiques engagés dans des liaisons  $\alpha$  sont plus susceptibles d'être acétolysés que les composés  $\beta$ . Aussi, les liaisons 1 $\rightarrow$ 6 qui sont relativement résistantes à l'hydrolyse acide sont hautement sensibles à l'acétolyse contrairement aux liaisons 1 $\rightarrow$ 4, 1 $\rightarrow$ 3 et 1 $\rightarrow$ 2.

Cette méthode, utilisée avec succès notamment dans l'élucidation de la structure de mannanes de levure<sup>158</sup>, ne conduit pas dans le cas du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum* à la libération d'oligosaccharides même après 48 heures de réaction.

L'inefficacité de l'acétolyse sur le polysaccharide matriciel sécrété par *Porphyridium cruentum* est cohérente avec les structures oligosaccharidiques caractérisées jusqu'à présent. Elle suggère également l'absence de monosaccharides liés en 6 dans la structure du polymère natif.

Malgré l'identification des structures d'oligosaccharides obtenues par hydrolyse acide et autohydrolyse, les données recueillies ne permettent pas, lorsqu'elles sont associées, de donner une image réaliste de la structure du polysaccharide de *Porphyridium cruentum*. Afin de compléter nos données, notre stratégie d'étude s'est donc orientée vers l'obtention et l'analyse de la structure d'oligosaccharides isolés au cours de dégradations chimiques sélectives de certaines liaisons glycosidiques.

## 2. Rupture chimique sélective

Les acides uroniques qui représentent de 6 à 7 % environ de la composition molaire du polymère peuvent constituer une zone de rupture privilégiée. La dégradation au lithium dans l'éthylène diamine et la dégradation alcaline en milieu réducteur sont spécifiques des acides uroniques et libèrent respectivement des oligosaccharides natifs et modifiés. Leurs mises en œuvre demeurent cependant délicates en raison d'une part, du nombre d'étapes qu'elles requièrent et, d'autre part, des faibles rendements auxquels elles conduisent.

### 2.1. Dégradation au lithium

#### 2.1.a. Obtention et caractérisation des fractions oligosaccharidiques

L'application de la méthode de dégradation au lithium permet de compléter l'étude structurale du polysaccharide. Les produits de la réaction séparés puis purifiés sur colonne d'exclusion stérique Biogel-P2 se répartissent en deux fractions, nommées oligosaccharides **Li 1** et **Li 2** (Figure 53).

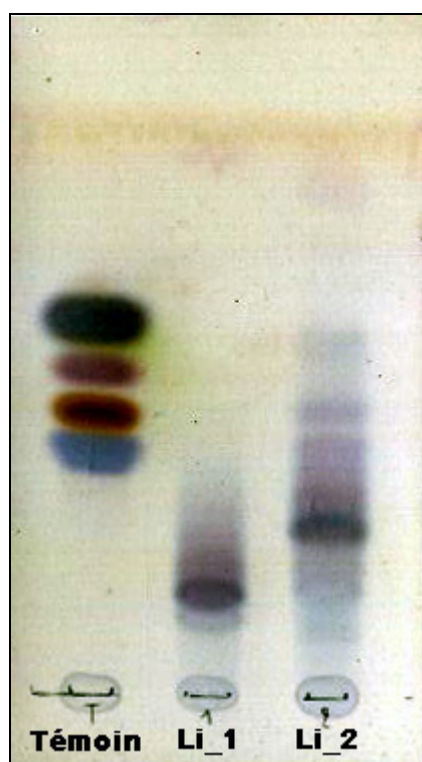


Figure 53: Oligosaccharides obtenus par dégradation au lithium dans l'éthylène diamine après purification sur colonne d'exclusion stérique Biogel-P2. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique.

L'analyse de la composition monosaccharidique des dérivés triméthylsilylés par CPG des oligosaccharides **Li 1** et **Li 2** et de la fraction polymérique partiellement dégradée confirme l'efficacité de la méthode employée (Tableau 10). La disparition des acides uroniques et donc le clivage de la liaison uronosidyle est démontrée par la composition de la fraction polymérique partiellement dégradée qui présente un pourcentage d'acide glucuronique moitié moins élevé que le polymère originel. De plus, les oligosaccharides **Li 1** et **2** sont composés de Xyl, de Gal et de Glc. Les rapports molaires variables entre ces derniers ne permettent pas d'établir immédiatement une logique dans leur distribution.

Tableau 10: Composition osidique (en % molaire) des fractions issues de la dégradation au lithium dans l'éthylène diamine.

	Composition osidique (% molaire)				
	Xyl	Gal	Glc	Man	GlcA
<b>Oligosaccharide Li 1</b>	43,1	28,2	28,7	-	-
<b>Oligosaccharide Li 2</b>	53,3	27,0	19,7	-	-
<b>Polymère partiellement dégradé</b>	34,2	24,7	34,4	3,2	3,5

### 2.1.b. Analyse structurale des oligosaccharides

#### i. Étude de la masse moléculaire

L'analyse par spectroscopie de masse MALDI des deux fractions oligosaccharidiques purifiées, illustrée Figure 54, fait apparaître, dans l'un et l'autre des cas, un pic majoritaire  $[M+Na]^+$ . Le composé **Li 1** (Figure 54-A) possède donc une masse molaire de  $900 \text{ g.mol}^{-1}$  et le composé **Li 2** (Figure 54-B) une masse molaire de  $576 \text{ g.mol}^{-1}$ .

Compte tenu des résultats de la composition molaire et des masses molaires caractéristiques des monosaccharidiques, nous pouvons déduire que les oligosaccharides :

- **Li 1** est un hexasaccharide composé de 3 pentoses et 3 hexoses

$$(M_{\text{Li 1}} = 3 \times M_{\text{pentose}} + 3 \times M_{\text{hexose}} - 5 \times M_{\text{H}_2\text{O}} = 3 \times 180 + 3 \times 150 - 5 \times 18 = 900 \text{ g.mol}^{-1}),$$

- **Li 2** est un tétrasaccharide composé de 3 pentoses et 1 hexose

$$(M_{\text{Li 1}} = 3 \times M_{\text{pentose}} + 1 \times M_{\text{hexose}} - 3 \times M_{\text{H}_2\text{O}} = 3 \times 180 + 1 \times 150 - 3 \times 18 = 576 \text{ g.mol}^{-1}).$$



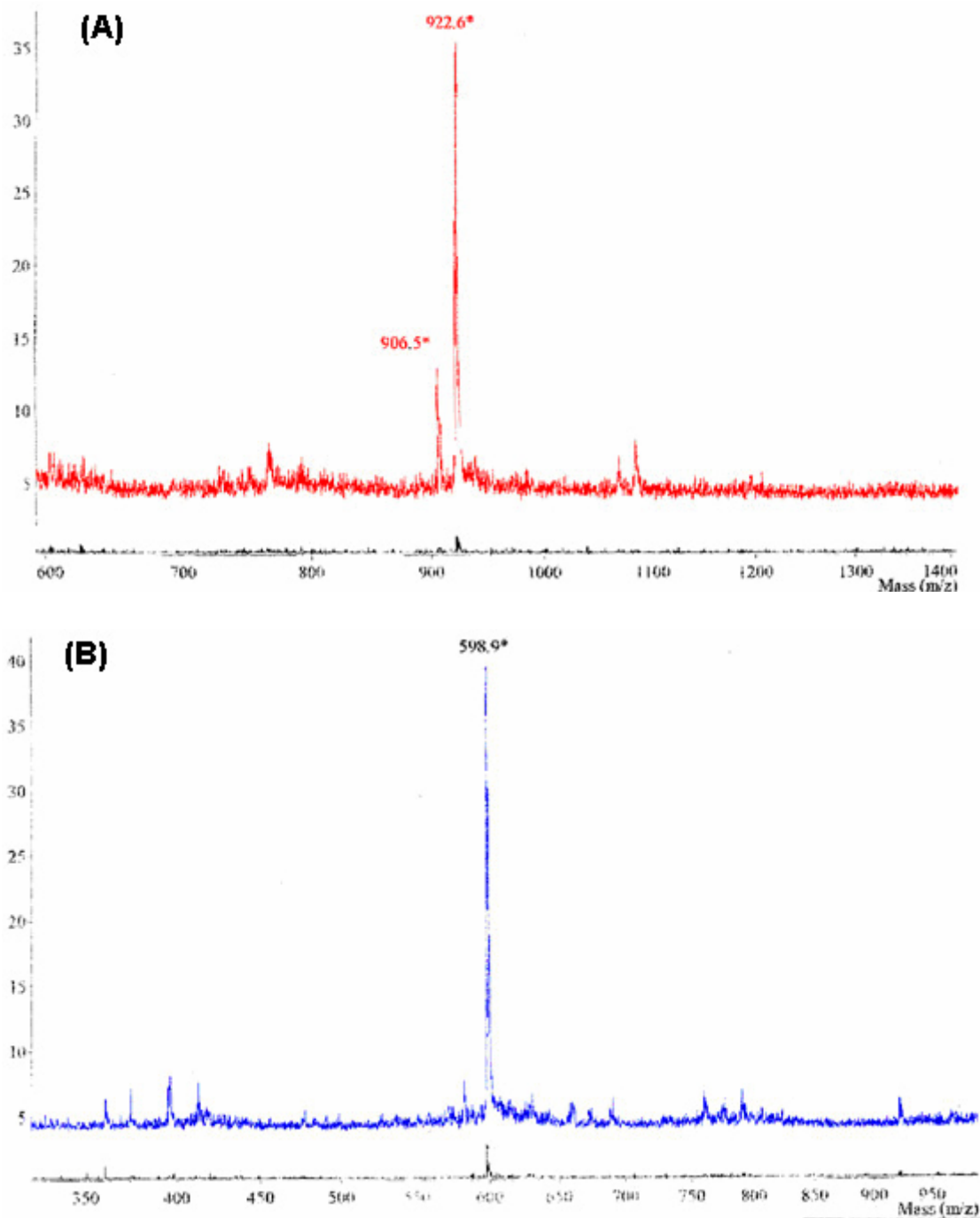


Figure 54: Spectres MALDI des composés *Li 1* (A) et *Li 2* (B).

## ii. Analyse RMN des oligosaccharides

La stratégie d'étude de la structure des oligosaccharides **Li 1** et **Li 2** qui a été adoptée est basée sur l'utilisation séquentielle de techniques RMN homo- et hétéronucléaires.

### Oligosaccharide Li 2

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H de l'oligosaccharide **Li 2** a été assigné en utilisant les résultats des séquences de RMN bidimensionnelles COSY et COSY relayé (Tableau 11, Figure 56). Basé sur les valeurs des constantes de couplage vicinal, 7 signaux ont été attribués aux unités osidiques suivantes :  $\alpha$ -Galp,  $\beta$ -Galp,  $\beta$ -Xylp. En fait, les 2 signaux anomériques libellés I $\alpha$  et I $\beta$  proviennent d'un Gal en position terminale réductrice. L'unité monosaccharidique I $\beta$  a été identifiée au  $\beta$ -galactose grâce à l'examen des signaux H-1 (d,  $J_{1,2} \sim 8$ Hz), H-2 (dd,  $J_{2,3} \sim 8$ Hz), H-3 (dd,  $J_{3,4} \sim 3$ Hz) et H-4 (pseudo-singulet, en réalité dd,  $J_{4,5} < 1$ Hz). La somme des intensités des signaux notés II $\alpha$  et II $\beta$  est égale à 1 par rapport aux signaux IIV. Il en est de même pour III $_A$  + III $_B$  et III $_A$  + III $_B$ . Les signaux II $\alpha$  et II $\beta$  sont donc les signaux relatifs aux protons H-1 des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la même unité de galactose réducteur, tandis que les signaux II $_A$  + II $_B$  et III $_A$  + III $_B$  subissent un dédoublement dû à l'effet anomère. L'unité monosaccharidique I $\alpha$  voit son identification à l' $\alpha$ -Galp compromise par un couplage fort ( $\delta$ H-2 =  $\delta$ H-3) et seuls les signaux H-4 (4I $\alpha$ ) et H-5 (5I $\alpha$ ) justifient de visualiser cette unité  $\alpha$ -Galp. En effet, le signal H-4 est un pseudo-singulet et le déblindage du signal H-5 est caractéristique d'un anomère  $\alpha$ . La superposition des signaux II $\alpha$  et 3I $\alpha$  apparaît nettement sur le spectre HMQC (Figure 57). Les unités de  $\beta$ -Xylp sont immédiatement identifiées sur la base de l'observation des protons anomères possédant des constantes de couplage  $J_{1,2} \sim 8$ Hz et des signaux H-2 et H-3 se présentant sous la forme de triplets. Les signaux H-4 sont du type ddd (couplage avec 2 protons H-5, respectivement axial et équatorial). L'expérience ROESY, qui montre les corrélations d'origine intra- ou extra-osidique permet d'établir la séquence de l'oligosaccharide **Li 2**:  $\beta$ -Xylp<sup>III $_B$</sup>  H-1,  $\beta$ -Galp<sup>IB</sup> H-4 à  $\delta=4,356/4,130$  ppm;  $\beta$ -Xylp<sup>III $_A$</sup>  H-1,  $\alpha$ -Galp<sup>IA</sup> H-4 à  $\delta=4,374/4,206$  ppm;  $\beta$ -Xylp<sup>II $_B$</sup>  H-1,  $\beta$ -Galp<sup>IB</sup> H-2 à  $\delta=4,714/3,634$  ppm;  $\beta$ -Xylp<sup>II $_A$</sup>  H-1,  $\alpha$ -Galp<sup>IA</sup> H-2 à  $\delta=4,497/3,966$  ppm;  $\beta$ -Xylp<sup>IV</sup> H-1,  $\beta$ -Xylp<sup>III</sup> H-4 à  $\delta=4,461/3,811$  ppm. Le spectre RMN-<sup>13</sup>C de l'oligosaccharide **Li 2** a été attribué en utilisant les résultats de la séquence HMQC (Figure 57). Les déplacement vers les champs faibles des signaux C-2, C-4 du Galp<sup>I</sup>, et du C-4 du Xylp<sup>III $_A,B$</sup>  comparés aux spectres correspondant aux monosaccharides non substitués confirme la position des liaisons.<sup>159</sup> Ces données confirment le motif de substitution et révèle la séquence des résidus osidiques dans l'oligosaccharide **Li 2** (Figure 55).

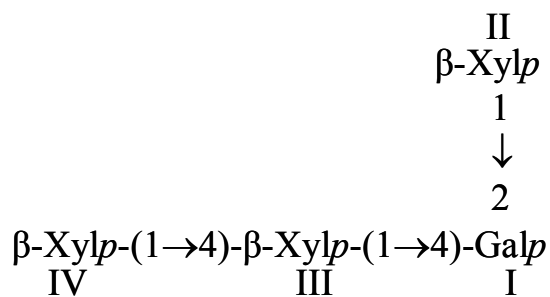


Figure 55: Séquence de l'oligosaccharide Li 2.

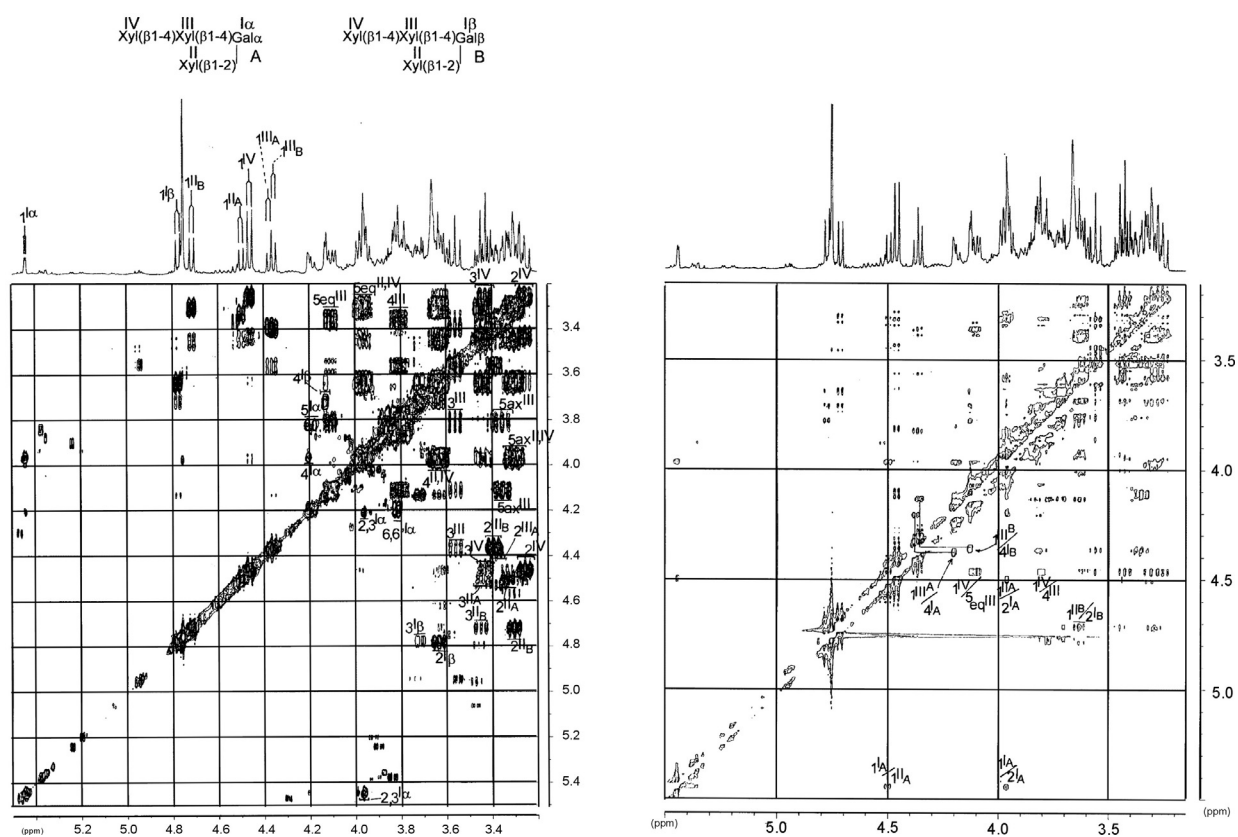


Figure 56: Spectres RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonucléaire de l'oligosaccharide Li 2. A gauche, agrandissement d'un spectre COSY relayé entre  $\delta^1\text{H}=5,5\text{-}3,2$  ppm ; à droite : agrandissement entre  $\delta=5,5\text{-}3,15$  ppm d'un spectre ROESY 400 ms.

Tableau 11: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm)  
des monosaccharides constitutifs des oligosaccharides **Li 1** et **Li 2**.

Oligosaccharide	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5ax	H-5eq	H-6,6'	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<b>Li 2</b>													
I $\alpha$	5,443	3,966	3,963	4,206	4,193	-	3,818	91,56	<b>77,26<sup>a</sup></b>	67,89	<b>79,61</b>	71,89	61,45
I $\beta$	4,775	3,634	3,715	4,130	3,772	-	3,68	97,44	<b>80,33</b>	71,66	<b>78,45</b>	76,13	61,83
IIA	4,497	3,331	3,447	3,632	3,301	3,970	-	103,08	74,04	76,91	70,44	66,47	-
IIB	4,714	3,303	3,445	3,632	3,301	3,970	-	103,99	74,04	76,91	70,44	66,47	-
IIIA	4,374	3,384	3,562	3,811	3,355	4,107	-	104,70	74,50	74,97	<b>77,64</b>	64,29	-
IIIB	4,356	3,396	3,562	3,811	3,355	4,107	-	104,70	74,50	74,97	<b>77,64</b>	64,29	-
IV	4,461	3,256	3,429	3,632	3,301	3,970	-	103,08	74,04	76,92	70,44	66,47	-
<b>Li 1</b>													
I $\alpha$	5,43	3,97	3,97	4,21	4,18	-	3,83	91,54	<b>77,18</b>	67,92	<b>79,61</b>	71,83	61,56
I $\beta$	4,77	3,66	3,71	4,15	3,76	-	N.D.	97,22	<b>80,47</b>	71,66	<b>78,53</b>	75,95	N.D.
IIA	4,51	3,33	3,50	3,65	3,29	3,97	-	102,64	74,26	76,83	70,46	66,41	-
IIB	4,72	3,33	3,50	3,65	3,29	3,97	-	103,72	74,26	76,83	70,46	66,41	-
IIIA	4,39	3,41	3,58	3,81	3,83	4,14	-	104,47	74,46	74,96	<b>77,64</b>	64,27	-
IIIB	4,38	3,41	3,58	3,81	3,83	4,14	-	104,47	74,46	74,96	<b>77,64</b>	64,27	-
IV	4,51	3,48	3,70	3,73	3,34	4,04	-	102,62	73,52	<b>85,26</b>	69,07	66,03	-
V	4,77	3,48	3,67	3,67	3,49	-	3,93 3,69	103,72	73,52	<b>83,80</b>	71,08	76,83	61,92
VI	5,36	3,88	3,89	4,03	4,25	-	3,75	100,23	69,83	70,70	70,46	72,04	61,15

<sup>a</sup>Les valeurs en gras correspondent aux carbones engagés dans les liaisons glycosidiques.

N.D.= Non déterminé.

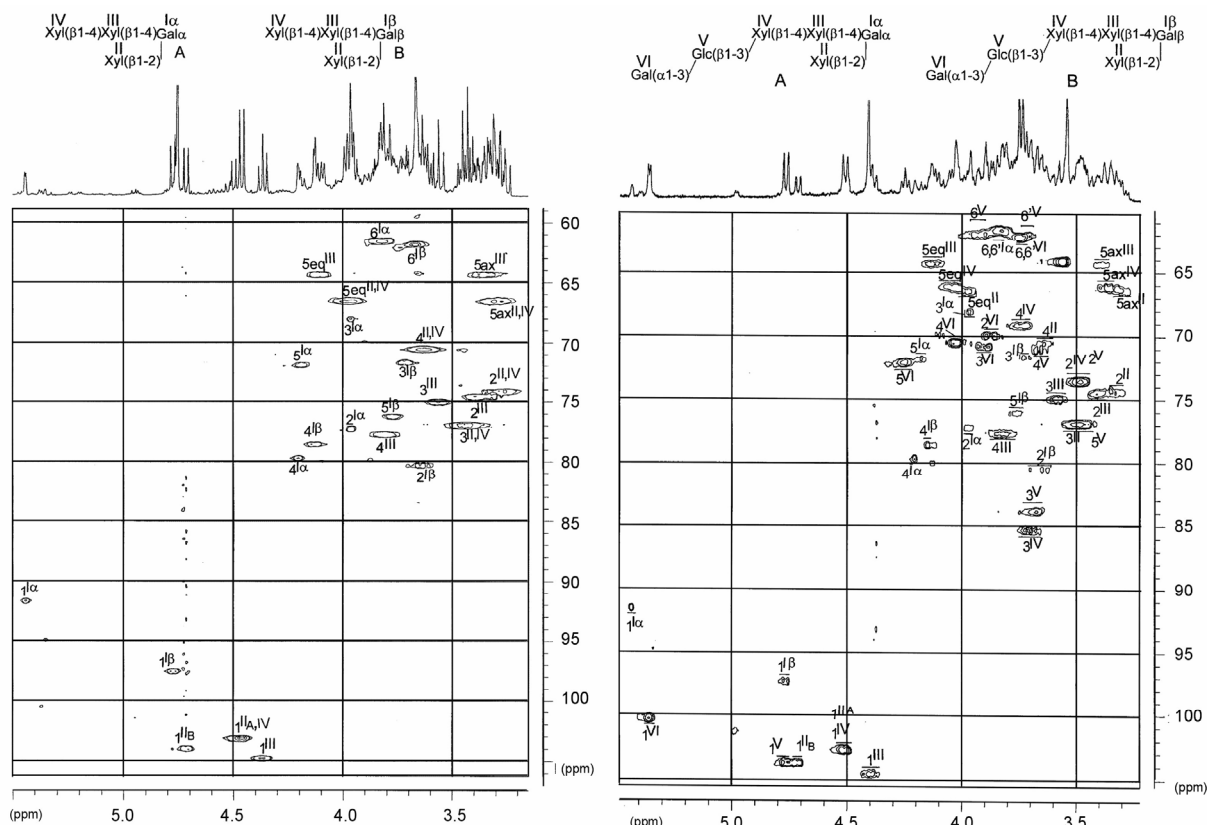


Figure 57: Agrandissements de spectres RMN hétéronucléaires  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC des oligosaccharides **Li 2** (à gauche) et **Li 1** (à droite). A gauche, agrandissement  $\delta^1\text{H}=5,5\text{-}3,15$  ppm et  $\delta^{13}\text{C}=106\text{-}59$  ppm ; à droite, agrandissement  $\delta^1\text{H}=5,5\text{-}3,2$  ppm et  $\delta^{13}\text{C}=105\text{-}60$  ppm.

### Oligosaccharide Li 1

L'analyse RMN de l'oligosaccharide **Li 1** a été réalisée selon le même principe. Les unités osidiques suivantes ont été identifiées :  $\beta\text{-Xylp}^{\text{II, III, IV}}$ ,  $\alpha\text{-Galp}^{\text{I, VI}}$ ,  $\beta\text{-Galp}^{\text{I}}$  et  $\beta\text{-Glc}^{\text{V}}$  (Tableau 11). L'interprétation des spectres HMQC (Figure 57) et TOCSY permet donc d'établir la séquence des unités osidiques de l'oligosaccharide **Li 1**. La comparaison avec les spectres du composé 2 indique clairement que les déplacements chimiques des composés I, II, et III demeurent inchangés. Par contre, les deux déplacements chimiques vers les champs faibles ( $\delta=85,26$  et  $83,80$  ppm) sont caractéristiques de deux nouvelles liaisons osidiques. L'unité  $\text{Xylp}^{\text{IV}}$  qui voit tous ses protons déblindés et son carbone 3 fortement déblindé par rapport au  $\text{Xylp}^{\text{IV}}$  du composé **Li 2** ( $\Delta\delta=-8,6$  ppm) est substitué en C-3. De même, le C-3 de l'unité  $\beta\text{-Glc}^{\text{V}}$  qui est considérablement déblindé par rapport au déplacement chimique d'un standard  $\beta$ -méthylglucoside est engagé dans une liaison osidique. Ces données permettent de

définir le motif de substitution et la séquence des résidus osidiques de l'oligosaccharide **Li 1** (Figure 58).

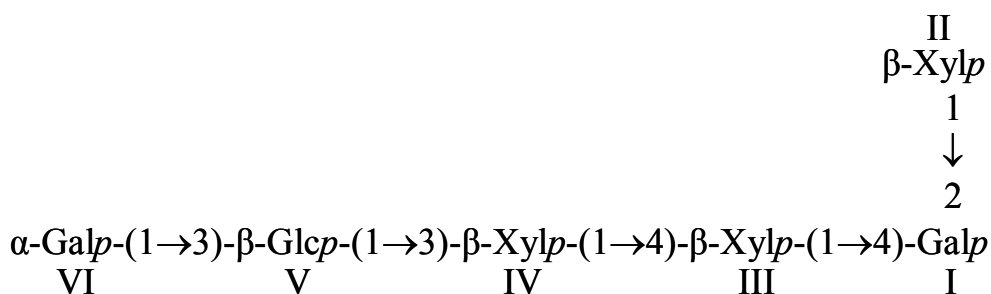


Figure 58: Séquence de l'oligosaccharide **Li 1**.

### Détermination de la configuration absolue

L'étude de la configuration D ou L des monosaccharides, établie selon Gerwig et al. (1979)<sup>160</sup>, a montré la présence des deux isomères du galactose (Tableau 12). Puisque le (-)-2 butanol commercial contient environ 6 % de l'énantiomère (+), un facteur de correction a du être calculé en fonction des données obtenues à partir du D- et L-Gal. Malgré cette correction, il est possible d'observer un excès de 17-20 % de D-Gal dans les composés **Li 1** et **Li 2**. Néanmoins, l'analyse des données RMN a montré que les Xyl<sup>II, III</sup> (Figure 56), présents dans la composition de l'oligosaccharide **Li 2**, sont seulement liées à une unité de D (ou L)-Gal puisque nous n'observons aucun dédoublement des signaux anomériques du xylose. A partir de ces observations, les oligosaccharides **Li 1** et **Li 2** sont finalement composés de 3 D-Xyl, 1 L-Gal, 1 D-Gal, 1 D-Glc, et 3 D-Xyl, 1 L-Gal, respectivement.

Le fait que le composé **Li 2** fasse partie intégrante du composé **Li 1** suggère fortement que l'unité non-réductrice terminale de l' $\alpha$ -Gal présente dans le produit **Li 1** ait la configuration D. Par conséquent, les oligosaccharides **Li 1** et **Li 2** présentent les structures suivantes (Figure 59).

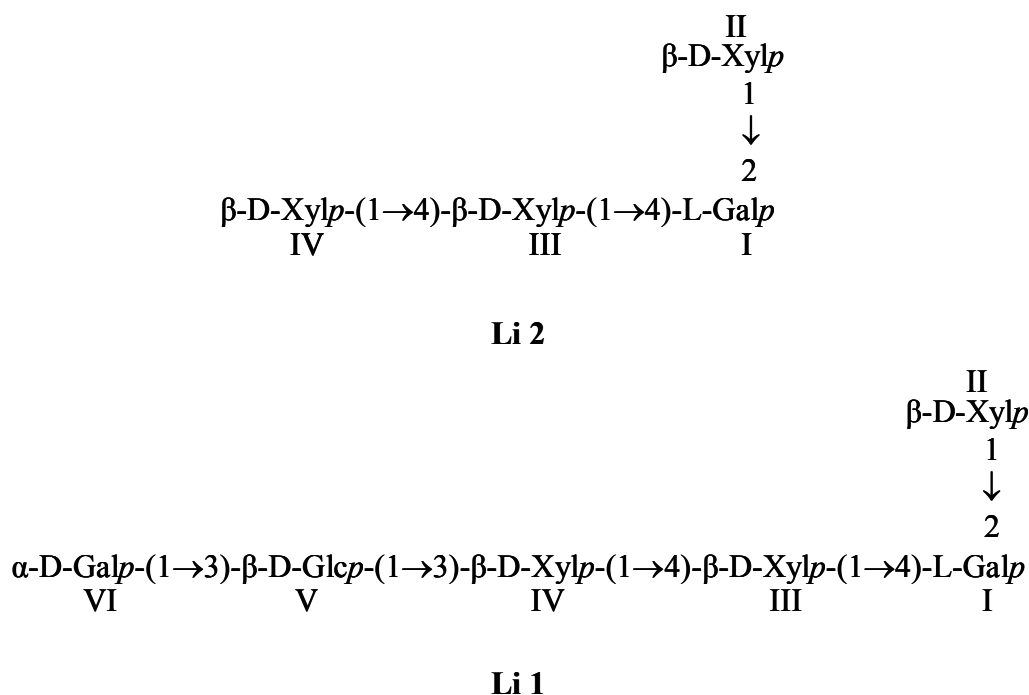


Figure 59: Structure des oligosaccharides **Li 1** et **Li 2** obtenus par dégradation au lithium dans l'éthylène diamine.

Tableau 12: Analyse par CPG des dérivés (-)-2-butylglycosides triméthylsilylés obtenus à partir des oligosaccharides **Li 1** et **2**.

	% molaire					
	Oligosaccharide Li 1			Oligosaccharide Li 2		
	a	b	c	a	b	c
<b>D-Xyl</b>	3,0	3,0	3	3,0	3,0	3
<b>L-Gal</b>	0,76	0,83	1	0,65	0,80	1
<b>D-Gal</b>	1,24	1,17	1	0,35	0,20	0
<b>D-Glc</b>	1,0	1,0	1	-	-	-

*a* : Avant correction ; *b* : après la correction due à la contamination du (-)-2-butanol par le (+)-2-butanol ;  
*c* : après l'examen des données par RMN.

La présence concomitante de D- et L-Gal semble être une caractéristique commune aux polysaccharides des algues rouges. Cette particularité a été décrite par Medcalf et *al.* (1975)<sup>143</sup> et par Percival et Foyle (1979)<sup>140</sup> dans le cas de diverses microalgues rouges. Elle est également bien connue dans le cas de l'agar et/ou des carraghénanes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** et Figure 13) produits par les macroalgues rouges.

La fragmentation du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum* par la dégradation uronique avec le lithium dans l'éthylènediamine prouve qu'il s'agit d'un outil méthodologique très puissant. Les résultats obtenus nous ont permis de proposer la structure de deux oligosaccharides représentatifs de l'architecture du polysaccharide. Il est également intéressant de remarquer que les séquences oligosaccharidiques **5** (Figure 51) et **Li 2** présentent une partie commune avec la structure de l'oligosaccharide **Li 1**.

## 2.2. Dégradation alcaline en milieu réducteur

La dégradation alcaline peut conduire à la dégradation des polysaccharides par  $\beta$ -élimination. En milieu réducteur, elle est rendue plus sélective et va orienter la dégradation vers la libération des substitutions en C-4 des acides uroniques.

Appliquée à 50 mg de polysaccharide, la dégradation alcaline en milieu réducteur va permettre la libération de structures oligosaccharidiques réduites qui peuvent être séparées par CCM (Figure 60 et Figure 61). La cinétique de la réaction est lente et une durée de 8 h est au moins nécessaire afin de dépolymériser le polysaccharide de façon semi quantitative. Parmi les structures oligosaccharidiques libérées, seule la fraction intitulée **OligoNaOH/NaBH<sub>4</sub> 1** majoritaire au bout de deux heures de réaction a été purifiée et analysée par RMN.



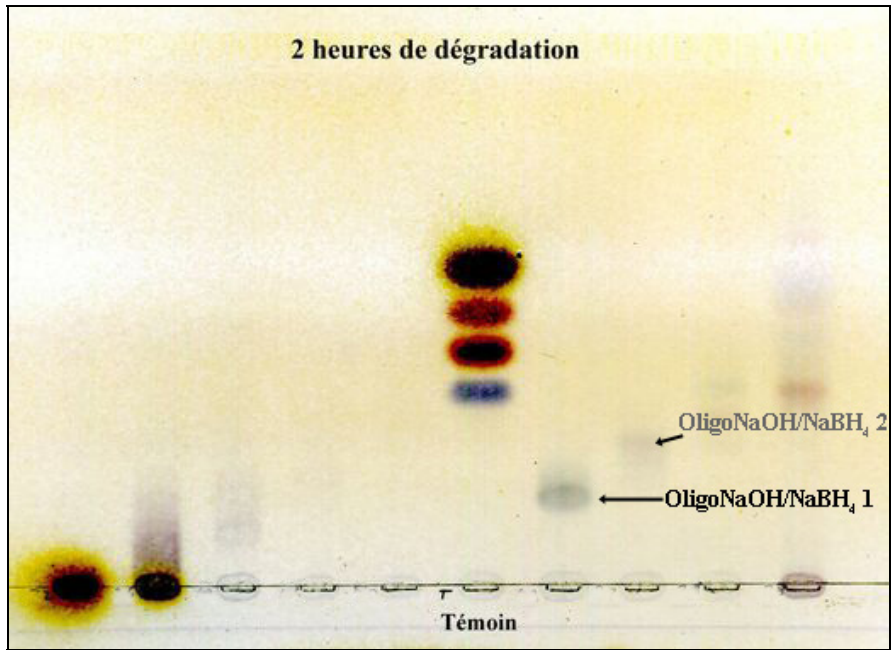


Figure 60: Profil chromatographique d'exclusion stérique (Biogel P-2) des oligosaccharides obtenus après 2 h de dégradation alcaline en milieu réducteur. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique.

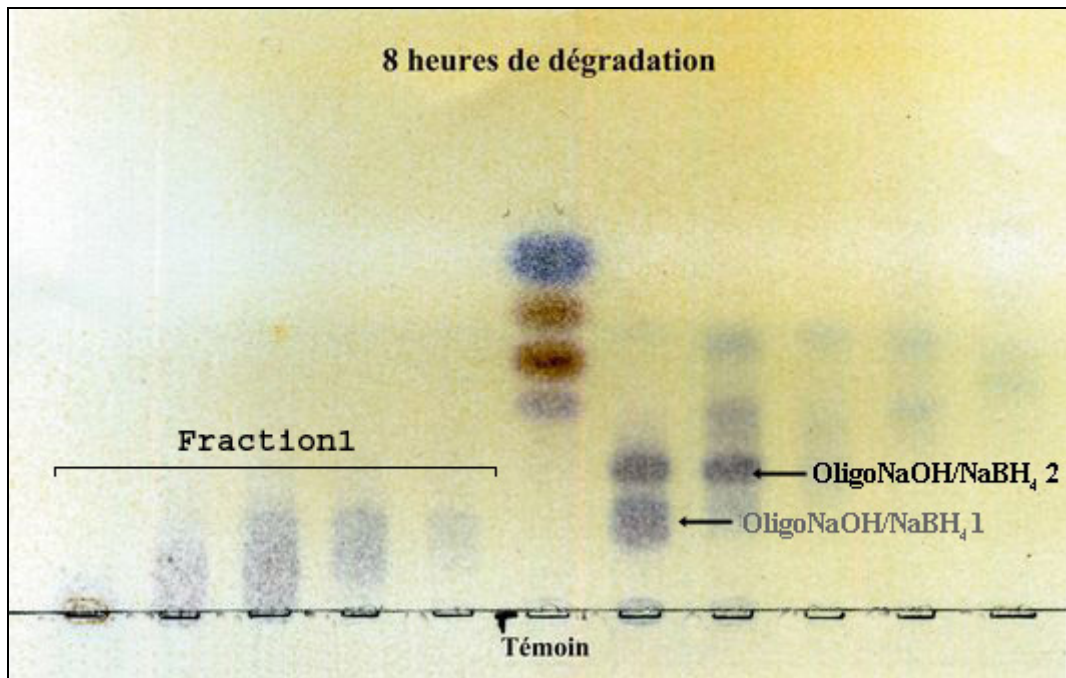


Figure 61: Profil chromatographique d'exclusion stérique (Biogel P-2) des oligosaccharides obtenus après 8 h de dégradation alcaline en milieu réducteur. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique.

Les paramètres RMN issus de l'analyse de ce composé sont présentés en Figure 63 et Tableau 13. Ils recouvrent ceux de l'hexasaccharide obtenu par dégradation au lithium (Tableau 11 et Figure 57) et ceux du tétrasaccharide obtenu par autohydrolyse (Tableau 9 et Figure 52). Ils nous permettent, selon la méthode du "Finger Print" développée par Vliengenthart<sup>135</sup>, de décrire la structure d'un tétrasaccharide réduit dont la séquence est représentée Figure 62.

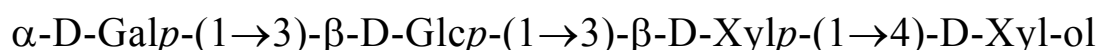


Figure 62: Structure de l'oligosaccharide **OligoNaOH/NaBH<sub>4</sub> 1** obtenu par dégradation alcaline en milieu réducteur.

Tableau 13: Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 (en ppm) des monosaccharides constitutifs de l'oligosaccharide **OligoNaOH/NaBH<sub>4</sub> 1**.

Déplacements chimiques (en ppm)				
$\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Xyl-ol}$				
	Gal	Glc	Xyl	Xyl-ol
<b>H-1</b>	5,374	4,79	4,601	3,70/3,65
<b>H-2</b>	3,838	3,459	3,529	3,82
<b>H-3</b>	3,86	3,69	3,72	3,78
<b>H-4</b>	4,018	3,66	3,73	3,92
<b>H-5</b>	4,276	3,49	4,015/3,344	3,78/3,72
<b>H-6/H-6'</b>	3,73	3,93/3,69	-	-
<b>C-1</b>	100,51	104,40	97,50	63,4
<b>C-2</b>	69,83	73,20	73,85	72,79
<b>C-3</b>	70,60	<b>83,55</b>	<b>85,26</b>	71,25
<b>C-4</b>	70,45	71,09	69,05	<b>81,49</b>
<b>C-5</b>	72,02	77,00	66,0	61,9
<b>C-6</b>	61,9	61,90	-	-

Les valeurs en gras correspondent aux carbones engagés dans les liaisons glycosidiques.

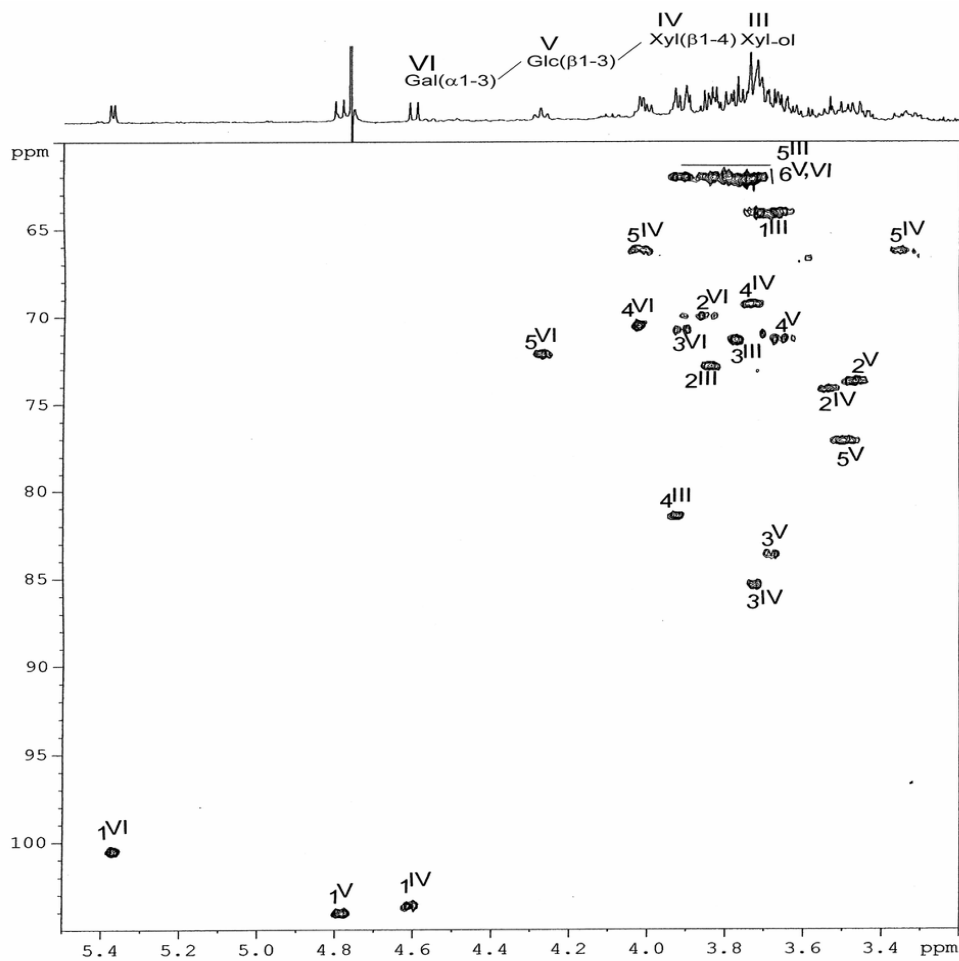


Figure 63: Agrandissement du spectre RMN hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC de l'oligosaccharide  $\text{NaOH}/\text{NaBH}_4$  1 ente  $\delta^1\text{H}=3,3-5,5$  ppm et  $\delta^{13}\text{C}=60-105$  ppm.

## IV. Proposition d'un modèle structural

Nous avons montré que la conjugaison des techniques de rupture de liaisons glycosidiques non sélectives (hydrolyse acide, autohydrolyse) ou sélectives (dégradation au lithium ou dégradation alcaline en milieu réducteur) permet l'étude structurale de composés polysaccharidiques anioniques par l'analyse simultanée des oligosaccharides recueillis après purification par spectroscopie RMN.

En prenant appui sur les informations bibliographiques disponibles ainsi que sur les données expérimentales enregistrées au cours de notre travail (Tableau 14), il est possible de présenter les structures des oligosaccharides issus du polysaccharide natif dans l'objectif de proposer une structure hypothétique de ce dernier.

Tableau 14: Tableau récapitulatif des différents oligosaccharides obtenus à partir de *Porphyridium cruentum*.

Oligosaccharides	Méthode	Réf.
$\alpha$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-Glcp-(1→3)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xylp	Autohydrolyse	Ruiz <i>et al.</i> , en préparation
4-O-SO <sub>3</sub> -D-Xylp	Autohydrolyse	Ruiz <i>et al.</i> , en préparation
6-O-SO <sub>3</sub> - $\beta$ -D-Glcp-(1→3)-D-Xylp	Hydrolyse acide ménagée	
$\alpha$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-Glcp-(1→3)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xylitol	Dégradation alcaline	Ruiz <i>et al.</i> , en préparation
$\beta$ -D-Xylp 1 ↓ 2 $\beta$ -D-Xylp-(1→4)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-L-Galp	Dégradation au lithium	Gloaguen <i>et al.</i> , 2004. <sup>161</sup>
$\beta$ -D-Xylp 1 ↓ 2 $\alpha$ -D-Galp-(1→3)- $\beta$ -D-Glcp-(1→3)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-L-Galp		
3-O-( $\alpha$ -D-GlcpA)-L-Galp	Hydrolyse acide	Geresh <i>et al.</i> , 1990. <sup>147</sup>

De plus, à ce stade de la présentation, il est utile de rappeler que :

- La méthanolyse et les dégradations au lithium et alcalines conduisent à la perte des substituants portés par chaque monosaccharide et donc, dans le cas du polysaccharide de *Porphyridium cruentum*, à sa désulfatation,
- L'inefficacité de l'acétolyse suggère l'absence de liaison en 6,
- Au cours de l'hydrolyse acide, la liaison uronosidyle GlcA-Gal est stabilisée par les effets inducteurs et conformationnels du groupement carboxyle en C-5 (Figure 24).<sup>116</sup> Les substitutions du galactose seront en revanche, en fonction de la force des liaisons glycosidiques, normalement affectée par l'hydrolyse acide.

Compte tenu des données expérimentales qui viennent d'être présentées, il est possible de proposer une structure primaire théorique du polysaccharide matriciel de *Porphyridium cruentum* qui prendrait appui sur l'acide aldobiuronique 3-O-( $\alpha$ -D-GlcpA)-L-Galp, et où les oligosaccharides neutres obtenus par dégradation au lithium dans l'éthylène diamine seraient disposés en position latérale. Le polysaccharide matriciel sécrété par *Porphyridium cruentum* pourrait ainsi être construit sur la répétition de l'unité dodécasaccharidique suivante :

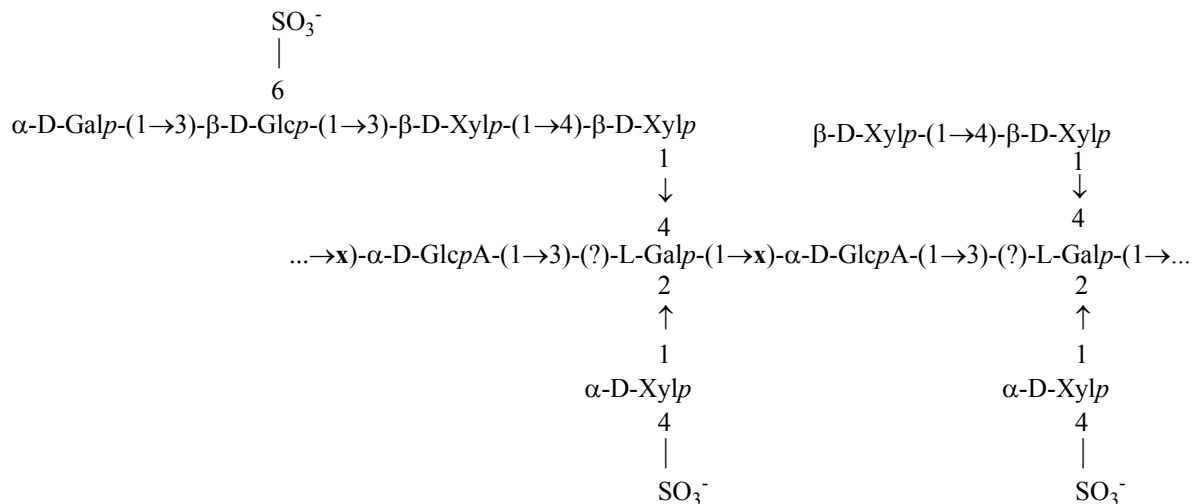


Figure 64: Motif de répétition hypothétique du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*.

L'originalité de ce modèle repose sur l'acide aldobiuronic ( $3-O-(\alpha-D-GlcpA)-L-Galp$ ), décrit par le groupe d'Arad <sup>147</sup>, considéré ici comme le constituant unique de la chaîne principale du polysaccharide. Faute d'avoir obtenu des oligosaccharides de DP suffisant et renfermant notamment de l'acide glucuronique, il n'est pas possible, en l'état actuel des de nos travaux, de préciser la nature de la liaison qui relierait le L-Galp au D-GlcpA. L'analyse RMN du polysaccharide natif étant rendue difficile en raison de la complexité de ces systèmes, ce modèle devra être validé par l'expérience en recherchant notamment à isoler puis à caractériser des unités oligosaccharidiques composées d'acide glucuronique. Toutefois, en raison d'un fort encombrement stérique des substituants en C-1, la substitution en C-2 de l'acide glucuronique est rendue peu probable. Par ailleurs, dans leur travail sur le polysaccharide capsulaire d'une cyanobactérie thermale, Gloaguen *et al.* (1999) <sup>122</sup>, rappellent que la dégradation au lithium ne conduit pas à la libération du substituant en C-3 de l'acide uronique. <sup>118, 119, 162</sup> Elle serait par contre privilégiée dans le cas d'une substitution en C-4. Nous pouvons alors légitimement supposer que  $x = 4$  dans le motif de répétition hypothétique du polysaccharide sécrété par *Porphyridium cruentum* (Figure 64). Une telle hypothèse pourrait être validée expérimentalement par des essais de dégradation alcaline du polysaccharide en milieu réducteur. En effet, compte tenu du mécanisme mis en jeu, une telle dégradation devrait conduire, si le modèle structural théorique est correct, à la rupture des substitutions en C-4 de l'acide glucuronique et donc à la libération des oligosaccharides dont les structures prédictives sont présentées en Figure 65.

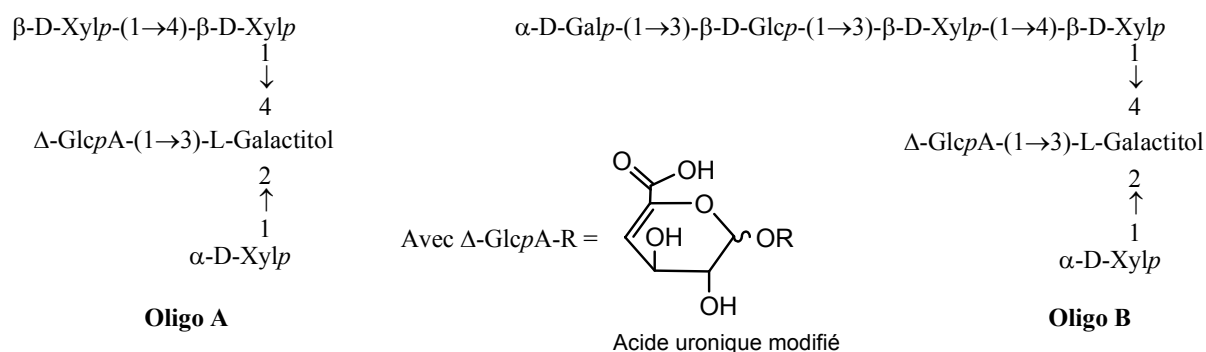


Figure 65: Oligosaccharides hypothétiques libérées par dégradation alcaline du polysaccharide de *Porphyridium cruentum* en milieu réducteur dans l'hypothèse d'un Gal lié en 1→4 au GlcA.

C'est ce que confirme le spectre de masse MALDI (Figure 66) réalisé sur la **Fraction 1** de l'hydrolysate obtenu en milieu alcalin et réducteur (Figure 61). Les pics, de masse moléculaire  $[M+Na]^+$  égale à  $759 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $627 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $495 \text{ g.mol}^{-1}$  (Figure 66) confirment la présence de la structure **Oligo A** attendue (Figure 65) et de ses produits de dégradation à 1 ou 2 pentoses (Tableau 15). Les pics correspondants aux masses moléculaires  $[M+Na]^+$  à  $1083 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $921 \text{ g.mol}^{-1}$  caractéristiques de la structure **Oligo B** (Figure 65) et de son produit de dégradation à 1 hexose sont absents du spectre de masse. Tout en confirmant la liaison en 4 du Gal sur le GlcA, ces données expérimentales s'ajoutent aux précédentes et renforcent le bien fondé du modèle structural hypothétique proposé pour le polysaccharide de *Porphyridium cruentum* (Figure 64). Toutefois, la masse moléculaire à  $891 \text{ g.mol}^{-1}$  ne peut, en l'état de notre argumentaire, trouver de justification. Chacune des structures oligosaccharidiques réduites devra donc être purifiées et analysées par spectroscopie RMN afin de valider l'attribution des masses moléculaires précédentes.

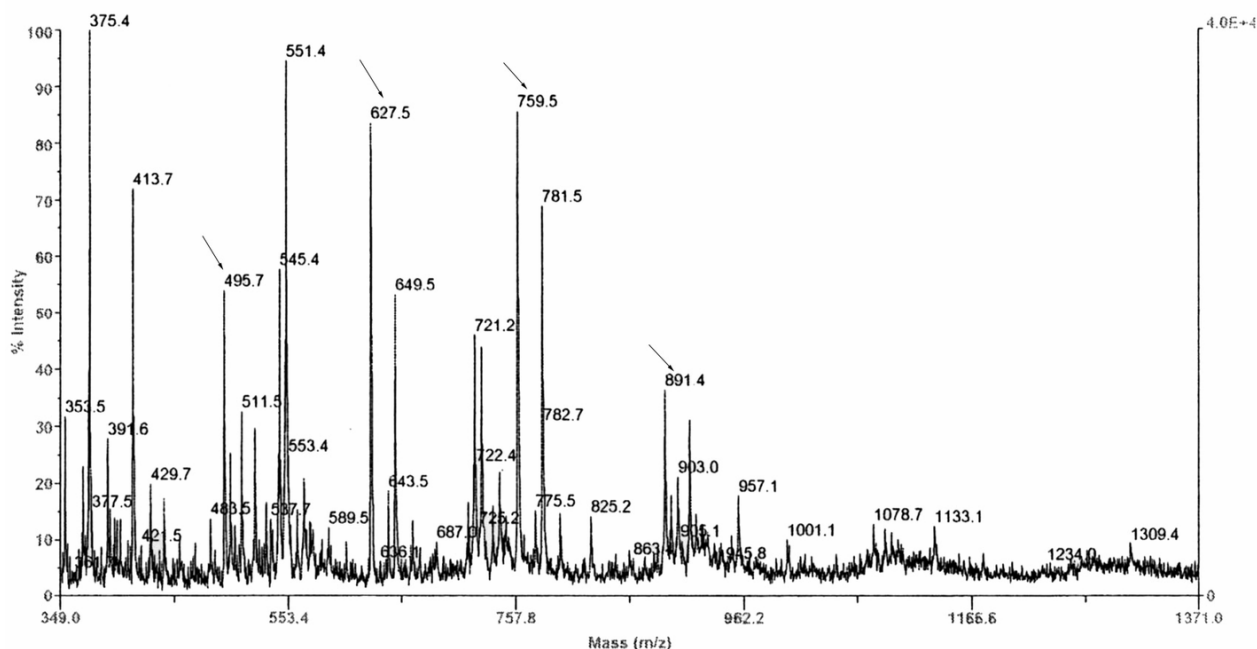


Figure 66: Spectre de masse MALDI de la fraction 1 de l'hydrolysate obtenu en milieu alcalin et réducteur.

Tableau 15: Oligosaccharides identifiés par spectroscopie de masse MALDI à partir de la **Fraction 1** obtenue par dégradation alcaline en milieu réducteur.

	<b>Pic</b> [M+Na] <sup>+</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	<b>Masse</b> <b>Moléculaire</b> (en g.mol <sup>-1</sup> )	<b>ΔGlcA</b> M=158 g.mol <sup>-1</sup> sans H <sub>2</sub> O de liaison	<b>Pentose</b> M=132 g.mol <sup>-1</sup> sans H <sub>2</sub> O de liaison	<b>Hexitol</b> M=182 g.mol <sup>-1</sup>	<b>Hexose</b> M=162 g.mol <sup>-1</sup> sans H <sub>2</sub> O de liaison
<b>Oligo A</b>	<b>495</b>	<b>472</b>	1	1	1	-
	<b>627</b>	<b>604</b>	1	2	1	-
	<b>759</b>	<b>736</b>	1	3	1	-
	<b>891 (N.J)</b>	<b>868</b>	1	4	1	-
<b>Oligo B</b>	<b>921 (N.O)</b>		1	3	1	1
	<b>1083(N.O)</b>		1	3	1	2

N.J : Non justifié ; N.O : Non observé.

Si nos travaux n'apportent pas de réponses définitives sur la structure du polysaccharide matriciel sécrété par *Porphyridium cruentum*, ils nous renseignent cependant sur son extraordinaire complexité qui se traduit par la grande diversité des monosaccharides et des liaisons glycosidiques qui le compose. D'un point de vue expérimental, cette complexité se traduit également par le nombre important des oligosaccharides neutres ou acides qui peuvent être obtenus par dégradations sélectives ou non sélectives. En préservant la sulfatation, l'autohydrolyse apporte des renseignements précieux sur la localisation des substitutions dont on est encore en droit de se poser la question de la régularité de la distribution le long du polymère. Cette dernière remarque ouvre de façon plus générale la discussion sur les voies de biosynthèse d'un polysaccharide par des cellules eucaryotes primitives.



## V. Étude comparée des polysaccharides extracellulaires sécrétés par *Rhodella reticulata* et *Porphyridium cruentum*

Il existe une extraordinaire diversité de structure et de composition des colloïdes produits par les macro- et micro- algues rouges. Cette diversité est souvent associée à des fonctions biologiques précises (régulations hydriques, mécaniques et ioniques), mais aussi à la position phylogénétique des algues qui les ont produits.<sup>132</sup> Le suivi de la composition et de la structure de ces polymères est susceptible d'apporter des informations supplémentaires et complémentaires aux données issues de l'analyse morphologique, ultrastructurale, chimique et moléculaire. Le concept de l'utilisation de la composition chimique des polysaccharides (ou de l'existence de structures communes) comme outil de classification n'est pas nouveau. La chimiotaxonomie est une discipline sur laquelle Tseng<sup>163</sup> s'est appuyé dès 1945 pour établir sa classification. Il est évident que plus le nombre de critères utilisés est grand, plus les corrélations entre les facteurs obtenus sont importantes, mieux les classifications taxonomiques pourront exprimer les relations phylogénétiques entre espèces. Comme en témoigne l'étude précédente relative à la structure du polysaccharide produit par *Porphyridium*, la chimiotaxonomie a profité au cours des dernières décennies de l'évolution des technologies de l'analyse et de la caractérisation de la structure des glucides. Cette dernière remarque nous a incité à poursuivre notre démarche d'analyse structurale et à l'étendre au polysaccharide sécrété par le genre *Rhodella*, microalgue rouge voisine de *Porphyridium*. Il s'agit dans cette démarche d'appréhender, au travers d'une étude comparée, les compositions et les structures des polysaccharides produits par chacune de ces deux microalgues rouges appartenant à la famille des Porphyridiales.

# 1. Extraction et caractérisation chimique du polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata*

## **1.1. Extraction du polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata***

La méthodologie suivie pour l'extraction de la phase polysaccharidique extracellulaire est similaire à celle adoptée pour *Porphyridium cruentum* (Figure 38). Seule la phase de purification des polysaccharides a été adaptée en fonction de la spécificité du polymère. En effet, il semble que les polysaccharides extraits ne présentent pas suffisamment de sites ioniques pour être précipités sélectivement par une solution de CTAB à 3 % (M/V). Les polysaccharides extracellulaires seront toutefois recueillis après précipitation dans l'éthanol. Après lyophilisation, ils représentent 4 % de la biomasse sèche contre 14 % chez *Porphyridium cruentum*.

## **1.2. Caractérisation chimique des différents résidus d'extraction**

Lors de la phase d'extraction séquentielle des polysaccharides extracellulaires, des aliquotes ont été prélevés et analysés par CPG afin de suivre le processus d'extraction (Tableau 16).

Tableau 16: Composition monosaccharidique (en % molaire) des différents résidus d'extraction isolés à partir de *Rhodella reticulata*.

		Composition molaire (%)				
		Rha	Xyl	Gal	Glc	GlcA
<b>Rhodella reticulata</b>	<b>Algue brute</b>	13,2	48,2	14,7	15,3	8,6
	<b>Algue dépigmentée</b>	14,6	49,7	11,2	12,2	12,3
	<b>Phase fibrillaire</b>	7,8	31,1	11,3	45,0	4,8
	<b>Polysaccharide extracellulaire</b>	12,5	55,7	10,2	7,1	14,5
<b>Porphyridium cruentum</b>	<b>Polysaccharide extracellulaire</b> <sup>161</sup>	-	56,9	19,0	17,7	6,4

Les dosages colorimétriques des acides uroniques et des sucres totaux permettent de préciser la composition globale du polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata*. Il est composé de 78 % d'oses neutres et de 22 % d'acides uroniques (Tableau 17).

La similitude des compositions monosaccharidiques entre l'algue brute et de l'algue dépigmentée confirme le caractère non destructif de l'étape de dépigmentation. La phase fibrillaire est composée majoritairement de glucose ce qui met en évidence la présence de polymères tels que les glucanes qui contribuent à l'organisation de la paroi cellulaire. La phase polysaccharidique extracellulaire de *Rhodella reticulata* est hétérogène et sa composition monosaccharidique est conforme aux données déjà publiées (Tableau 16).<sup>90</sup> Le taux de glucose est toutefois légèrement supérieur ce qui peut s'expliquer soit par des différences de conditions de culture soit par une légère contamination due à la présence d'amidon. Par ailleurs, comme en témoigne la comparaison de leur composition, les polysaccharides extracellulaires de *Porphyridium cruentum* et *Rhodella reticulata* diffèrent très largement. Parmi les différences remarquables, notons que le polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata* contient 12,5 % molaire de rhamnose alors que le polysaccharide de *Porphyridium cruentum* en est dépourvu. Au regard de sa teneur en acide uronique, il est aussi plus riche en acide glucuronique (14,5 % molaire) contre 6,4 % pour le polysaccharide de *Porphyridium cruentum*.

Tableau 17: Composition des polysaccharides extracellulaires sécrétés par *Rhodella reticulata* et *Porphyridium cruentum*.

Polysaccharide extracellulaire	Dosages colorimétriques (% massique)		Dosage turbidimétrique (% massique)
	O.N	A.U	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>Rhodella reticulata</b>	78	22	0,8
<b>Porphyridium cruentum</b>	92	8	5,0

O.N : Oses Neutres ; A.U : Acides Uroniques.

Enfin, le dosage des sulfates par turbidimétrie complète la composition du polymère (Tableau 17). Le polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata* est très faiblement sulfaté (<1 %). Cette dernière donnée est conforme avec celle mentionnée par Geresh et al. (2002)<sup>164</sup> qui signalent un taux de sulfatation voisin de 1 %.

## 2. Obtention d'oligosaccharides et analyse structurale

Les polysaccharides extracellulaires sécrétés par *Rhodella reticulata* et *Porphyridium cruentum* présentent des compositions osidiques et des taux de sulfatation largement distincts. Néanmoins, l'étude structurale comparée de ces deux polymères se justifie pleinement puisqu'ils présentent une unité disaccharidique commune, l'acide aldobiuronique<sup>147</sup> (Figure 37).

### 2.1. Autohydrolyse

Le polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata* a été soumis à autohydrolyse selon le protocole précédemment décrit. Un suivi de la réaction en fonction du temps a alors été réalisé (Figure 67).

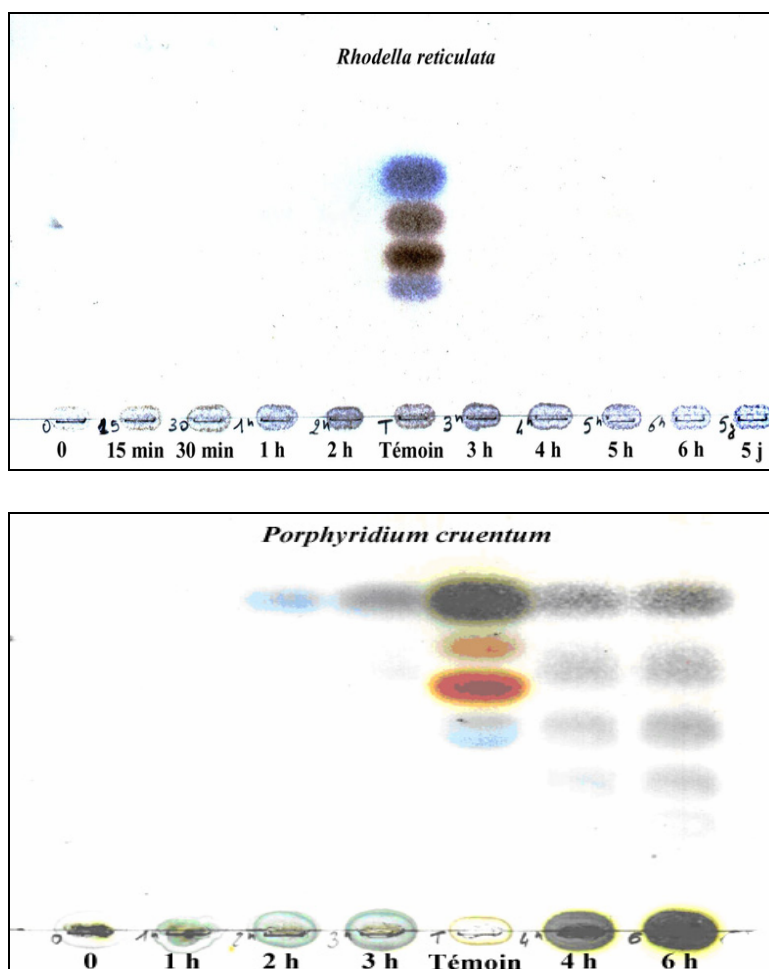


Figure 67: Suivi en fonction du temps de l'autohydrolyse des polysaccharides extracellulaires de *Rhodella reticulata* (en haut) et *Porphyridium cruentum* (en bas). Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique.

Après 5 jours à 100°C, le polysaccharide de *Rhodella reticulata* n'est pas affecté par l'autohydrolyse comme en témoigne l'absence d'unité oligo- ou monosaccharidique sur la CCM présentée Figure 67. L'acidité du milieu réactionnel (pH=4,5), et par conséquent l'acidité intrinsèque du polymère, n'est pas suffisante pour conduire à son hydrolyse. Rappelons que dans des conditions opératoires identiques, le pH du milieu réactionnel du polysaccharide de *Porphyridium cruentum* protoné et solvaté est égal à 1,5 ce qui est suffisant pour hydrolyser le polymère et conduire à sa dépolymérisation.

En conclusion, nos résultats semblent démontrer que la présence de substitutions minérales, les sulfates en l'occurrence, favorise le mécanisme de l'autohydrolyse. Le caractère acide faible des unités carboxyliques associé à la stabilité de la liaison uronosidyle<sup>116</sup> ne constitue apparemment pas une condition suffisante à l'hydrolyse et ce, malgré une teneur élevée en acide glucuronique (22 % massique dans le cas de *Rhodella reticulata*).

## 2.2. Dégradation au Lithium

Nettement plus riche en acide glucuronique que le polysaccharide de *Porphyridium cruentum*, le polysaccharide sécrété par *Rhodella reticulata* devrait en théorie être lui aussi affecté par la dégradation au lithium. C'est ce que confirme la CCM présentée en Figure 68 qui illustre le profil de séparation chromatographique sur Biogel P2 des oligo- et monosaccharides libérés au cours de la dégradation.

D'apparence plus complexe que celui que nous avons recueilli dans les mêmes conditions opératoires à partir du polysaccharide de *Porphyridium cruentum*, le profil de séparation chromatographique de la dégradation au lithium du polysaccharide de *Rhodella reticulata* nous renseigne sur le nombre élevé de produits de dégradation qui peuvent être obtenus. Une telle observation, si elle est associée au mode d'action du lithium dans l'éthylène diamine suggère :

- La multisubstitution de l'acide uronique engagé dans la structure de l'acide aldobiuronique de la chaîne principale (Figure 64) et/ou
- L'existence de plusieurs motifs oligosaccharidiques engageant des acides uroniques en positions variables.

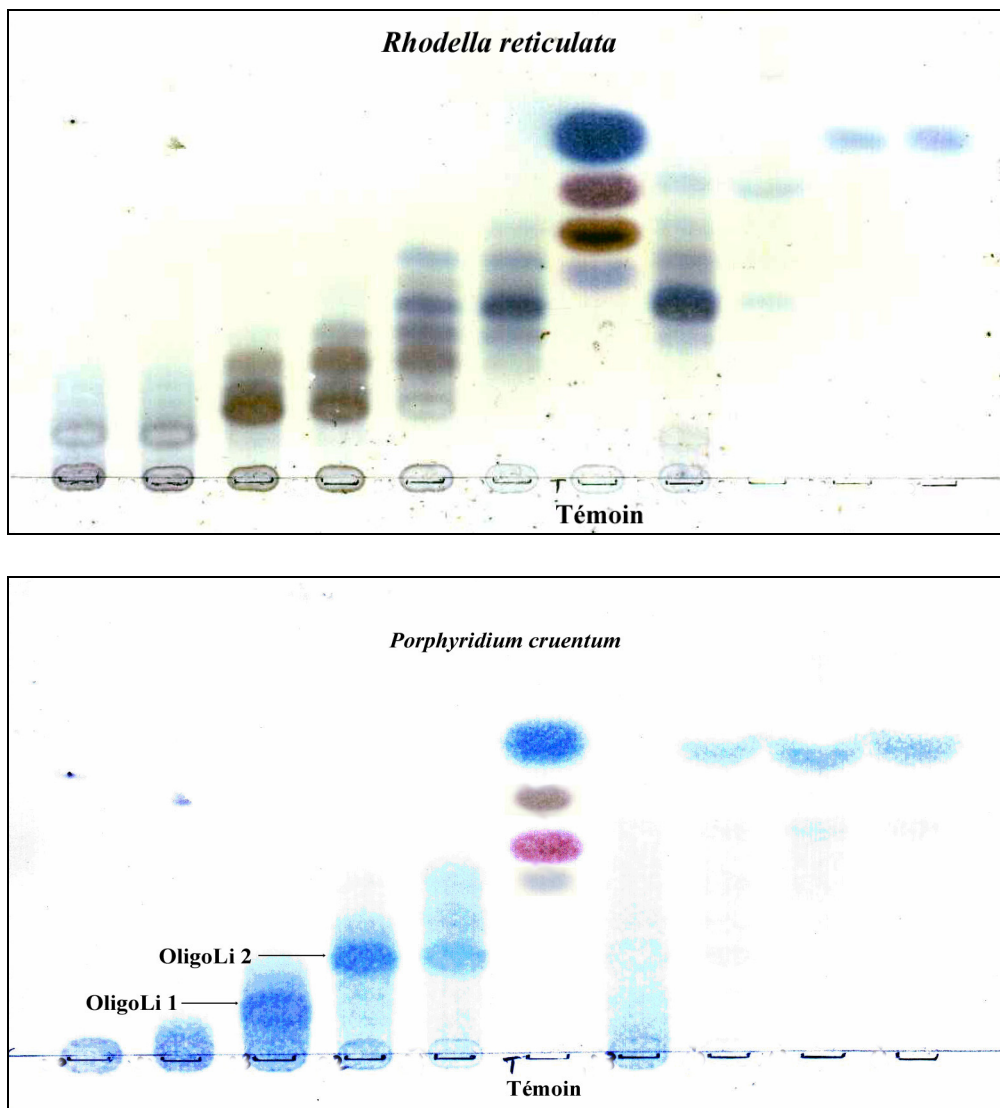


Figure 68: Profils d'exclusion stérique sur colonne Biogel P-2 des dégradations au lithium dans l'éthylène diamine des polysaccharides de *Rhodella reticulata* (en haut) et *Porphyridium cruentum* (en bas).

Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; Éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ;  
révélation : orcinol sulfurique.

Les principales fractions oligosaccharidiques ont, par la suite, été partiellement purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (Biogel P2 et P4, Figure 69) puis caractérisées par CPG après méthanolyse et silylation. Leurs compositions molaires sont présentées dans le Tableau 18.

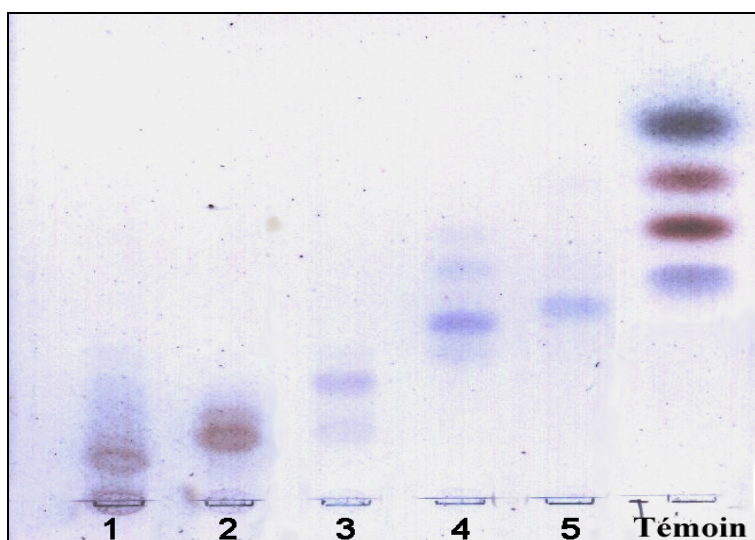


Figure 69: Fractions oligosaccharidiques séparées sur colonne d'exclusion stérique. Témoin : Xyl, Glc, Sacc, GlcA (de haut en bas) ; éluant : BuOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O, 2 /1/ 1 ; révélation : orcinol sulfurique.

Tableau 18: Composition molaire des différentes fractions oligosaccharidiques isolées après dégradation au lithium dans l'éthylène diamine du polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata*.

Fractions	Composition molaire (%)			
	Rha	Xyl	Gal	Glc
1	23,6	57,5	12,1	6,8
2	39,8	48,7	11,4	-
3	40,2	50,0	9,8	-
4	11,0	75,7	13,3	-
5	9,1	75,7	15,3	-

L'analyse des compositions monosaccharidiques des fractions oligosaccharidiques recueillies après dégradation au lithium révèle la présence majoritaire de Rha (de 9 à 40 % molaire) et de Xyl (de 49 à 75 % molaire). Le Gal est moins représenté (de 9 à 15 % molaire) et le Glc n'est identifié que dans la fraction 1, sans doute en réponse à une contamination.

Compte tenu de sa composition globale, et au regard des compositions relevées pour les différents oligosaccharides qui entrent dans sa structure, le polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata* doit être classé dans la famille des xyloglucuronorhamnoglycanes non sulfaté. Une telle observation doit être rapprochée des travaux publiés par Lahaye<sup>165-167</sup> sur l'Ulvane, polysaccharide de la paroi cellulaire de l'algue verte *Ulva rigida*. L'analyse RMN

des oligosaccharides obtenus après dégradation enzymatique de ce polymère par une endo-ulvane-lyase conduit en effet à la caractérisation des structures suivantes :

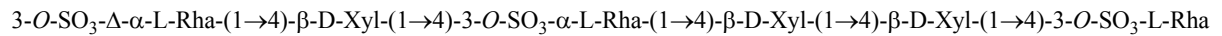
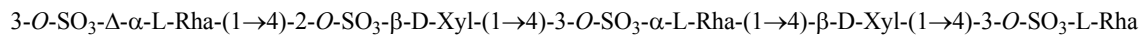
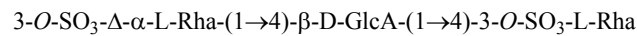


Figure 70: Structure d'oligosaccharides obtenus après hydrolyse enzymatique d'Ulvane.

Outre des similitudes de composition entre le polysaccharide de *Rhodella reticulata* et d'*Ulva*, le Xyl constitutif de l'Ulvane apparaît lié en  $\beta$ -1,4 et peut être sulfaté ou non ; nous renvoyant, par la même occasion, à la structure théorique proposée pour le polysaccharide de *Porphyridium cruentum* (Figure 64).

Trop préliminaire pour permettre l'énoncé de conclusions définitives, nos travaux dans le domaine de l'analyse structurale du polysaccharide de *Rhodella reticulata* doivent être complétés. Les fractions **1** à **5** seront, après purifications supplémentaires, analysées par spectroscopie RMN ce qui devrait conduire à l'élucidation des motifs oligosaccharidiques constitutifs du polysaccharide extracellulaire de *Rhodella reticulata*. Sur la base des informations déjà disponibles, il est néanmoins possible de constater que les similitudes entre les polysaccharides de *Rhodella reticulata* (algue rouge) et *Ulva rigida* (algue verte) sont plus fortes que celles qui rapprocheraient *Rhodella reticulata* de *Porphyridium cruentum*, ces deux espèces figurant pourtant dans la famille des Porphyridiaceae. Ces différences semblent être confirmées par une étude récente de taxonomie menée sur les algues rouges. En effet, des données moléculaires associées à l'étude morphologique de l'appareil de Golgi conduisent selon Saunders et Hommersand (2004) <sup>168</sup> à la subdivision des Porphyridiaceae en trois sous ordre dans lesquels *Rhodella reticulata* et *Porphyridium cruentum* sont disjoints. Cette dernière remarque souligne l'intérêt même de la chimiotaxonomie en tant qu'outil supplémentaire permettant l'amélioration de la définition des relations phylogénétiques entre les espèces.



## VI. Conclusion

L'objectif de cette partie portait sur la caractérisation structurale de polysaccharides extracellulaires sécrétés par des microalgues rouges. Les différentes séquences analytiques employées lors de cette étude d'investigation structurale nous ont permis d'établir et de caractériser par RNM homo et hétéronucléaire la structure de plusieurs unités oligosaccharidiques représentatives du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum*. Nous avons proposés un modèle théorique pour le motif de répétition de ce polymère sur la base des spécificités propres à chacune des méthodes de dégradation employées (Figure 71).

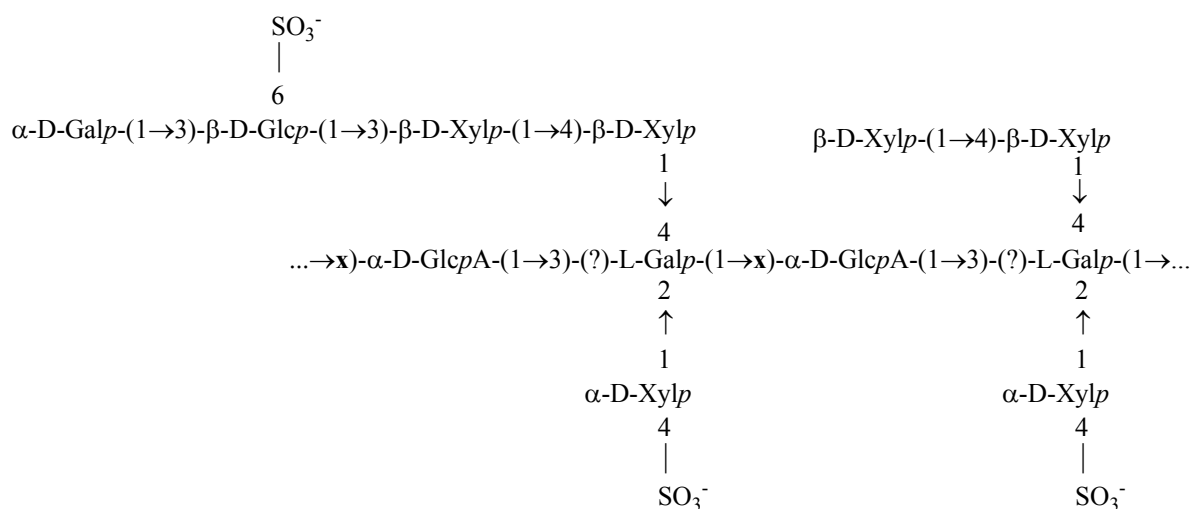


Figure 71: Motif de répétition hypothétique proposé pour le polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum*.

En dépit de la grande labilité de ce polysaccharide en milieu acide, nous avons montré que la conjugaison de méthodes de dégradations spécifiques et non spécifiques adaptées aux caractéristiques du polymère pouvait conduire à son séquençage. Les résultats acquis confirment notamment l'intérêt de l'autohydrolyse dans l'étude des polysaccharides acides polyanioniques. Cette méthode qui utilise l'acidité intrinsèque d'un polymère est remarquable d'efficacité dans le cas de l'étude du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum*. Nous avons démontré par HPLC l'avantage d'un tel procédé face à l'hydrolyse acide qui pourtant conduit au même profil chromatographique. Les avantages sont ici liés à la

vitesse de dépolymérisation beaucoup plus lente qu'une hydrolyse acide standard ce qui permet d'assurer une certaine maîtrise et un suivi de la dépolymérisation du polymère. Les travaux réalisés confirment également la grande efficacité et la spécificité de la dégradation au lithium ainsi que les potentialités de la dégradation alcaline en milieu réducteur parmi les outils performants destinés à l'analyse structurale des polysaccharides anioniques. La combinaison de ces deux méthodes conduit à l'obtention de motifs oligosaccharidiques de DP élevés représentatifs de l'architecture du polymère.

La présence de plusieurs motifs oligosaccharidiques, acides ou neutres, au sein du polysaccharide étudié, milite en faveur d'une voie de biosynthèse complexe impliquant la mise en œuvre coordonnée d'activités enzymatiques originales. La détermination structurale de tels polymères produits par des végétaux inférieurs constitue, outre un fondement élémentaire indispensable à leur valorisation, un élément prospectif d'intérêt dans l'étude de l'évolution des algues. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Rhodella reticulata*. Malgré l'existence d'un acide aldobiuronique commun (3-O-( $\alpha$ -D-GlcpA)-L-Galp), les polysaccharides extracellulaires sécrétés par *Rhodella reticulata* et *Porphyridium cruentum*, deux microalgues rouges appartenant à la famille des Porphyridiaceae, semblent présenter des différences structurales significatives. Des études plus approfondies des fractions oligosaccharidiques du polymère de *Rhodella reticulata* par RMN homo et hétéronucléaire sont en cours et devraient apporter des indices structuraux majeurs contribuant à définir le séquençage de polysaccharides extracellulaires comme un critère valable de chimiotaxonomie.

# Chapitre III

**Une nouvelle voie de valorisation pour les  
phycocolloïdes : l'élaboration de matériaux  
plastiques**



# Chapitre III : Une nouvelle voie de valorisation pour les phycocolloïdes : l'élaboration de matériaux plastiques

---

En nous appuyant sur les travaux effectués au laboratoire sur la cellulose ou les hémicelluloses <sup>7, 169</sup>, nous proposons la synthèse d'une nouvelle gamme de plastiques avec comme substrat de départ les polysaccharides d'algues rouges. Dans l'objectif d'applications industrielles, nous avons déployé des outils statistiques permettant l'optimisation de la réaction de transformation des phycopolsaccharides en matériaux plastiques.

## **I. Données bibliographiques**

Depuis les cinquante dernières années, l'utilisation des matières plastiques est devenue incontournable. Leur utilisation massive induit des déchets abondants à l'origine d'un problème écologique planétaire. Le contexte économique est également préoccupant. La demande croissante sur le marché mondial de matériaux pétrochimiques, estimée à 270 millions de tonnes en 2000, s'accompagne d'une diminution inexorable des ressources pétrolières.<sup>170</sup> L'augmentation du coût du pétrole est à craindre comme le souligne un article du Monde daté du 17 février 2004 qui met en exergue sa raréfaction et son coût qui pourrait avoisiner les 100 \$ le baril d'ici 15 ans. Ces coûts exorbitants se répercuteront sur le prix des produits pétrochimiques comme le polyéthylène (P.E), le polypropylène (P.P) et le polystyrène (P.S).

Le contexte écologique et économique actuel met l'accent sur la nécessité de substituer les matériaux plastiques d'origine pétrochimique par des matériaux plastiques si possible biodégradables issus d'une biomasse renouvelable. La production mondiale des polymères biodégradables n'a cessé de croître depuis les années 1990, passant de l'échelle pilote à l'échelle industrielle. Cette croissance reste malgré tout très en deçà du marché des matières plastiques pétrochimiques. La capacité de production est cependant passée de 500 tonnes en

1990 à 254 000 tonnes en 2002 (soit 0,17 % du marché) répartie entre les polymères dégradables d'origine pétrochimique (33 000 tonnes) et ceux issus de ressources renouvelables (221 000 tonnes soit 87 % des polymères biodégradables).<sup>171</sup> Actuellement le marché est dominé par de grosses firmes : les américains Cargill, Dupont, Procter & Gamble, l'italien Novamont et l'allemand BASF.

## 1. Une approche biotechnologique dans la synthèse de matériaux plastiques

### 1.1. Les polymères de synthèse

Ils sont obtenus par des procédés industriels de synthèse à partir de monomères naturels. Le plus connu est le PLA ou acide polylactique mis au point en 1977 conjointement par les sociétés Cargill et Dow Chemical (USA). Le PLA est synthétisé à partir de l'acide lactique, produit de la fermentation des sucres tels que le saccharose extrait de la betterave, de la canne à sucre ou du maïs. La synthèse de l'acide L-poly lactique est réalisée par polycondensation directe de l'acide lactique (Figure 72).

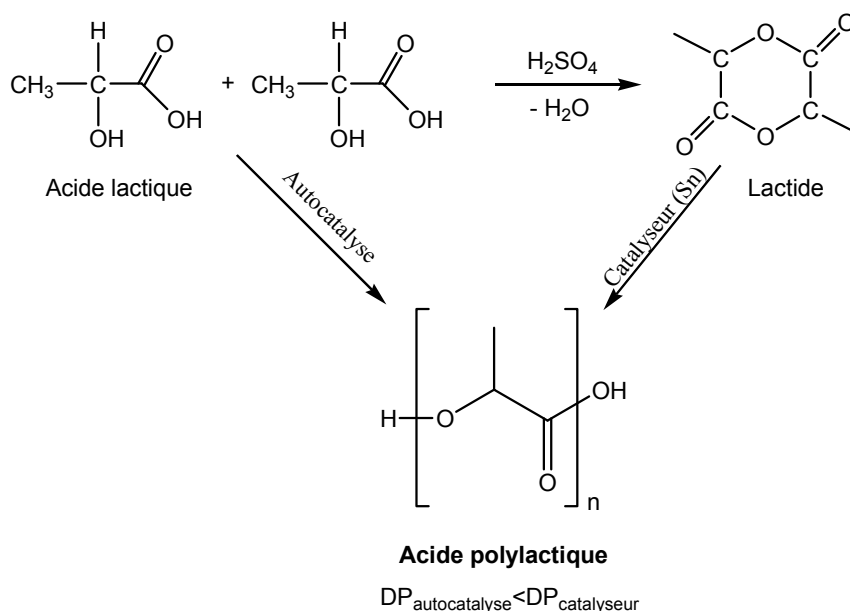


Figure 72: Principe de la polycondensation chimique de l'acide lactique.

Le PLA constitue aujourd'hui une alternative industrielle valable face aux plastiques traditionnels. Il présente outre une très bonne aptitude à la biodégradation, une résistance mécanique et une plasticité semblables au polystyrène et au téréphtalate de polyéthylène couramment utilisés dans la fabrication des bouteilles d'eau minérales. En fonction des propriétés fonctionnelles du matériau souhaité (transparence, qualité de moulage, mise en forme, résistance, etc.) il est indispensable d'associer le PLA à d'autres polymères. Ainsi, l'association PLA-caprolactone réduit les forces à la rupture à 20 MPa et améliore l'allongement et la flexibilité des films de 1 000 %.<sup>172</sup>

## 1.2. Des biopolymères d'origine bactérienne

En raison des coûts élevés des matériaux précédemment cités, des recherches se sont orientées plus récemment vers la synthèse directe de plastique. Il s'agit de la fabrication *in situ* de polymères qui s'accumulent dans le cytoplasme\* de certaines bactéries placées en condition de fermentation. Les matières premières sont principalement l'amidon. Parmi ces polymères, les plus connus sont le PHB (polyhydroxybutyrate), le PHV (polyhydroxyvalérate) et le PHBV (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)) appartenant à la famille des polyhydroxyalcanoates (PHAs) (Figure 73). La synthèse de polymères est également envisagée par modification génétique des plantes. Toutefois cette méthode semble peu réalisable pour une production de masse et se heurte à une opinion publique défavorable.

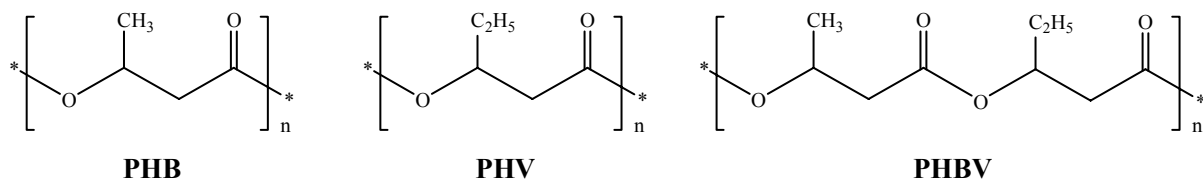


Figure 73: Structure des polyhydroxyalcanoates (PHAs). PHB= polyhydroxybutyrate ; PH= polyhydroxyvalérate ; PHBV= poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate).

## 2. Modifications chimiques de la cellulose

La modification chimique de la cellulose constitue une autre voie stratégique dans l'obtention de matériaux plastiques. Les polymères de synthèse en nitrocellulose sont apparus dès le milieu du 19<sup>ème</sup> siècle. Ces dérivés cellulosiques, en raison de leur grande instabilité thermique, ont rapidement été remplacés par des dérivés cellulosiques plus stables tels que les esters de cellulose.

### 2.1. Les esters de cellulose

Les propriétés thermoplastiques des acétates de cellulose ont été exploitées, avec succès, à partir des années 1930 dans la fabrication par injection ou extrusion de nombreux objets et biens de consommation. Les esters de cellulose comme les acétates de cellulose (CA), les esters mixtes acétates propionates (CPA) et les acétates butyrates (CAB) de cellulose (Figure 74) synthétisés à partir de cellulose microcristalline hautement purifiée présentent des caractéristiques communes liées à la rigidité des fibres cellulosiques. L'inélasticité et la dureté de ces matériaux plastiques s'expliquent par l'enchevêtrement réduit des fibres estérifiées. Ce comportement macroscopique limite l'utilisation des acétates de cellulose qui ont tendance à glisser sous la contrainte. Les acétates de celluloses vont malgré tout trouver de nombreuses applications dans des domaines où allongement et élasticité sont des handicaps. L'industrie des rubans adhésifs, des bandes magnétiques ou pellicules photographiques, pour ne citer qu'elles, semblent particulièrement adaptées. Les acétates de cellulose seront aussi avantageusement utilisés dans des applications où imperméabilité et résistance à la vapeur et/ou aux graisses et solvants sont de rigueur.

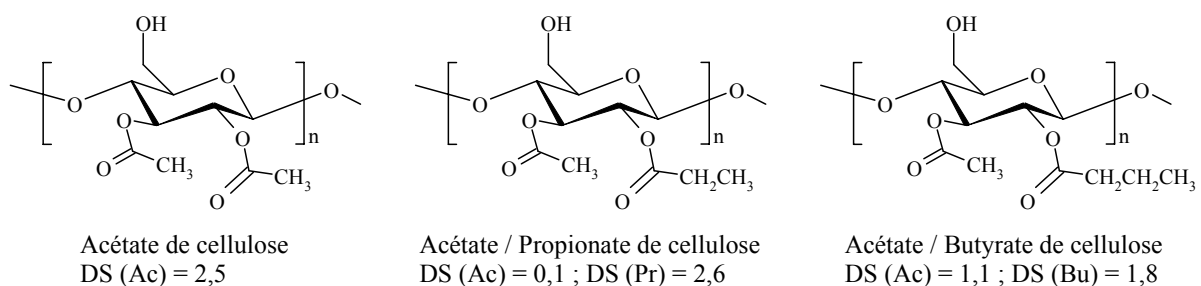


Figure 74: Structure de plastiques à base d'esters de cellulose.



Face au développement rapide des polymères pétrochimiques bon marché, les plastiques cellulosiques sont rapidement devenus obsolètes. Leurs propriétés thermomécaniques imposent notamment de trop nombreuses contraintes. En effet, le faible écart entre la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) et la température de décomposition est la conséquence de la labilité à haute température du squelette cellulosique. 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 modeler. C'est la raison pour laquelle un plastifiant est souvent ajouté afin d'abaisser la température de transition vitreuse et donc d'élargir le domaine d'application 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 se révéler gênant pour certaines applications. Ces molécules de petite taille ont tendance à s'évaporer au cours du temps ce qui, à terme, modifie les performances du matériau.

## **2.2. Les esters de cellulose à longues chaînes**

Une autre solution permettant d'abaisser la  $T_g$  des esters de cellulose consiste à y greffer de longues chaînes aliphatiques de manière à augmenter le volume libre et donc de diminuer les interactions entre polymères.<sup>173</sup> Sur une série d'esters de cellulose allant de l'acétate au palmitate (C16), Malm et *al.* (1951)<sup>174</sup> ont montré que la  $T_g$  diminue rapidement avec la longueur de la chaîne jusqu'à un point d'inflexion correspondant à des chaînes en C8. Pour des chaînes plus longues, la  $T_g$  décroît lentement. La présence de substituants latéraux volumineux et flexibles diminue la  $T_g$  en écartant les chaînes polysaccharidiques.<sup>6</sup> Ainsi, sans ajout de plastifiant, il est possible d'obtenir des plastiques hydrophobes plus souples, plus déformables, moins cassants. Cette perspective laisse entrevoir de nouveaux domaines d'applications. Malheureusement la réaction d'estérification de la cellulose avec des anhydrides, acides carboxyliques ou chlorures d'acide dont la chaîne est supérieure à C5 pose certains problèmes de réactivité.

Depuis 25 ans, l'intérêt des esters de cellulose comme thermoplastiques est réel ainsi qu'en atteste un très grand nombre de références bibliographiques et brevets organisés autour de trois thèmes principaux :

- Les esters de celluloses comme plastiques biodégradables,
- La combinaison d'esters de cellulose avec d'autres polymères dans la formulation de nouveaux matériaux plastiques,
- La synthèse, la caractérisation et l'utilisation d'esters cellulosiques à longues chaînes.

La découverte par McCormick et *al.* en 1981 <sup>175</sup> de la solubilité de la cellulose dans le système de solvant composé de *N,N*-diméthylacétamide (DMA) et de chlorure de lithium (LiCl) a largement contribué à l'avancée des travaux dans la synthèse d'esters de cellulose à longues chaînes. Dans ce système de solvant, la solvataion de la cellulose est assurée par le LiCl qui complexe les groupements hydroxyles en rompant les liaisons hydrogènes (Figure 75). Cette méthode permet l'estérification homogène de la cellulose dont le degré de substitution (DS) est variable. Malgré tout, l'obtention d'esters à longues chaînes est délicate pour des raisons stériques et par la difficulté de combiner des réactifs de polarités aussi divers que la cellulose, le DMA/LiCl très polaires et les anhydrides ou acides gras peu polaires. Notons également que les paramètres opératoires entraînent souvent une compétition entre estérification et dégradation du polysaccharide.

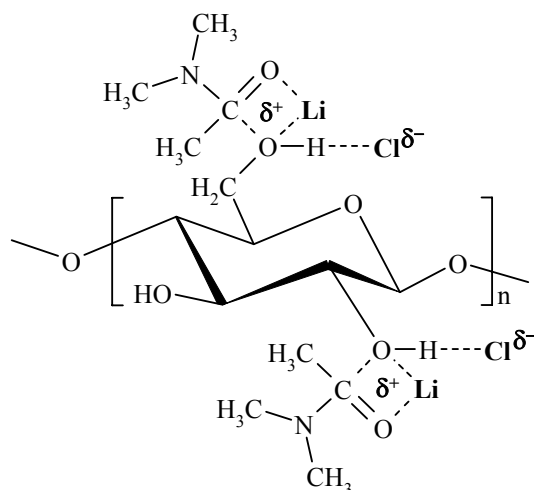


Figure 75: Principe de solvation de la cellulose dans le système de solvant DMA/LiCl, d'après Tosh et al., 2000.<sup>176</sup>

Les voies de synthèses potentielles conduisant à l'estérification de la cellulose par des chaînes grasses sont nombreuses (Figure 76). L'estérification directe de la cellulose par des acides carboxyliques, présentant une très faible réactivité vis-à-vis des groupements hydroxyles, est très difficile. Cependant, il est possible de transformer *in situ* l'acide carboxylique en une entité plus réactive. Citons en ce sens la méthode de Sealey et al. (1996).<sup>177</sup> En milieu basique (pyridine), la cellulose réagit sur un anhydride mixte formé *in situ* par condensation d'un acide carboxylique sur du chlorure de tosyle (TsCl). Cette approche permet la synthèse d'esters de cellulose à longue chaîne (C12 à C20) de DS compris entre 2,8 et 2,9. D'autres travaux illustrés par Samaranayake et al. (1993)<sup>178</sup> utilisent du DCC (*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide) comme agent de condensation. L'anhydride mixte ainsi formé réagit avec la 4-pyrrolidinopyridine afin de former une espèce très réactive. Cette méthode induit de minimes dégradations au niveau des chaînes celluloses et donne lieu à l'obtention d'une gamme d'esters de longueurs (C6 à C20) et de DS variables. Une autre voie de synthèse proposée par Morooka et al. (1983)<sup>179</sup> consiste à former des anhydrides mixtes à partir d'acides carboxyliques et d'anhydride trifluoroacétique.

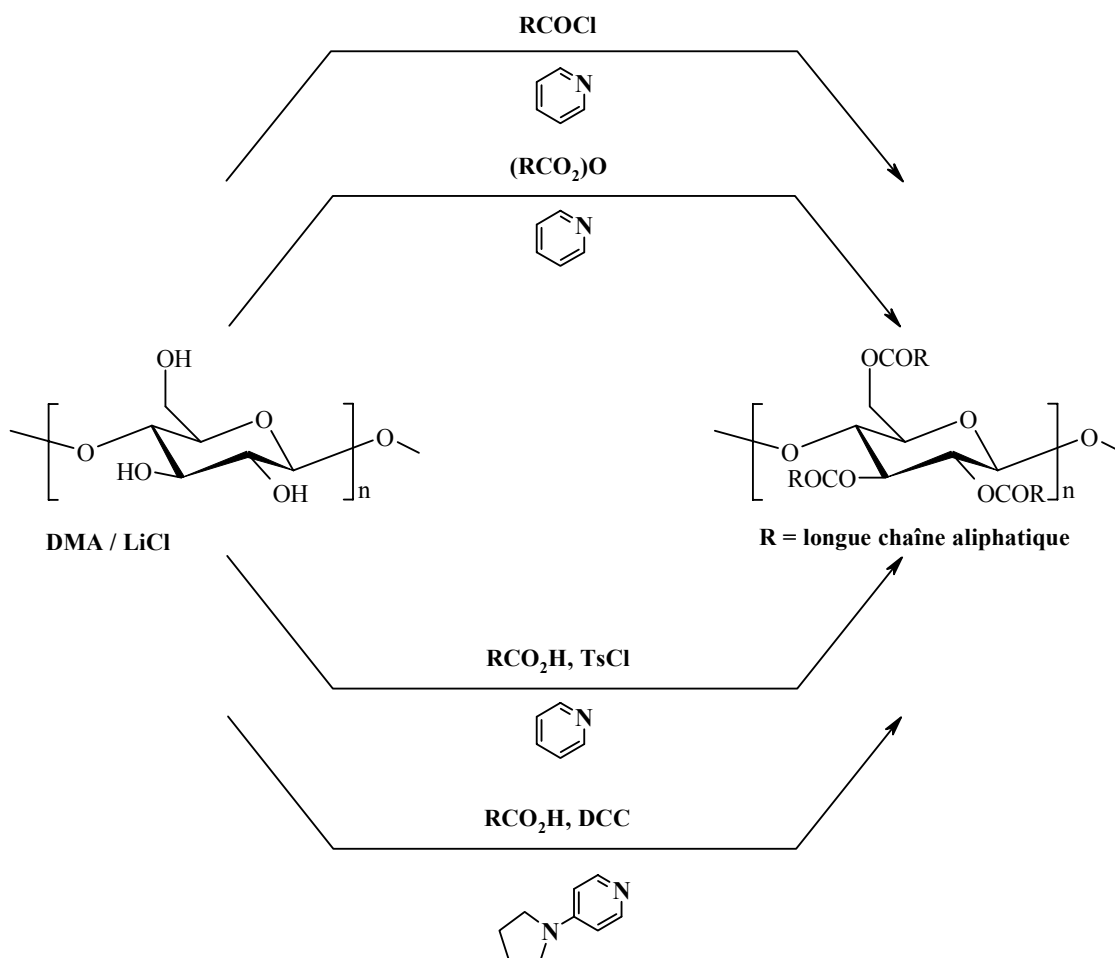


Figure 76: Synthèse en phase homogène d'esters de cellulose à longues chaînes, d'après Edgar et al., 2001.<sup>6</sup>

Des travaux, principalement réalisés au sein de notre laboratoire, ont montré l'efficacité des chlorures d'acides comme agents d'acylation en présence de bases telles que la pyridine<sup>180-182</sup>, la triéthylamine<sup>183</sup> ou la 4-diméthylaminopyridine.<sup>169</sup> Leur rôle est de neutraliser l'acide chlorhydrique libéré au cours de la réaction.

D'autres méthodes proposent de réaliser l'acylation de la cellulose en phase hétérogène par un chlorure d'acide sans addition de base. Dans ce cas, l'acide chlorhydrique formé est co-évacué sous un courant d'azote anhydre<sup>184</sup> ou sous vide.<sup>185</sup> Ces méthodes offrent des résultats relativement limités eu égard aux rendements et aux DS obtenus. Si la dégradation du polymère est ainsi réduite, elle ne peut être évitée. De plus, des études cinétiques ont montré l'impossibilité d'atteindre des valeurs maximales de DS. En revanche, la synthèse sur support solide minéral d'esters de cellulose par du chlorure d'acide laurique en présence de DMAP permet l'obtention de films plastiques de DS élevé. Par contre, les rendements sont

très faibles (<30 %).<sup>182</sup> Une autre alternative a été développée par Vaca-Gacia *et al.* (1997).<sup>186</sup> Des esters mixtes de cellulose ont été formés par acylation de la cellulose par de l'anhydride acétique et des acides gras en présence d'acide sulfurique. Cette réaction en phase hétérogène nécessite toutefois des conditions expérimentales drastiques qui s'accompagnent d'une dépolymérisation importante des polymères dont la substitution par des chaînes grasses est faible.

L'ensemble de ces travaux, initiés à partir d'un substrat modèle, la cellulose, permet d'envisager de nouvelles voies de valorisation pour les polysaccharides et notamment les phycocolloïdes. L'objectif de cette étude est de proposer de nouveaux matériaux plastiques issus de l'estérification de phycocolloïdes d'algues rouges dont l'agar pour lequel nous avons entrepris la construction d'un plan d'expérience et ainsi réalisé la modélisation mathématique de la réaction d'estérification.

## **II. Résultats et discussion**

Les polysaccharides des phases matricielles ou fibrillaires des macro et microalgues rouges ont des propriétés physicochimiques natives qui semblent très intéressantes eu égard aux polysaccharides des végétaux supérieurs, celluloses<sup>169</sup> et hémicelluloses<sup>7</sup> déjà valorisés au laboratoire. Ces constatations ont justifié notre démarche d'acyler des phycocolloïdes en phase homogène par du chlorure d'acide laurique afin d'obtenir des films plastiques hydrophobes potentiellement biodégradables.

### **1. L'agar, un modèle d'étude**

Une étude initiale sur la modification chimique des phycocolloïdes a été menée sur l'agar, galactane neutre de structure stable et répétitive : l'agarose. Le choix de ce polysaccharide se justifie également vis à vis de ses propriétés physicochimiques. Il offre en effet un comportement mécanique très intéressant par rapport à la cellulose dont la force de gel et l'élasticité en phase aqueuse sont dépendantes de son degré de substitution.<sup>57, 58</sup>

Afin de pouvoir modéliser la réaction d'acylation et d'appréhender l'importance relative des différents paramètres réactionnels, nous avons choisi d'utiliser un agar commercial, commercialisé par Difco sous la référence Bacto Agar. Ce dernier présente toutes les caractéristiques chimiques attendues (Tableau 19) :

- Un taux de sulfatation déterminé par turbidimétrie inférieur à 3 %,
- Un rapport Gal/3,6-AGal égal à 1, déterminé par CPG après l'acétalisation et une double hydrolyse réductive du polymère<sup>187</sup>, caractéristique du modèle agarose (Figure 77).

*Tableau 19: Composition de l'agar Difco.*

	<b>Gal</b> (%molaire)	<b>3,6-AGal</b> (% molaire)	<b>Sulfates</b> (% massique)
<b>Bacto Agar, Difco</b>	50,5	49,5	3,0

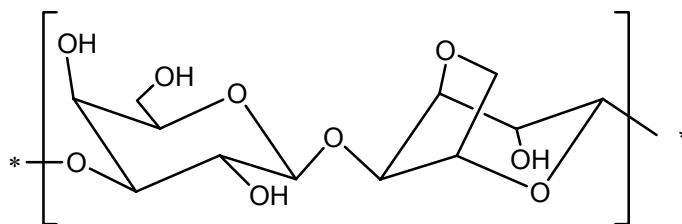


Figure 77: Structure du modèle agarose.

Cet agar sera utilisé comme modèle dans toutes les réactions qui vont suivre.

## 2. Essais préliminaires

La stratégie générale adoptée pour la synthèse de films plastiques hydrophobes nécessite la dissolution préalable des polysaccharides afin de réaliser l'acylation en phase homogène par du chlorure d'acide laurique. Les esters ainsi formés sont purifiés et les films plastiques sont obtenus par casting, c'est-à-dire après une lente évaporation du solvant à température et pression ambiante.

Après avoir rappelé brièvement la méthodologie retenue, la nature des paramètres réactionnels et leur domaine de variation, les résultats seront présentés et discutés dans leur ensemble (§ 2.5).

### 2.1. Dissolution

Dans un premier temps, nous avons adopté le protocole de McCormick *et al.* (1981)<sup>175</sup> et la méthode utilisée dans notre laboratoire.<sup>169</sup> Les polysaccharides ont été dissous à chaud (80°C) dans une solution de DMA/LiCl à 7 % et placés sous agitation pendant 24 h. En raison de la difficulté de recyclage des sels de lithium, coûteux et nocifs, une phase d'optimisation de la dissolution des polysaccharides a été menée. Nous nous sommes inspirés d'une méthode décrite récemment par Fang *et al.* (2002)<sup>188</sup> pour la dissolution de l'amidon de pomme de terre. Les polysaccharides hydrosolubles sont préalablement dissous dans de l'eau chaude entre 80 et 90°C. L'eau est ensuite échangée progressivement par le DMA par évaporation sous pression réduite. La solution finale, présumée anhydre, est utilisée sans ajout de LiCl.

Les résultats obtenus ne montrent pas une différence très importante entre les deux modes de dissolution de l'agar (Tableau 20). Les esters synthétisés présentent des DS maximum pour des rendements massiques voisins supérieurs à 155 %. Contrairement à la cellulose et aux hétéroxylanes, la solvataion de l'agar est très bonne dans le DMA et ne nécessite pas l'ajout de LiCl.

Tableau 20: Influence de la dissolution sur l'obtention de films plastiques.

Méthode de dissolution de l'agar	Conditions opératoires			Résultats	
	RCOCl (éq/OH)	T (°C)	Temps (min)	DS	Rendement massique
DMA/LiCl 7% (V/M)	1,5	100	360	4,0	155 %
Échange de solvants (DMA seul)	1,5	100	360	4,0	157 %

## 2.2. Acylation

La fonctionnalisation des polysaccharides est réalisée en phase homogène par du chlorure d'acide laurique en présence ou non de DMAP selon le schéma réactionnel suivant (Figure 78).

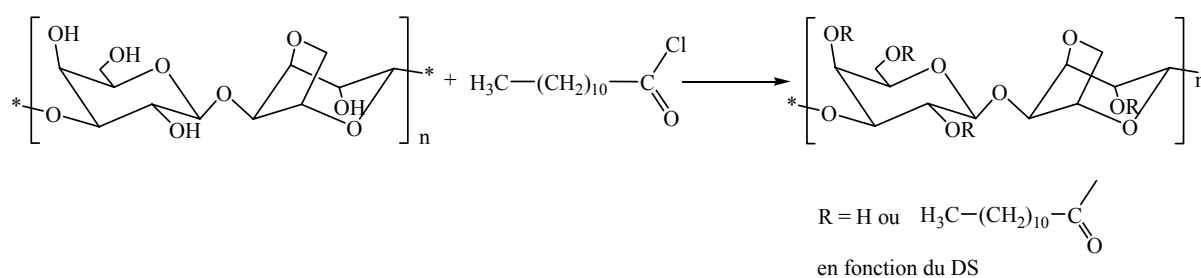


Figure 78: Estérification d'une unité osidique par du chlorure d'acide laurique.

Le DMAP est utilisé comme promoteur lors de la réaction d'acylation où il forme un complexe acétylpyridinium avec le chlorure d'acide laurique.<sup>189</sup> Cette espèce, beaucoup plus réactive que le chlorure d'acide seul, favorise la formation de l'ester (Figure 79). Le DMAP est également utilisé afin de neutraliser l'acide chlorhydrique formé *in situ* pendant la réaction.



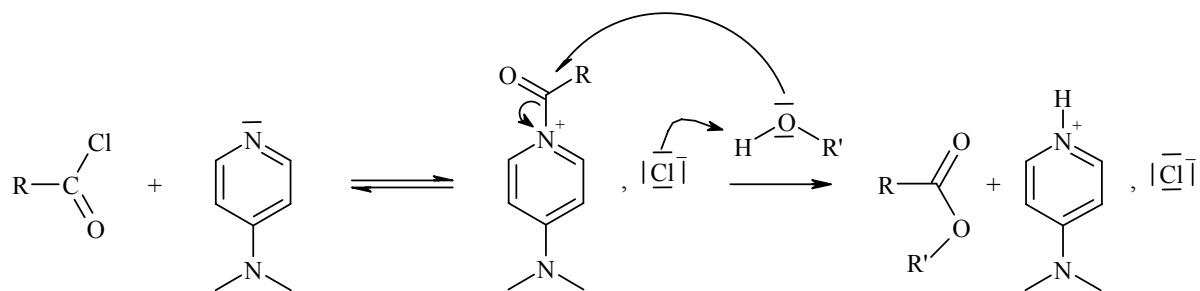


Figure 79: Rôle du DMAP dans le déroulement de la réaction d'acylation.  $R=C_{11}H_{23}$ ;  $R'$ =unité osidique.

L'influence des paramètres de la réaction sur le DS et le rendement massique a été appréhendée au travers de la quantité de chlorure d'acide laurique introduit (entre 0,5 et 5 éq/OH) et de la présence ou non de DMAP (0 ou 1 éq/OH) pour des températures comprises entre 70 et 140°C et des temps de réaction variables. Afin de normaliser la réaction, l'acylation a été réalisée en phase homogène sur 1 g de polysaccharide dissous dans 40 mL de DMA.

### 2.3. Purification et casting

A l'issue de la réaction, les esters sont purifiés par la méthode des précipitations et dissolutions successives.<sup>169, 182</sup> La première étape consiste à récupérer l'ester formé après sa précipitation dans un mélange eau-éthanol. Cette étape permet d'éliminer, entre autres, les sels de pyridinium. L'ester est ensuite dissous dans du chloroforme puis purifié par précipitation dans de l'éthanol. Les films plastiques sont finalement obtenus par casting après solubilisation de l'ester dans le chloroforme (Photo 4).

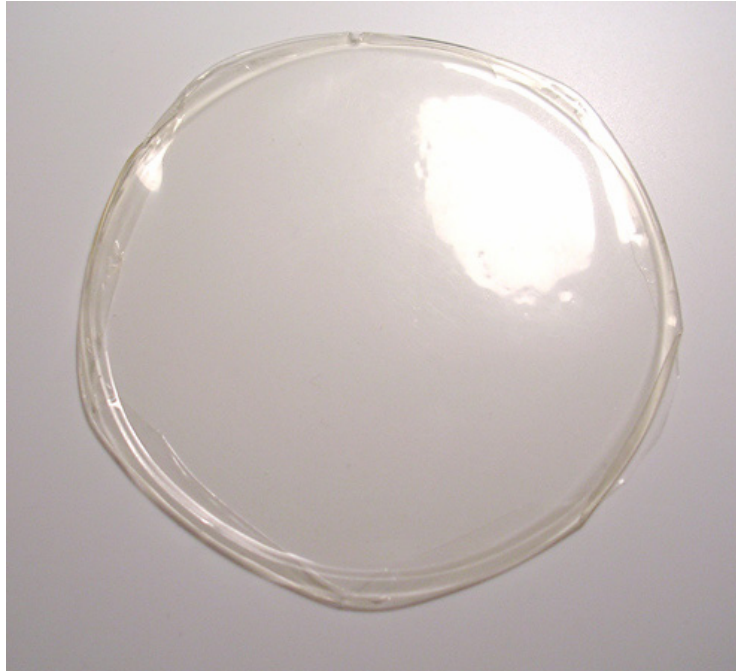


Photo 4: Exemple d'un film d'ester d'agar.

## 2.4. Caractérisation des esters synthétisés

### 2.4.a. Rendement massique

La mesure de la masse finale du matériau obtenu permet également de définir, en rapport avec le DS, l'efficacité de la réaction. Le rendement massique est exprimé comme étant le rapport entre la masse du film plastique obtenu par la masse initiale de polysaccharide. Dans notre cas, le rendement massique peut aisément être comparé au rendement massique théorique maximal (agar totalement substitué) obtenu à partir de la formule suivante, permettant alors d'apprécier objectivement la qualité de la réaction.

$$m_{\text{maximale théorique}} = \frac{m_{\text{initiale de polysaccharide à estérifier}}}{M_{\text{agarose}}} \times (M_{\text{agarose}} + DS_{\text{max}} (M_{\text{RCOCl}} - M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}}))$$

$$m_{\text{maximale théorique}} = \frac{1}{306} \times (306 + 4 \times (218,5 - 35,5 - 1)) = 3,38 \text{ g}$$

soit un rendement  $R_{\text{maximal théorique}} = 338 \%$

Où  $M_{\text{agarose}}$  désigne la masse molaire du dimère agarose,  $DS_{\text{max}}$  le DS du dimère agarose totalement substitué, et  $M_{\text{RCOCl}}$  la masse molaire du chlorure d'acide laurique.

### 2.4.b. Analyse IR

Tous les films plastiques ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge dans une gamme comprise entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Cette méthode permet de confirmer l'acylation des polymères par l'apparition de bandes caractéristiques (Figure 80). En fonction du DS, on observe une diminution, voire une disparition, de la bande à 3540  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique des vibrations de valence des groupements hydroxyles. La diminution de l'intensité de cette bande est corrélée avec l'apparition d'une bande d'absorption vers 1740  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique des fonctions esters. L'extinction de la bande à 3540  $\text{cm}^{-1}$  s'accompagne également d'une augmentation de l'intensité des bandes alkyles vers 2900  $\text{cm}^{-1}$  spécifiques des chaînes grasses. La présence des bandes à 1073 et 931  $\text{cm}^{-1}$  <sup>132</sup> sur le spectre de l'agar natif et estérifié prouve que la réaction d'acylation préserve le pont 3,6-anhydro malgré sa grande labilité en milieu acide.

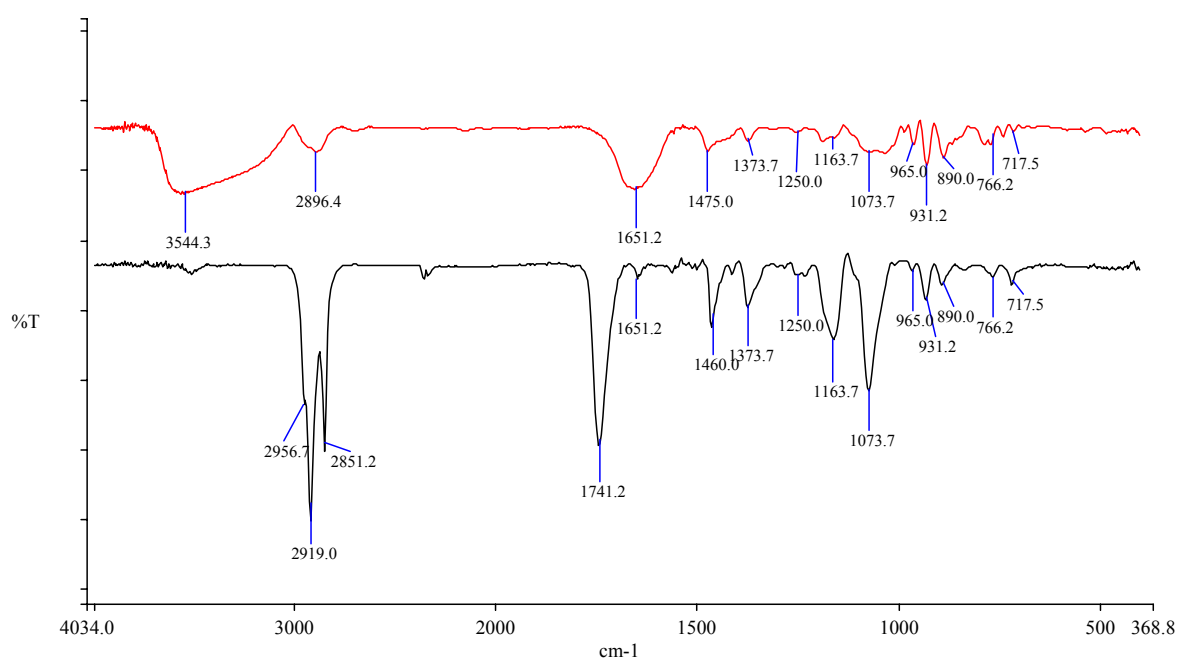


Figure 80: Spectre IR de l'agar natif (en haut) et d'un agar estérifié de  $DS=3,2$  pour un  $DS_{max}=4$  (en bas).

### 2.4.c. Degré de substitution

L'appréciation de l'efficacité de la réaction d'acylation est exprimée notamment par le degré de substitution (DS) qui définit le nombre moyen de chaînes alkyles greffées par unité de répétition du polymère. Le spectre RMN des esters permet de distinguer deux zones distinctes, entre 3 et 5 ppm pour les protons osidiques et 0,5 et 2,5 ppm pour les chaînes aliphatiques (Figure 81). Le rapport de ces intégrations donne le DS (Annexe II).

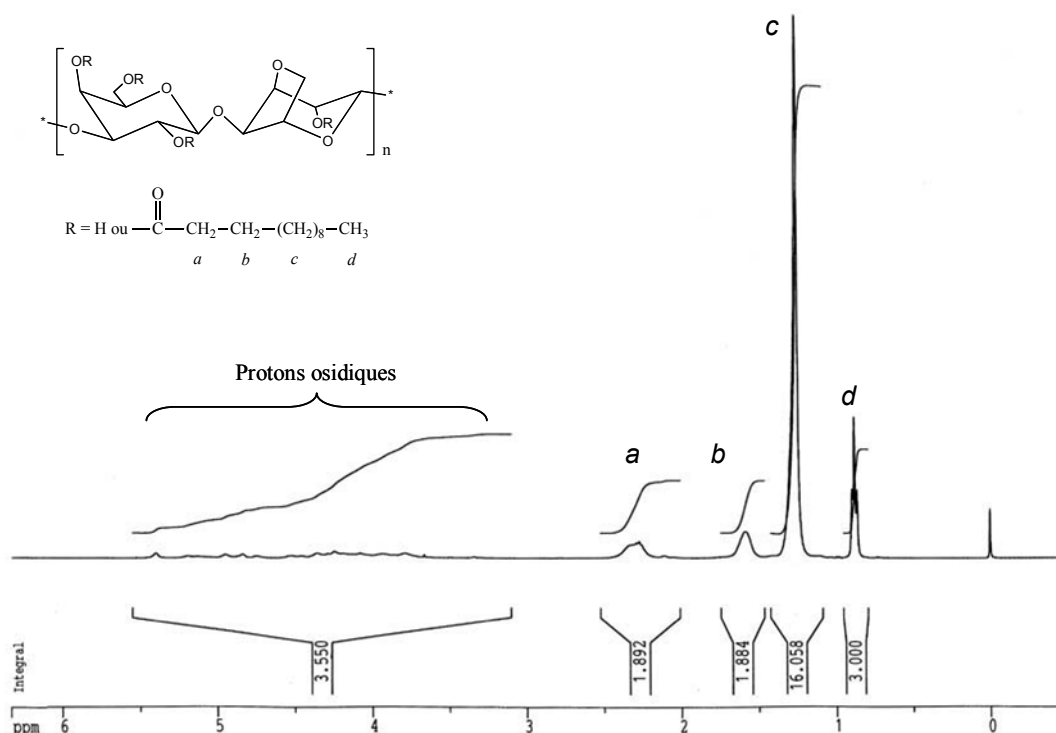


Figure 81: Spectre RMN-<sup>1</sup>H à 400 MHz d'un agar estérifié de DS=3,93.

## 2.5. Essais préalables d'estérification

A partir d'une solution unique d'agar Difco à 1 g/ 40 mL dans le DMA, nous avons souhaité optimiser la réaction d'acylation en isolant les grandeurs définissant le mieux cette réaction. Notre démarche a consisté à faire varier les différents paramètres un à un afin d'identifier les grandeurs les plus influentes sur le DS et le rendement massique. Compte tenu de l'expérience du LCSN dans le domaine de l'acylation des phytopolysaccharides <sup>7, 169, 182</sup>, le domaine expérimental a été défini comme suit :

- La température varie de 70 à 140°C,
- Le temps de réaction est compris entre 2 minutes et 2 heures,
- La quantité de chlorure d'acide laurique est fixée entre 0,5 et 5 éq/OH,
- La quantité de DMAP est égale à 0 ou 1 éq/OH selon les essais.

### 2.5.a. Influence de la température

L'influence de la température sur le DS et le rendement massique a été appréhendée en faisant réagir 2 équivalents de chlorure d'acide laurique et 1 équivalent de DMAP par fonction hydroxyle pendant 15 minutes. Les réponses, mesurées pour des températures comprises entre 70 et 140°C, ont été reportées Figure 82.

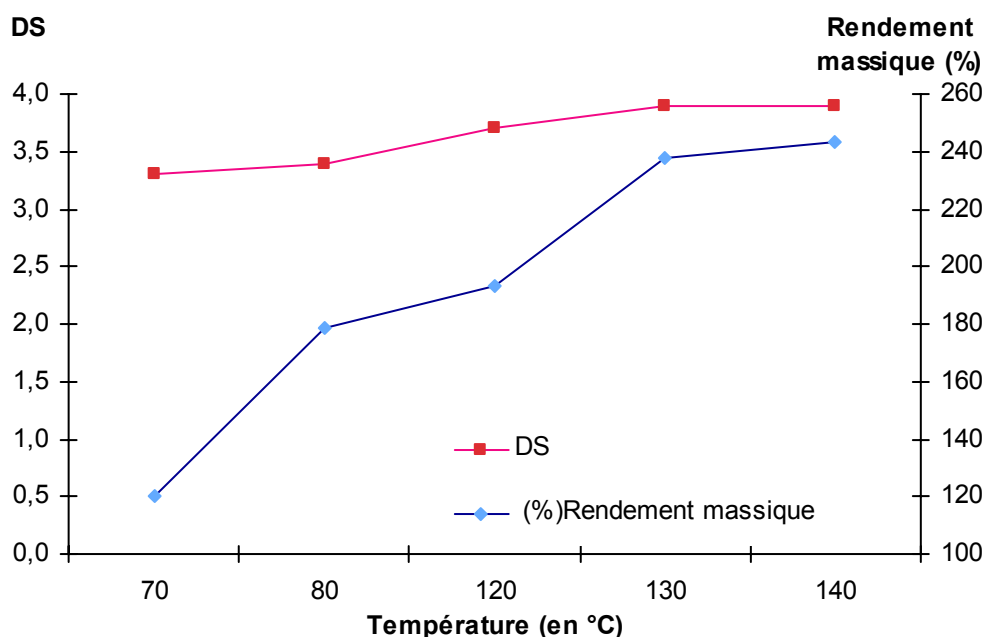


Figure 82: Influence de la température sur le rendement massique et le DS.

Le graphique ci-dessus permet de visualiser l'avancement de la réaction d'acylation en fonction de la température. DS et rendement massique augmentent simultanément en fonction de la température mais avec des vitesses différentes. Les valeurs de DS sont élevées et déjà égales à 3,5 dès 70°C. Elles augmentent légèrement pour atteindre 3,6 à partir de 130°C. Le rendement massique semble beaucoup plus dépendant de l'activation thermique puisqu'il double entre 70 et 140°C. Soulignons que l'ester formé n'est pas obtenu avec un rendement quantitatif de 338 % (rendement maximal) ce qui suggère un temps de réaction trop court.

### 2.5.b. Influence du temps de la réaction

L'influence du temps de réaction a été étudiée à 130°C en présence de deux équivalents de chlorure d'acide laurique et d'un équivalent de DMAP par fonction hydroxyle pour des temps compris entre 2 minutes et 2 heures. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 83).

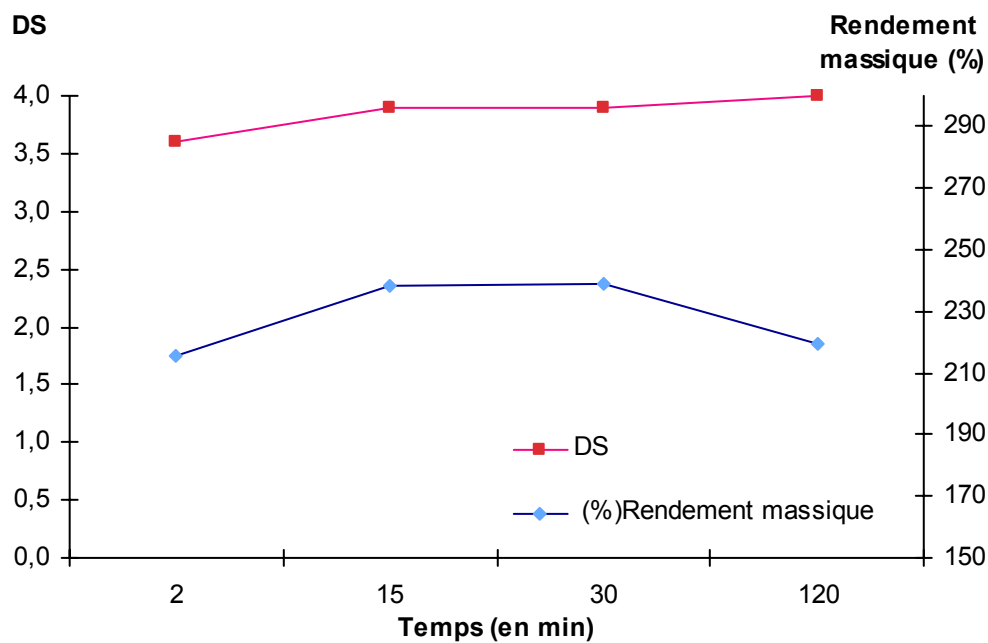


Figure 83: Influence du temps de réaction sur le DS et le rendement massique.

Si le DS présente dès 2 minutes de réaction une valeur maximale, le rendement massique de la réaction est quant à lui dépendant du temps et augmente progressivement de 2 à 30 minutes de réaction. Un tel comportement ne peut être expliqué qu'en séparant l'approche qualitative de l'approche quantitative. Pour des temps courts, la réaction d'acylation ne concerne qu'une faible part de l'agar en solution conduisant alors à des films plastiques de bon DS mais obtenus avec des rendements médiocres. L'allongement de la durée de la réaction, tout en préservant la valeur du DS, permettra en touchant un plus grand nombre de polymères natifs d'augmenter la valeur du rendement massique. Toutefois, au-delà de 30 minutes, si le DS est toujours maximal, le rendement décroît fortement. Cette évolution suggère une dépolymérisation du polymère en solution à haute température et pour des temps de réaction longs comme le démontrent les travaux de Vaca-Garcia (1997)<sup>186</sup> sur les esters de cellulose.

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

Le rôle de la quantité de chlorure d'acide laurique introduit a été mis en évidence avec et sans DMAP sur une réaction type dont les conditions de température et de durée ont été fixées respectivement à 130°C et 15 minutes (Figure 84).

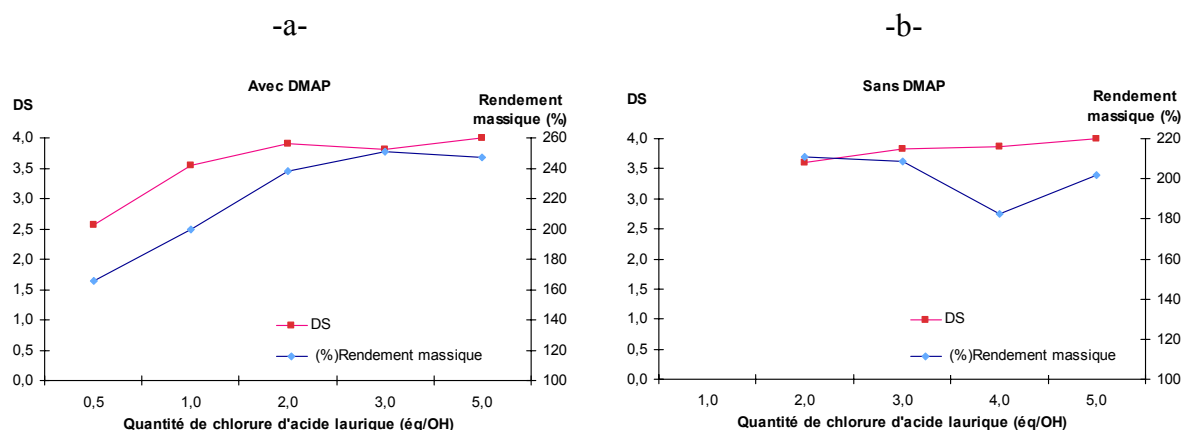


Figure 84: Influence de la quantité de chlorure d'acide laurique, avec et sans DMAP sur le DS et le rendement.

Les essais réalisés en présence de DMAP montrent l'influence du nombre de mole de chlorure d'acide sur les grandeurs mesurées. Dans ce cas et contrairement aux deux études précédentes, l'amplitude de la variation du DS est importante et semble corrélée avec l'augmentation du rendement massique. Le DS optimal est atteint à partir de 2 équivalents de chlorure d'acide tandis que le rendement massique paraît atteindre un palier entre 3 et 5 équivalents.

Des films plastiques peuvent être également synthétisés en l'absence de DMAP. Leur aspect visuel est similaire à ceux obtenus sans DMAP mais semblent plus cassants. Les DS sont quasiment optimaux mais les rendements de réaction sont beaucoup plus faibles et n'augmentent pas avec la quantité de chlorure d'acide introduit. Ces données suggèrent un phénomène de dépolymérisation lié à la libération *in situ* d'acide chlorhydrique qui n'est plus neutralisé par le DMAP. Enfin, une telle expérience démontre le rôle activant du DMAP. En son absence, 2 équivalents de chlorure d'acide laurique sont en effet nécessaires afin d'obtenir un matériau plastique ; il n'en faut que 0,5 lorsqu'il est présent.



#### ***2.5.d. Conclusion préliminaire***

Ces essais préliminaires ont montré la faisabilité de la valorisation chimique d'un phyco colloïde, l'agar. Les plastiques synthétisés présentent un taux de substitution quasiment maximal ne semblant pas dépendre des différents paramètres gouvernant la réaction. Seule une quantité de chlorure d'acide inférieure à la stoechiométrie permet l'obtention d'un ester d'agar de DS inférieur à 3. En revanche, l'évolution du rendement est dépendante d'un plus grand nombre de paramètres. Il reste néanmoins difficile d'appréhender quels sont les facteurs qui régissent réellement cette réaction. Si la température apparaît comme un paramètre incontournable, nous ne pouvons pas anticiper son impact pour un temps de réaction plus long avec des quantités variables de chlorure d'acide laurique en présence ou non de DMAP. C'est l'influence des paramètres physico-chimiques dans leur ensemble qui doit donc être évaluée. Mais le nombre d'informations à traiter (nombre d'essais) et le nombre de variables (température, durée de la réaction, quantité d'acide laurique et de DMAP) rendent impossible la visualisation des différents essais sous la forme d'un nuage de point. L'étude consistant à faire intervenir la notion de similitude dans la comparaison 2 à 2 des essais n'est donc pas satisfaisante.

### 3. Analyse statistique

Afin de visualiser de la façon la plus optimale possible l'ensemble des résultats obtenus, nous avons eu recours à l'analyse statistique permettant, après corrélation, la comparaison des variables entre elles.

#### 3.1. Analyse en composantes principales (A.C.P)

##### 3.1.a. Description de la méthode

L'A.C.P est une méthode statistique descriptive puissante qui permet de représenter graphiquement les tendances d'un tableau de données de dimension importante. Elle permet d'extraire d'un échantillonnage complexe de données les tendances principales en appréciant simultanément et de façon globale l'incidence de toutes les variables sous la forme d'un nuage de points. L'A.C.P est une méthode de traitement de données permettant de réduire les dimensions d'un tableau via sa projection dans un sous-espace.

##### 3.1.b. Centrage et réduction des données brutes

Un tableau de données peut être représenté sous la forme d'une matrice de N lignes à p colonnes :

$$U = \begin{bmatrix} u_{11} & \cdots & u_{1j} & \cdots & u_{1p} \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ u_{i1} & \cdots & u_{ij} & \cdots & u_{ip} \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ u_{N1} & \cdots & u_{Nj} & \cdots & u_{Np} \end{bmatrix}$$

où i représente les coordonnées d'un individu défini par ses p facteurs ou variables (quantité d'acide laurique et de DMAP, durée de la réaction, température, DS, rendement massique dans notre cas) ; et N le nombre total d'essais réalisés, ici N=30.

Les individus forment donc un espace géométrique dans lequel les variables sont représentées par des vecteurs  $\vec{U}_j$  :

$$\vec{U}_j = (u_{i1} \quad \cdots \quad u_{ij} \quad \cdots \quad u_{ip})$$

Tableau 21: Tableau de données des différents essais.

N° d'essai	Quantité de RCOCl (éq)	Quantité de DMAP (éq)	Température (°C)	Temps (en min)	DS	Rdt massique
1	1,42	1	100	690	4,00	184,0 %
2	1,42	1	100	360	4,00	155,0 %
3	1,42	1	100	360	4,00	103,0 %
4	1,42	0	100	360	3,21	24,0 %
5	1,42	0	100	360	4,00	150,0 %
6	1,42	0	100	180	3,95	200,0 %
7	1,42	0	100	90	3,25	125,0 %
8	2,13	0	100	180	3,80	151,0 %
9	2,84	0	100	360	4,00	282,0 %
10	2,84	0	100	30	3,47	280,0 %
11	2,00	1	70	15	3,30	120,0 %
12	2,00	1	80	15	3,43	178,3 %
13	2,00	1	90	15	4,00	276,0 %
14	2,00	1	120	15	3,73	193,5 %
15	2,00	1	140	15	3,93	243,5 %
16	2,00	1	130	2	3,64	215,4 %
17	2,00	1	130	15	3,87	238,0 %
18	2,00	1	130	30	3,89	239,0 %
19	2,00	1	130	120	4,00	219,4 %
20	2,00	1	100	1	4,00	159,0 %
21	3,00	0	130	15	3,82	208,4 %
22	4,00	0	130	15	3,87	182,6 %
23	5,00	0	130	15	3,94	202,0 %
24	1,00	1	130	15	3,54	200,0 %
25	3,00	1	130	15	3,81	251,0 %
26	4,00	1	130	15	3,82	229,0 %
27	0,50	1	130	15	2,56	166,0 %
28	5,00	1	130	15	4,00	247,0 %
29	2,00	0	120	15	3,60	211,0 %
30	2,00	0	120	2	3,37	247,4 %

La première étape de l'A.C.P consiste à la réduction et au centrage de toutes les données brutes. En effet, le tableau initial de données (Tableau 21) contenant des informations d'unités différentes doit être rendu adimensionnel. Pour cela, il faut soustraire à chaque valeur du tableau la moyenne de la colonne correspondante. Le résultat obtenu est ensuite divisé par

l'écart type de la colonne. Les individus sont alors représentés par une nouvelle variable nommée  $\tilde{X}_j$  dont les coordonnées sont exprimées ci-dessous :

$$\tilde{X}_j = (x_{i1} \quad \cdots \quad x_{ij} \quad \cdots \quad x_{ip})$$

### 3.1.c. Matrice des corrélations

A partir de la matrice des données centrées réduites, nous sommes en mesure de calculer le coefficient de corrélation  $r(U_j, U_{j'})$  entre les deux variables  $U_j$  et  $U_{j'}$  (Tableau 22). Le coefficient de corrélation, dont l'expression est donnée en annexe III, traduit la liaison entre deux variables. Il peut prendre toutes les valeurs entre -1 et 1 ce qui signifie l'existence d'une relation linéaire exacte, respectivement décroissante et croissante, entre les variables  $U_j$  et  $U_{j'}$ . Il est généralement admis que le coefficient de corrélation entre deux variables est significatif lorsqu'il vérifie la relation suivante <sup>190</sup> :

$$|r(U_j, U_{j'})| \geq \frac{2}{\sqrt{N}}, \text{ avec } N \text{ le nombre d'essais réalisés}$$

$$\text{Soit } |r(U_j, U_{j'})| \geq \frac{2}{\sqrt{30}} = 0,36$$

Tableau 22: Matrice des corrélations.

	Quantité de RCOCI	Quantité de DMAP	Température (°C)	Temps (en min)	DS	Rdt massique
Quantité de RCOCI	1,00	-0,17	0,33	-0,32	<b>0,37</b>	<b>0,40</b>
Quantité de DMAP	-0,17	1,00	0,11	-0,11	0,09	0,11
Température (°C)	0,33	0,11	1,00	<b>-0,40</b>	0,09	<b>0,41</b>
Temps (en min)	-0,32	-0,11	<b>-0,40</b>	1,00	0,26	<b>-0,38</b>
DS	<b>0,37</b>	0,09	0,09	0,26	1,00	0,33
Rdt massique	<b>0,40</b>	0,11	<b>0,41</b>	<b>-0,38</b>	0,33	1,00

D'une lecture rapide du tableau des corrélations, il ressort que les différentes variables ne sont que très faiblement corrélées entre elles. En effet, d'après Morineau et *al.* (1998) <sup>190</sup>, il faudrait que la valeur des coefficients de corrélation soit supérieure à 0,36 pour être réellement significative. Les résultats obtenus permettent cependant de dégager certaines

évolutions. En effet, il semble que la quantité de DMAP n'ait que peu d'influence sur l'obtention avec un rendement élevé d'esters d'agar hautement substitués ( $r = 0,11$ ). De même, le coefficient de corrélation entre le DS et le rendement massique, égal à 0,33, est faible. Intuitivement, on aurait pu prédire une plus forte corrélation puisque'une substitution élevée devrait logiquement s'accompagner d'un fort gain de poids. Cette constatation n'étant pas vérifiée, elle confirme l'éventualité d'un phénomène de dépolymérisation au cours de l'acylation. Cette évolution est de plus confirmée par une corrélation négative entre le rendement massique et le temps de réaction. En d'autres termes, cela signifie qu'un temps de réaction important s'oppose à une augmentation du rendement massique.

### ***3.1.d. Projection des variables et des individus***

Les individus (Tableau 21) formant un nuage de points dans un espace de dimension  $p$ , ici égal à 6, il est nécessaire d'effectuer leur projection dans un espace de dimension réduite afin de pouvoir visualiser leur distribution. Comme nous l'avons déjà mentionné, le principe de l'A.C.P consiste à restituer sous forme d'un nuage de points d'une part, les distances entre les individus et, d'autre part les corrélations entre variables. Aussi, il faut calculer à partir de la matrice des corrélations les valeurs propres et les vecteurs propres associés (Tableau 37 et Tableau 38, Annexe III). Les valeurs propres trouvées sont représentatives de la quantité d'information repercutée sur un axe. De nouvelles variables  $C_j$  sont ensuite obtenues par combinaison linéaire des variables centrées réduites  $X_j$  (Tableau 39). Les composantes principales  $C_j$  n'étant pas corrélées entre elles, il est alors possible de les projeter sous la forme d'un nuage de points représentatifs des individus dans un repère porté par les axes définis par les vecteurs propres (Figure 86).

Il est également possible de projeter les variables sur les axes précédemment définis. Pour cela, chaque variable est associée à un vecteur dont l'origine coïncide avec l'origine du repère et dont l'extrémité est donnée par ses corrélations avec les composantes principales définissant le repère (Figure 85).

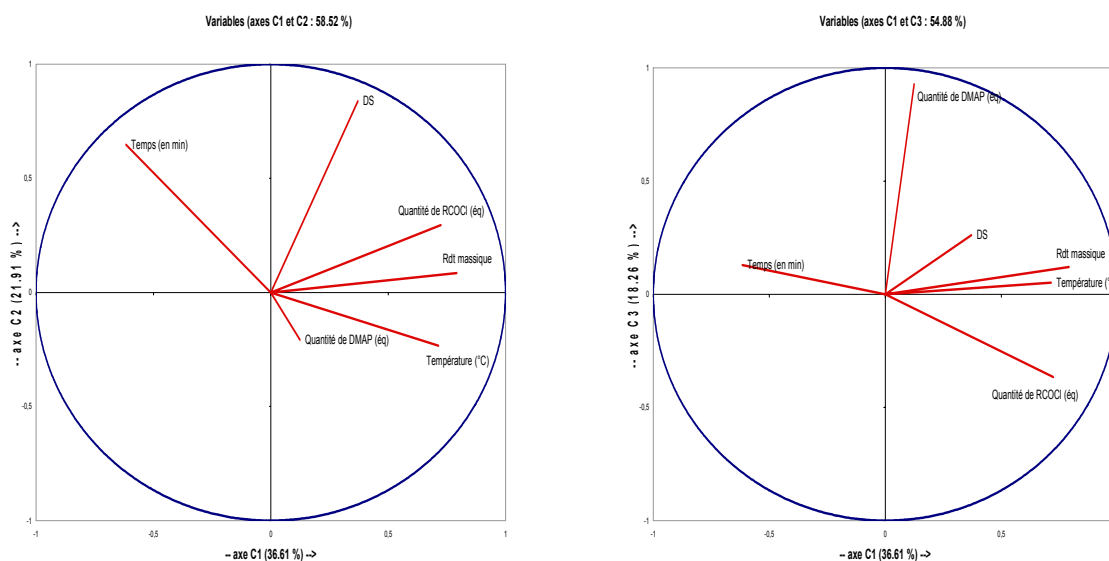


Figure 85: Projection des variables dans les plans factoriels (1,2) et (1,3) représentatifs de plus de 75 % de l'information initiale.

Ces deux représentations graphiques présentent respectivement la projection des variables dans les plans factoriels (1, 2) et (1, 3). Nous n'avons pas choisi de représenter les autres plans factoriels qui sont trop peu représentatifs de l'information contenue dans le tableau initial de données. En effet, les axes 1, 2 et 3 répercutent en cumulé déjà plus de 75 % de l'information.

Ces graphiques permettent de corrélérer les variables avec les composantes principales et la visualisation des effets des variables précédemment décrits. En effet, la première composante principale (C1) est fortement corrélée avec le rendement massique qui évolue dans une moindre mesure avec l'augmentation de la température et de la quantité de chlorure d'acide laurique introduit. On remarquera toutefois que les variables sont relativement mal projetées puisque la norme des vecteurs associés est en deçà du cercle des corrélations matérialisant une norme égale à 1. Ainsi, il est délicat de conclure sur l'influence des paramètres qui gouvernent la réaction d'acylation.

Les nuages de points des individus dans les plans factoriels (1, 2) et (1, 3) (Figure 86) ne permettent pas d'apprécier de façon claire les effets des variables sur les grandeurs mesurées. Peu d'individus se distinguent véritablement des autres.

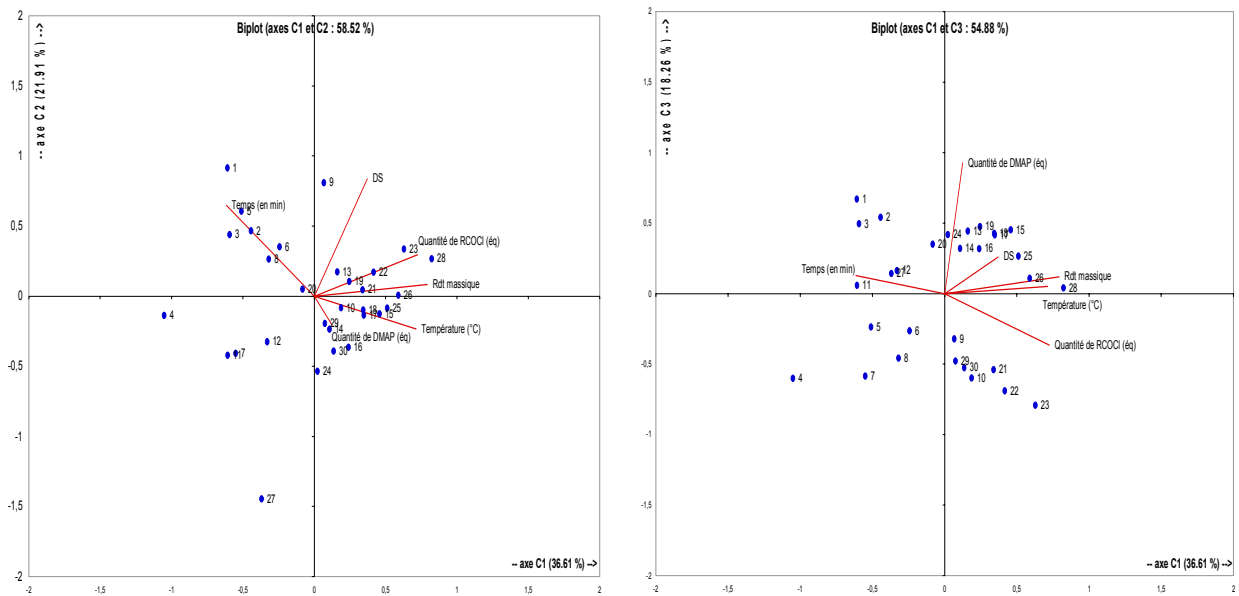


Figure 86: Projection des individus et des variables dans les plans factoriels (1, 2) et (1,3).

En effet, tous les individus sont globalement distribués dans une zone proche de l'origine des axes, ce qui signifie que les différents essais réalisés ne présentent pas d'écart importants laissant apparaître des familles distinctes de polymères.

### 3.1.e. Résultats et limites

L'A.C.P nous a permis de visualiser graphiquement les informations contenues dans un tableau de résultats de dimensions importantes. En raison d'une mauvaise distribution des individus dans l'espace de projection, il n'est pas possible d'établir de relations liant le DS et le rendement massique aux différents paramètres de la réaction. La stratégie consistant à ne faire varier qu'un seul facteur à la fois apparaît donc comme inadaptée à la résolution de problèmes de modélisation. Il s'agit néanmoins d'une étape indispensable pour cerner le domaine expérimental.

Le choix de la mise en place d'un plan d'expérience, permettant de rationaliser le choix des essais, apparaît comme une étape obligée afin d'établir un modèle prédictif mettant en équation le DS ou le rendement massique en fonction des différentes variables.

## **3.2. Construction d'un plan d'expérience en carré gréco-latin**

### ***3.2.a. Principe***

Les plans d'expériences sont des dispositifs permettant l'étude des conséquences d'un changement de modalité pour les facteurs sur une réponse et les interactions éventuelles entre les différents effets des facteurs agissant sur un processus. Il s'agit souvent d'une étape préliminaire aux études d'optimisation qui permet d'isoler, parmi les nombreux facteurs d'une réaction, ceux qui sont les plus influents. Nous avons privilégié pour cette étude la construction de plans en carré gréco-latin décrits par Sir Ronald Aylmer Fisher en 1924 pour le développement et l'exploitation d'une station agronomique. Cette méthode, basée sur la disposition particulière et structurée des modalités opératoires présente l'avantage d'être simple dans sa mise en oeuvre et ne nécessite pas l'usage d'outils informatiques spécifiques lors du traitement des informations.

### ***3.2.b. Définition des objectifs et des modalités des facteurs***

L'objectif de cette étude consiste à hiérarchiser la contribution de chacun des facteurs agissant sur le DS et le rendement massique respectivement en fonction de la quantité de chlorure d'acide laurique introduit, de la durée de la réaction et de la température du milieu réactionnel avec ou sans DMAP. La réalisation d'essais particuliers doit permettre la construction d'un modèle empirique reliant les variables associées à la réponse (DS et rendement massique) aux paramètres de la réaction.

Afin de pouvoir préciser la nature du modèle, il est nécessaire de définir les paramètres de réglage du processus dont on souhaite identifier les effets moyens. Ainsi, l'analyse en composantes principale nous a permis de définir deux nouveaux domaines expérimentaux correspondant à des essais réalisés avec ou sans DMAP. Les facteurs ont été choisis selon 3 modalités (Tableau 23).



Tableau 23: Définition des facteurs et de leurs modalités.

	Facteurs	Modalités			→ i
		1	2	3	
↓ k	<b>A- Quantité de chlorure d'acide</b>	1 éq/OH	1,5 éq/OH	2 éq/OH	
	<b>B- Température</b>	90°C	110°C	130°C	
	<b>C- Temps de réaction</b>	5 min	10 min	30 min	

Nous avons donc défini k facteurs ayant chacun i modalités m<sub>i</sub>. Le domaine expérimental est défini par l'ensemble des combinaisons réalisables soit :

$$N_{total} = (m_i)^k, \text{ ici } N_{total} = 3^3 = 27 \text{ combinaisons}$$

ou 54 en considérant l'intégralité du domaine expérimental (expériences réalisées avec et sans DMAP).

### 3.2.c. Définition du modèle et construction du plan d'expérience

Le nombre total de combinaisons étant trop important, il est nécessaire d'extraire, de la façon la plus équitable possible, un sous-ensemble de réglages particuliers définissant les essais à réaliser. Pour les problèmes de criblage et donc de classement des effets moyens des facteurs, le modèle adopté, notamment en milieu industriel, est un modèle additif sans couplage défini par l'équation suivante :

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

avec W<sub>i</sub> qui représente le poids du facteur i ; k le nombre de facteurs ; et Y la réponse mesurée (DS ou rendement massique).

Cette équation reflète les préoccupations de cette étude en identifiant le poids de chacun des facteurs W<sub>i</sub>. L'écriture de la forme générale du modèle ne permet toutefois pas de déterminer le nombre p d'inconnues associées. Néanmoins, il a été démontré que le nombre d'inconnues pouvait être défini par la relation suivante :

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

$$\text{Dans notre cas, } p = 1 + (3-1) + (3-1) + (3-1) = 7$$

La construction du plan d'expérience en carré-latin doit prévoir la réalisation de N essais répondant à l'exigence suivante :

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

La construction du carré-latin qui consiste à faire intervenir chacun des facteurs un même nombre de fois suivant l'ensemble de ses modalités est un arrangement orthogonal. Dans notre cas, il est facile de construire un tableau de 3×3 cases par permutation circulaire répondant à cet objectif (Tableau 24 et Tableau 25). L'application d'un plan en carré-latin pour cette étude nécessite donc la réalisation de 9 expériences en présence ou non de DMAP, soit au total 18 essais.

Tableau 24: Combinaison des différentes modalités des facteurs.

		Temps (min)		
		5	10	30
Température (°C)	90	1,0	1,5	2,0
	110	1,5	2,0	1,0
	130	2,0	1,0	1,5
		Quantité de RCOCl (éq/OH)		

Tableau 25: Matrice d'expériences.

Essai	Température	Temps	Quantité de RCOCl
1	90°C	5 min	1,0 éq/OH
2	90°C	10 min	1,5 éq/OH
3	90°C	30 min	2,0 éq/OH
4	110°C	5 min	1,5 éq/OH
5	110°C	10 min	2,0 éq/OH
6	110°C	30 min	1,0 éq/OH
7	130°C	5 min	2,0 éq/OH
8	130°C	10 min	1,0 éq/OH
9	130°C	30 min	1,5 éq/OH

Contrairement à la méthodologie classique consistant à faire varier une à une les modalités des facteurs, la mise en place d'un plan d'expérience permet une répartition homogène des essais dans le domaine expérimental comme le suggère la Figure 87-A.

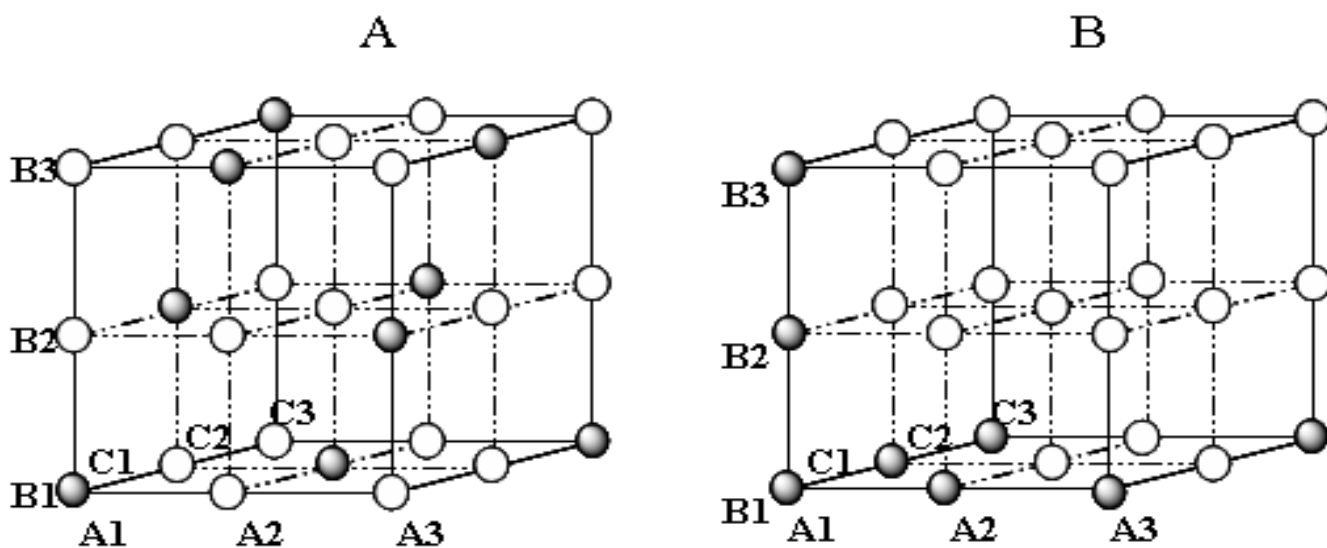


Figure 87: A : disposition des essais dans le domaine expérimental défini à partir du carré latin ;  
B : stratégie consistant à ne faire varier qu'un seul facteur à la fois.

### 3.2.d. Dépouillement des résultats et représentation graphique

Les résultats des essais effectués avec et sans DMAP sont présentés dans le Tableau 26 et le Tableau 27, respectivement. L'analyse globale des résultats permet d'identifier que les modifications des réglages des facteurs ont eu un effet sur la variation de la réponse, notamment le rendement massique. Il s'agit désormais de quantifier ces effets pour ensuite les comparer.

Tableau 26: Réponses mesurées sur des essais réalisés avec 1 éq/OH de DMAP.

Essais	Qté de RCOCI	Température	Temps	DS	Rdt massique
1	1,0	90	5	3,62	211 %
2	1,0	110	10	3,37	192 %
3	1,0	130	30	3,67	184 %
4	1,5	90	10	3,47	219 %
5	1,5	110	30	3,39	217 %
6	1,5	130	5	3,15	190 %
7	2,0	90	30	3,02	176 %
8	2,0	110	5	3,07	174 %
9	2,0	130	10	3,37	170 %

Tableau 27: Réponses mesurées sur des essais réalisés sans DMAP.

Essais	Qté de RCOCI	Température	Temps	DS	Rdt massique
1'	1,0	90	5	0,95	111,8 %
2'	1,0	110	10	2,47	206,3 %
3'	1,0	130	30	2,5	146,9 %
4'	1,5	90	10	1,43	116,1 %
5'	1,5	110	30	3,13	135,4 %
6'	1,5	130	5	2,58	145,5 %
7'	2,0	90	30	3,16	127,2 %
8'	2,0	110	5	3,48	192,1 %
9'	2,0	130	10	3,16	171,1 %

La reproductibilité de la réaction a été évaluée au centre du domaine expérimental par la réalisation de 3 essais identiques pour lesquels nous avons calculé l'incertitude sur le DS et le gain de poids (Tableau 28).

Tableau 28: Estimation de la dispersion expérimentale au centre du domaine.

Qté de RCOCl	Température	Temps	DS	Rdt massique
1,5 éq/OH	110°C	10 min	3,39	187 %
1,5 éq/OH	110°C	10 min	3,36	184 %
1,5 éq/OH	110°C	10 min	3,37	185 %

Les écarts types mesurés entre les réponses de ces 3 échantillons sont faibles et égaux à 0,015 pour le DS et 1,52 pour le rendement.

La méthode d'analyse mathématique des résultats d'essais a été proposée par Lochner et Matar (1990) <sup>191</sup> et elle ne requiert pas l'utilisation de l'outil informatique. L'analyse s'effectue au travers d'une grille de dépouillement, particulièrement adaptée à des arrangements orthogonaux.

Nous détaillerons ici seulement l'exemple de la grille de dépouillement associée au rendement massique en présence de DMAP (Tableau 29).

Tableau 29: Grille de dépouillement pour le rendement massique.

Essais	Y Rdt massique	Facteurs								
		Qté de RCOCl			Température			Temps		
		1,0	1,5	2,0	90	110	130	5	10	30
1	211	211			211			211		
2	192	192				192			192	
3	184	184					184			184
4	219		219		219				219	
5	217		217			217				217
6	190		190				190	190		
7	176			176	176					176
8	174			174		174		174		
9	170			170			170		170	
<b>Total</b>	1733	587	626	520	606	583	544	575	581	577
<b>Nombre</b>	9	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>Moyenne</b>	192,5	195,6	208,6	173,3	202	194,3	181,3	191,6	193,6	192,3

La zone intitulée "facteurs" contient autant de blocs que de facteurs, eux-mêmes subdivisés en autant de colonnes que de modalités. Les zones non grisées de la ligne numéro 1 correspondent aux modalités de l'essai 1. Il s'agit de reporter en regard du numéro de l'essai et sur l'intégralité d'une ligne dans les cases non grisées, les réponses Y mesurées et d'en effectuer, cette fois ici par colonne, la moyenne arithmétique. Les résultats sont reportés dans la partie basse de la grille de dépouillement.

L'analyse des données pour toutes les autres réponses observées permet de construire le tracé des effets moyens des facteurs. Pour cela, il faut reporter sur un graphique les valeurs moyennes calculées sur la dernière ligne de la grille de dépouillement en regard de chacune des modalités des facteurs (Figure 88 et Figure 89).

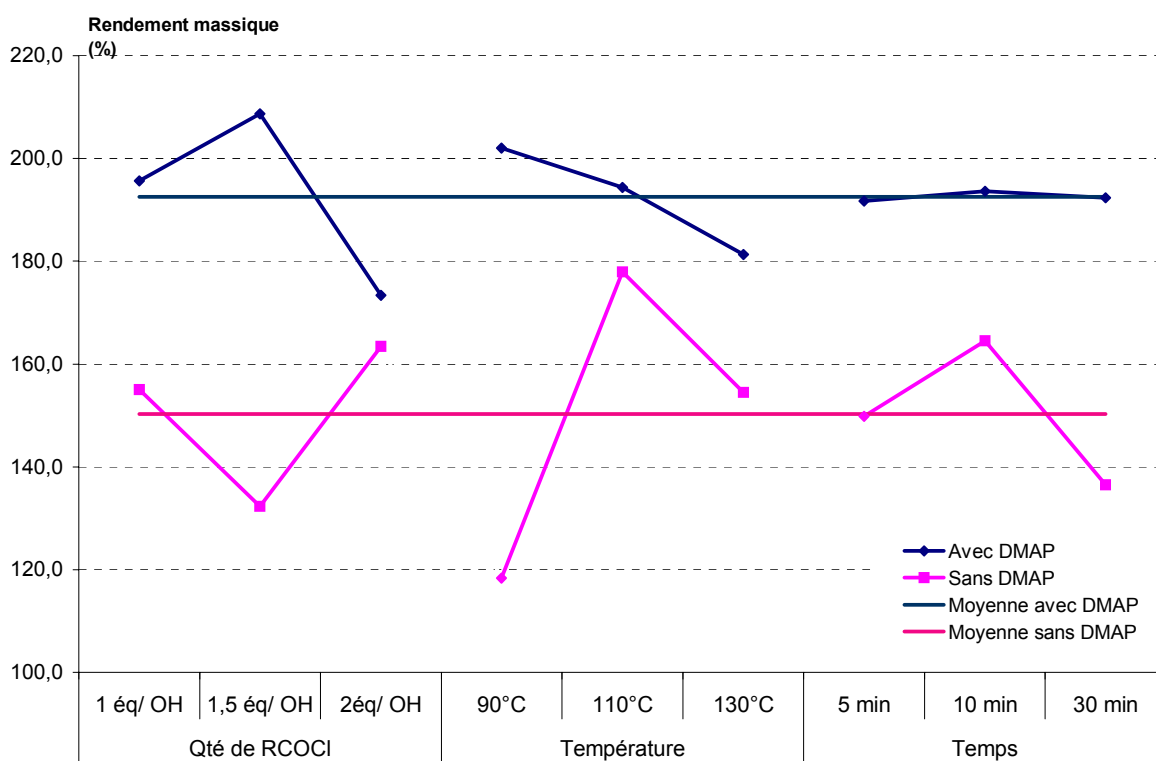


Figure 88: Tracé des effets moyens des facteurs sur le rendement massique.

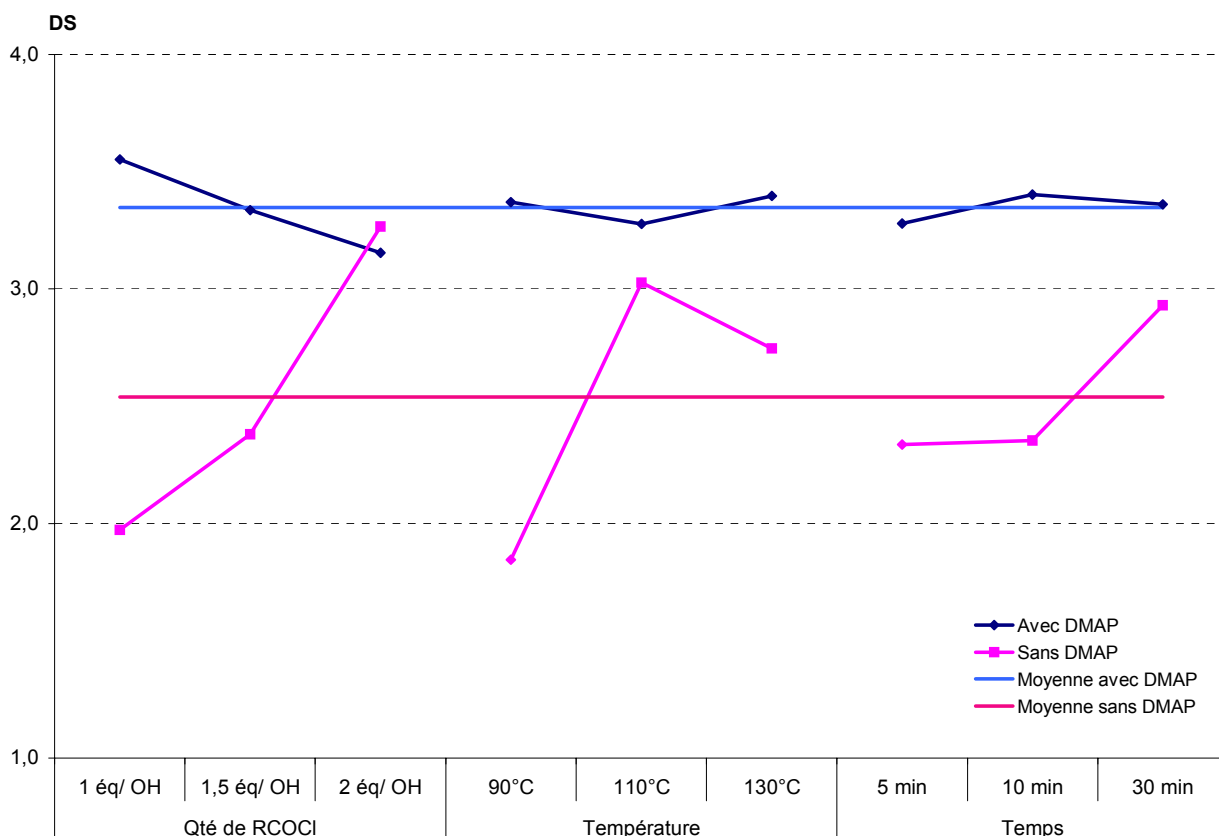


Figure 89: Tracé des effets moyens des facteurs sur le DS.

### 3.2.e. Analyse des résultats

La lecture des 2 graphiques précédents montre que les 3 facteurs qui gouvernent la réaction ont, dans le domaine choisi, une influence significative sur les réponses hormis l'évolution des valeurs du DS dans le cas des essais réalisés avec du DMAP.

En effet, dans le cas des essais réalisés en présence de DMAP, les esters d'agar synthétisés présentent tous, et quelque soit la modalité du facteur, une substitution optimale. Dans le domaine expérimental choisi, les facteurs ont peu d'influence sur la valeur du DS. Seule la quantité d'acide laurique semble avoir une importance significative sur l'évolution du rendement. En effet, il chute fortement entre 1,5 à 2 équivalents par fonction hydroxyle de RCOCl introduit. De même, une augmentation de la température engendre une diminution du rendement de la réaction. Ceci peut s'expliquer par une dépolymérisation importante du polymère à 130°C. Le degré de polymérisation (DP) étant néanmoins important, nous pouvons dire que les phases de purification ne permettent pas de récupérer les esters de faible DP.

Contrairement aux essais réalisés précédemment, on observe une grande variabilité des réponses qui ont toutes des valeurs inférieures aux mesures effectuées sur des esters obtenus en présence de DMAP. Le temps a ici une importance certaine. En effet, il semble nécessaire de prolonger la réaction jusqu'à 30 min afin d'obtenir un matériau dont le DS tend vers 3. Par contre, il y a une diminution de près de 30 % du rendement. Cette évolution témoigne d'une cinétique lente en l'absence de DMAP puisqu'il est nécessaire d'attendre 30 min pour obtenir un polymère de DS égal à 3. Il y a donc une compétition entre le taux de substitution et le gain de poids. La température, dans ce domaine expérimental, est le facteur induisant la plus forte augmentation de rendement et de DS. L'activation thermique est mise en évidence par le passage de 90°C à 110°C qui s'accompagne d'une augmentation de 60 % du rendement massique avec une augmentation conjointe du DS qui passe de 1,85 à 3,03. Ainsi, il semblerait qu'une augmentation raisonnable de la température palie au problème de réactivité du chlorure d'acide laurique en l'absence de DMAP. Une température trop importante du milieu réactionnel entraîne en revanche une diminution du rendement et du DS. En l'absence de DMAP, l'amplitude de la réponse DS est très dépendante de la quantité de chlorure d'acide laurique. Ainsi, le passage de 1 à 2 équivalents de chlorure d'acide laurique par fonction hydroxyle permet d'atteindre un taux de substitution comparable aux essais réalisés avec DMAP. Il semble toutefois que l'acylation touche seulement une faible quantité de polymère puisque l'augmentation du DS ne se traduit pas par une augmentation de la masse des plastiques obtenus.

L'exploitation des graphiques présentant les effets moyens des facteurs permettent enfin de valider le double rôle du DMAP :

- Activant, il améliore la cinétique de la réaction,
- Base, il neutralise l'acide chlorhydrique formé *in situ* au cours de la réaction.

Si la réaction a lieu en présence ou pas de DMAP, l'aspect des films plastiques obtenus est variable et reste dépendant de la présence ou non de la base dans le milieu réactionnel. Les esters obtenus sans DMAP présentent l'aspect d'un vernis écaillé alors que ceux qui ont été synthétisés avec DMAP sont souples et déformables.



Les effets des facteurs ont dans ce domaine expérimental une influence très différente en fonction du substrat de départ. En effet, des travaux effectués dans notre laboratoire sur des xylanes extraits du hêtre ont montré que les deux séries d'essais avec et sans DMAP évoluent dans le même sens avec une augmentation des réponses mesurées en fonction de l'accroissement des modalités.<sup>192</sup> Dans cette étude, les facteurs les plus influents sont la température en présence de DMAP et la quantité de chlorure d'acide en l'absence de DMAP. Une telle remarque confirme l'importance de notre approche qui tend à optimiser l'acylation en prenant en considération l'aspect réactionnel (paramètres physicochimiques des conditions opératoires) et les contraintes liées à la structure des polysaccharides modèles.

### ***3.2.f. Validation du modèle***

La validation du modèle est une phase indispensable à toute analyse mathématique et statistique. Il s'agit de définir de nouveaux essais dont les résultats devront conforter l'interprétation du modèle mathématique. On cherchera donc à maximiser ou minimiser les différentes réponses.

Nous avons effectué cette étape de validation uniquement sur la série réalisée avec DMAP. Ce choix est justifié par l'obtention systématique de films plastiques dont les propriétés mécaniques et thermiques ont été testées. L'analyse des Figure 88 et Figure 89 permet d'envisager la combinaison des différentes modalités afin d'obtenir une variation maximale ou minimale des réponses. La combinaison indépendante des modalités renvoyant une réponse maximale (ou minimale) doit ainsi permettre l'obtention d'un film plastique avec un rendement maximal (ou minimal).

*Tableau 30: Essais de validation pour la série avec DMAP.*

<b>Essai</b>	<b>Quantité de RCOCl</b>	<b>Température</b>	<b>Temps</b>	<b>Rdt</b>	<b>DS</b>
<b>Valeur min</b>	2,0 éq/OH	130°C	5 min	175 %	3,35
<b>Valeur max</b>	1,5 éq/OH	90°C	10 min	220 %	3,50

La mesure du gain de poids après la réalisation de ces essais valide le modèle additif sans couplage du plan d'expérience (Tableau 30). En revanche, en raison de la trop faible variation du DS, nous n'avons pas jugé pertinent d'effectuer cette vérification.

### 3.3. Modélisation de la réaction d'estérification

La démarche précédente nous a permis de comparer les effets moyens des facteurs dans une zone d'intérêt définie après l'analyse en composante principale d'essais réalisés en ayant fait varier une à une les modalités des facteurs. Nous souhaitons désormais modéliser, le plus fidèlement possible, la variation d'une réponse pour pouvoir satisfaire aux exigences d'un cahier des charges en termes de DS et de gain de poids.

Le modèle mathématique de nature polynomiale, sous jacent au plan d'expérience en carré-latin, permet de répondre à cette problématique d'optimisation.

#### 3.3.a. Définition du modèle

Les modèles polynomiaux de degré 2 sont particulièrement bien adaptés aux problèmes d'optimisation pour atteindre un niveau de réponse donné. Ils sont également associés aux plans d'expériences pour l'étude des surfaces de réponses. La réponse  $Y_i$  mesurée pour le traitement  $i$  s'écrit sous la forme suivante :

$$Y_i = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i x_i + \sum_{i=1}^k a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k a_{ij} x_i x_j$$

avec  $a_i$  qui représente les coefficients du modèle ;  $x_i$  une variable sans dimension définie par codage de la valeur  $u_i$  du facteur  $U$  à partir du centre de l'étendue du domaine sur la moitié de son étendue et  $k$  le nombre de facteurs.

$$x_i = \frac{u_i - \left(\frac{u_{\max} + u_{\min}}{2}\right)}{\left(\frac{u_{\max} - u_{\min}}{2}\right)}$$

La modélisation de la réaction d'acylation de l'agar s'articule autour d'un plan d'expérience pour lequel il est nécessaire d'effectuer un minimum de  $N$  traitements expérimentaux pour déterminer les  $p$  coefficients du modèle mais aussi pour le valider. Dans notre cas, comme il a été défini dans la partie expérimentale, 10 inconnues sont associées à l'écriture de  $Y_i$ . Le plan d'expérience en carré-latin (Tableau 26) étant insuffisant pour couvrir

ce nombre minimal de 10 essais, nous avons, à l'aide du logiciel de régression NemrodW, extrait du domaine expérimental 4 essais supplémentaires à réaliser (Tableau 31).

Tableau 31: Essais complémentaires avec DMAP pour la construction des surfaces de réponse.

Essai	Qté de RCOCl	Température	Temps	DS	Rdt
10	1 éq/OH	90°C	30 min	3,4	183 %
11	1 éq/OH	130°C	5 min	3,12	167 %
12	2 éq/OH	90°C	5 min	2,95	180 %
13	2 éq/OH	130°C	30 min	3,62	187 %

### 3.3.b. Analyse mathématique des résultats

L'analyse mathématique consiste à estimer, grâce à la méthode des moindres carrés, les  $p$  coefficients du modèle et les  $N$  résidus, c'est-à-dire les écarts entre les valeurs observées et les valeurs prévues par le modèle pour chacun des traitements du plan d'expérience.<sup>193</sup> La détermination des 10 inconnues se résume donc à la résolution d'un système de 13 équations à 10 inconnues qui se présentent sous la forme :

$$y_i = a_0 + \sum_{i=1}^{k=3} a_i x_i + \sum_{i=1}^{k=3} a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k a_{ij} x_i x_j + e_i$$

où  $e_i$ , appelé résidu, représente l'écart entre la valeur observée de la réponse  $\hat{y}$  et sa valeur calculée  $y$  et  $a_i$  les coefficients à déterminer.

La résolution de ces équations, dont la méthode de résolution est présentée dans l'annexe IV, permet d'estimer les coefficients  $a_i$  qui sont reportés dans le Tableau 32.

Tableau 32: Coefficients  $a_i$  relatifs au modèle pour le rendement et le DS.

	Coefficients relatifs au Rdt	Coefficients relatifs au DS
$a_0$	215,64	3,47
$a_1$	-4,88	-0,12
$a_2$	-6,14	0,06
$a_3$	2,05	0,11
$a_{11}$	-27,20	-0,05
$a_{22}$	-4,64	0,07
$a_{33}$	-2,82	-0,18
$a_{12}$	4,50	0,13
$a_{13}$	4,11	0,02
$a_{23}$	9,37	0,15

De la valeur de ces coefficients, on peut calculer les réponses données par le modèle (Tableau 33).

Tableau 33: Comparaison des réponses observées et calculées à partir du modèle.

Essais	DS		Rendement massique	
	mesuré	calculé	mesuré	calculé
<b>1</b>	3,62	3,56	211	208
<b>2</b>	3,37	3,43	192	194
<b>3</b>	3,67	3,62	184	183
<b>4</b>	3,47	3,44	219	221
<b>5</b>	3,39	3,40	217	215
<b>6</b>	3,15	3,17	190	191
<b>7</b>	3,02	2,98	176	175
<b>8</b>	3,07	3,01	174	175
<b>9</b>	3,37	3,34	170	167
<b>10</b>	3,4	3,44	183	185
<b>11</b>	3,12	3,13	167	168
<b>12</b>	2,95	3,04	180	181
<b>13</b>	3,62	3,67	187	190

La comparaison des réponses permet au travers du calcul du résidu  $e_i$  de conclure sur la qualité descriptive ou non du modèle (Figure 90, Figure 91).

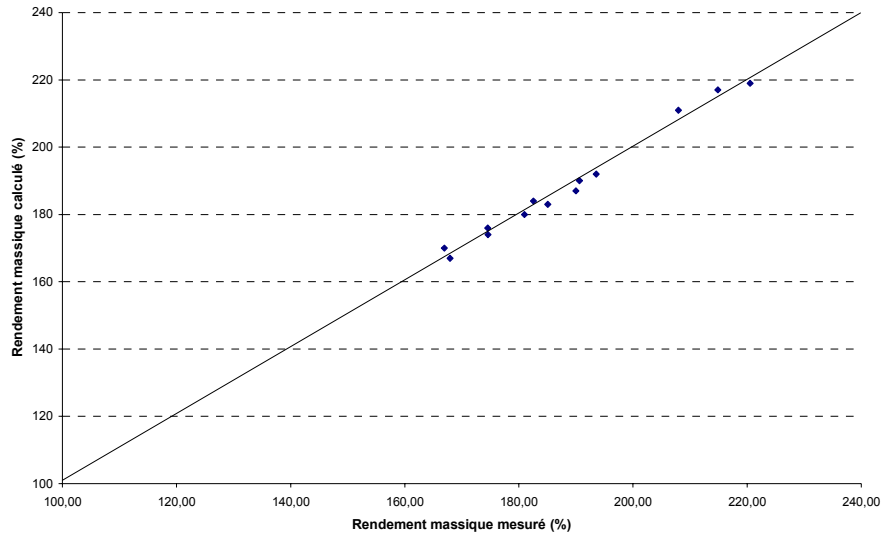


Figure 90: Adéquation entre le rendement mesuré et le rendement calculé.

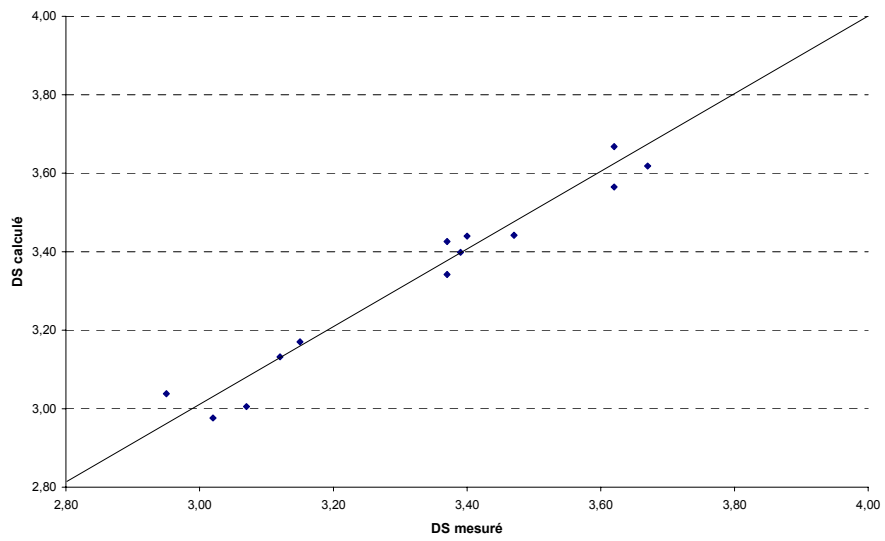


Figure 91: Adéquation entre le DS mesuré et le DS calculé.

### 3.3.c. Analyse graphique du modèle

L'objet de cette étude est de répondre à l'obtention de matériaux plastiques dont les caractéristiques auraient été préalablement définies à partir des conditions opératoires extraites du modèle mathématique.

L'exploitation directe de l'équation étant délicate, il est commode de la restituer sous la forme d'une représentation graphique adaptée. En fixant un des trois paramètres de la réaction, il est possible de représenter des surfaces de réponse matérialisant la surface de régression dans un espace tridimensionnel. Il est également possible de projeter l'équation dans un plan sous la forme de courbes d'isoreponses qui s'interprètent comme les courbes de niveau d'une carte. Nous avons donc construit, sous la forme de 9 graphes en trois dimensions et 9 courbes d'isoreponses, chacune des réponses DS et rendement massique en fixant successivement chacune des trois variables à la valeur d'une des trois niveaux qui lui sont associées (Figure 92, Figure 93).

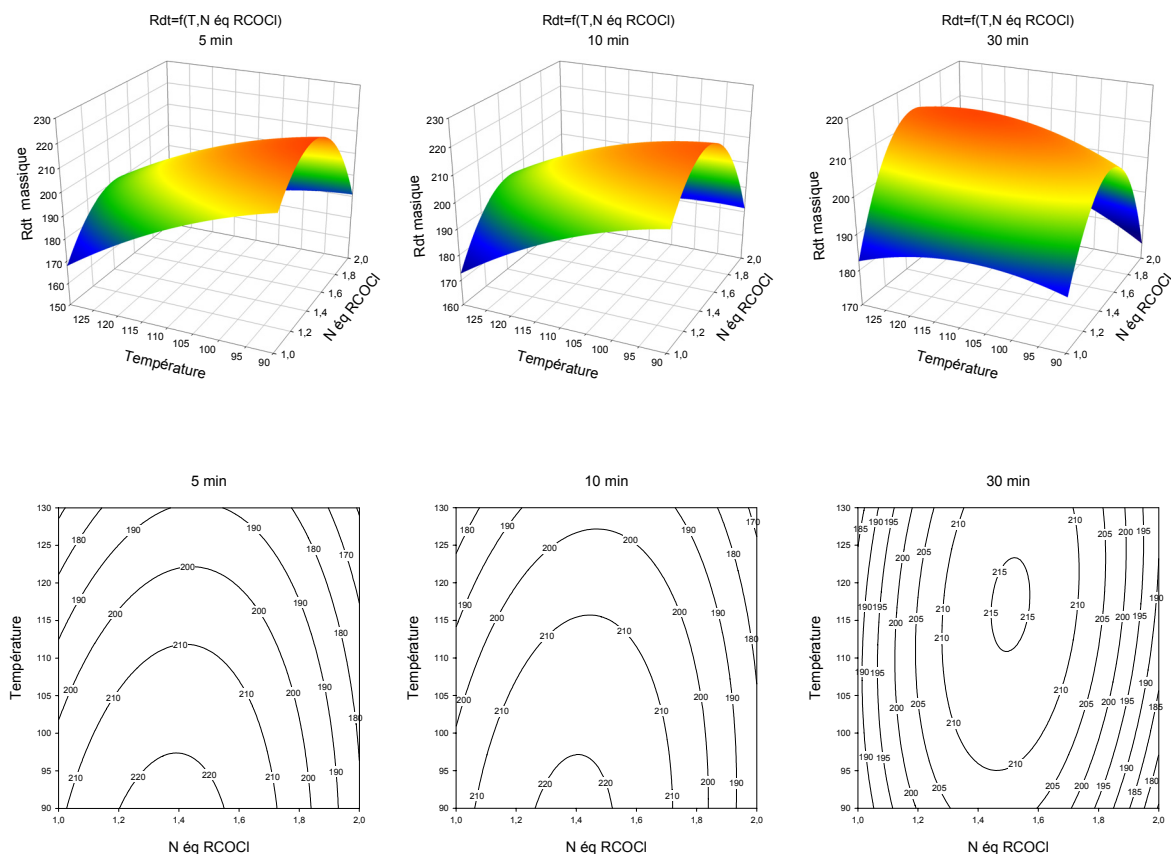


Figure 92: Surfaces de réponses et courbes d'isoreponses représentant le rendement pour des temps fixés en fonction de la température et du nombre d'équivalent de chlorure d'acide laurique.

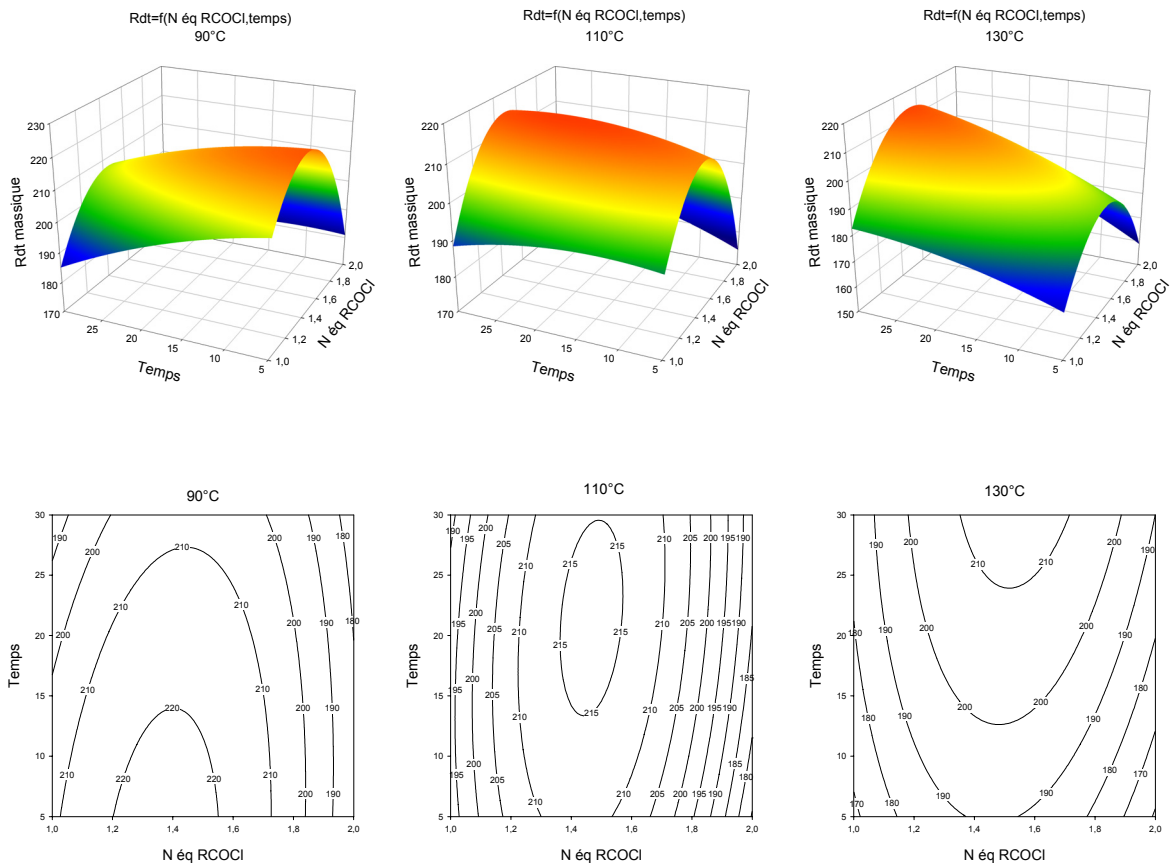


Figure 93: Surfaces de réponses et courbes d'isoreponses représentant le rendement massique pour des températures fixées en fonction du nombre d'équivalent de RCOCl et du temps de réaction.

L'allure de l'évolution de la réponse gain de poids pour un temps ou une température fixé est similaire. Les profils tracés traduisent une bonne répartition de la réponse, ici le gain de poids, autour de la quantité de chlorure d'acide laurique introduit pour un temps ou une température donné. Ainsi, pour un couple de niveaux (température, temps de réaction), on observe une élévation du rendement massique jusqu'à 1,5 équivalents de RCOCl introduit, puis une décroissance pour des valeurs supérieures. Dans tous les cas, le rendement atteint est très inférieur au rendement maximal de 338 %.

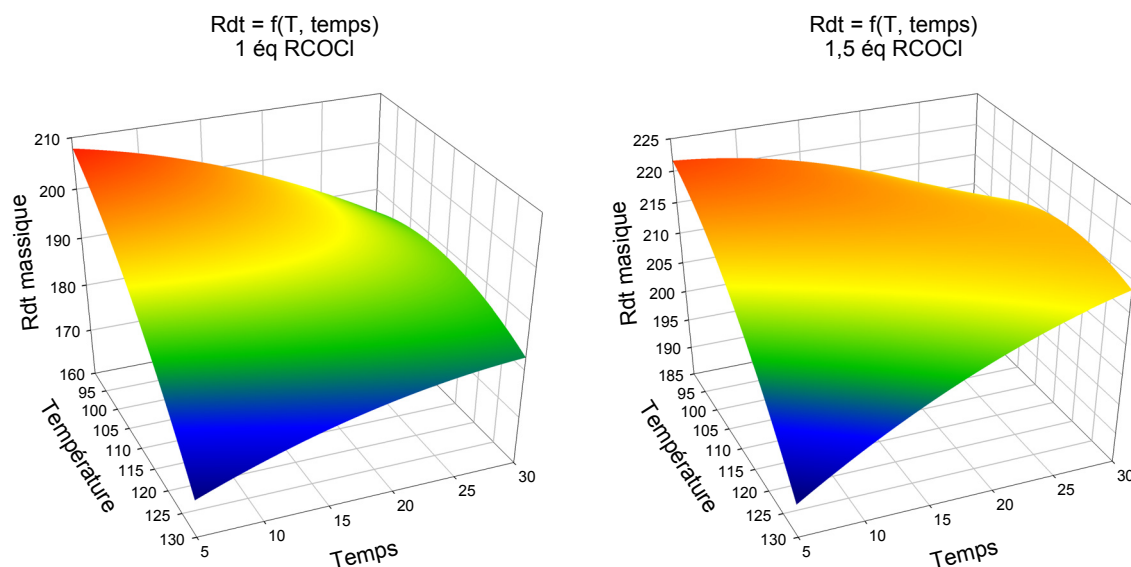


Figure 94: Surfaces de réponses représentant le rendement massique pour une quantité de chlorure d'acide fixée en fonction du temps et de la température.

L'examen des surfaces de réponses relatives au rendement pour une quantité de réactif fixée (Figure 94) conforte les prédictions réalisées à partir des tracés moyens des facteurs (Figure 88). Il est ici aisé de visualiser l'évolution du rendement en fonction de la température et du temps. Les conditions les plus douces conduisent aux meilleurs rendements massiques. Une augmentation du temps, à température constante, conduit à une perte de masse due à un phénomène de dépolymérisation. Par contre, l'évolution du rendement massique à une température donnée pour des temps variables est plus délicate à interpréter, en particulier à 130°C. Cette évolution pourrait s'expliquer par l'estérification de molécules de DP variables au cours du temps. Une telle hypothèse repose sur des résultats obtenus à partir de l'analyse calorimétrique des films plastiques (Cf. § 4.1) qui présentent deux transitions vitreuses, ce qui est un phénomène spécifique des polymères constitués de chaînes de longueurs différentes (Tableau 34). Cette évolution particulière pourrait d'ailleurs être due aux conditions opératoires employées. En effet, lors de la manipulation, le mélange initial d'agar dans le DMA est placé au bain marie à 130°C le temps nécessaire à la montée en température du milieu réactionnel avant l'ajout du chlorure d'acide laurique. Pendant cette phase de montée en température, il est possible qu'une certaine quantité de polysaccharide se dépolymérise avant même de réagir. Le rendement massique faible obtenu à 130°C s'expliquerait



notamment par la présence moins abondante de polysaccharides de DP élevés dont la réactivité semble plus importante (Cf. les conditions opératoires les plus douces à 5 minutes de réaction et à 90°C). En prolongeant ensuite la réaction, les polysaccharides de DP plus faibles réagiraient. Dans tous les cas, il y aurait une compétition entre réactivité et dégradation des polymères.

Comme nous avons tracé les surfaces de réponses et courbes d'isoréponses modélisant l'évolution du rendement massique dans le domaine expérimental précédemment défini, nous pouvons tracer les surfaces de réponses ou d'isoréponses pour le DS (Figure 95).

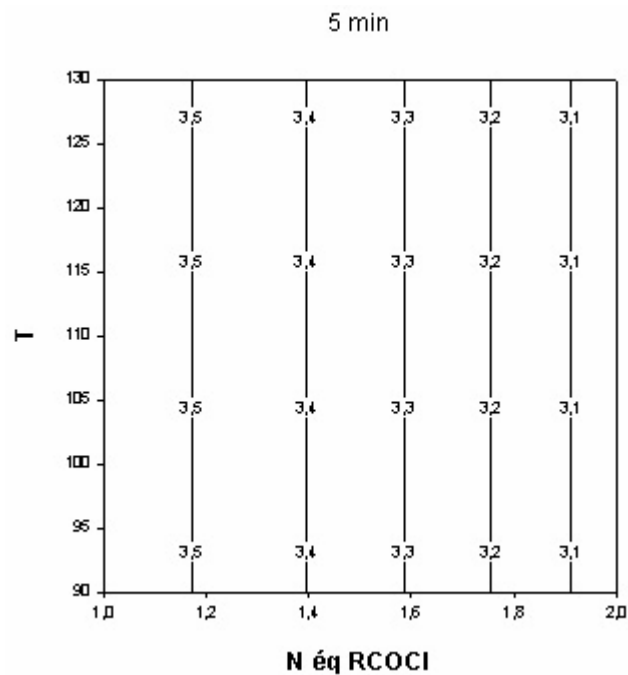


Figure 95: Courbe d'isoréponse modélisant la variation du DS en fonction de la température et du nombre d'équivalent de chlorure d'acide laurique pour un temps de 5 min.

L'exploitation de ces représentations graphiques est cependant très limitée et ne présente pas d'intérêt majeur en raison des trop faibles amplitudes de variation du DS.

## **4. Évaluation du comportement thermomécanique des films synthétisés**

Dans la dernière phase de ce travail, nous nous sommes attachés à étudier quelques propriétés mécaniques et thermiques caractérisant ces matériaux et surtout de les comparer à quelques polymères commerciaux. Ces tests ont été réalisés au CRITT Matériaux de Rochefort sous la direction d'Annette Roy, Ingénieur R&D.

### **4.1. Analyse thermique**

Tous les polymères, qu'ils soient amorphes ou semi-cristallins, présentent, à des températures caractéristiques en dessous de la température de fusion ( $T_f$ ), des variations anormalement rapides. La température à laquelle se produisent ces variations est la température de transition vitreuse ( $T_g$ ).

La  $T_g$  est la température où les forces d'adhérence entre les chaînes de polymères sont telles que l'agitation thermique est insuffisante pour laisser aux chaînes une chance de se décoller et à l'ensemble la possibilité de se déformer. En dessous de la  $T_g$ , les polymères sont donc durs et cassants, au dessus, ils présentent des propriétés de flexibilité, voire d'élasticité, qui leur confèrent un intérêt majeur pour des applications techniques. La détermination de cette valeur présente une importance technique considérable puisqu'elle fixe la température à partir de laquelle il y a une possibilité de mise en forme.

L'analyse enthalpique différentielle ou DSC (Differential Scanning Calorimetry) est utilisée pour repérer et mesurer les changements d'état dans des échantillons de 10 à 20 mg. L'appareillage mesure la différence d'énergie calorifique à fournir à deux capsules métalliques (une sert de référence et l'autre contient l'échantillon) pour que celles-ci subissent un certain cycle de température programmé. Le passage de la zone de transition vitreuse se traduit par un changement de capacité calorifique et donc par un point d'inflexion (Figure 96).

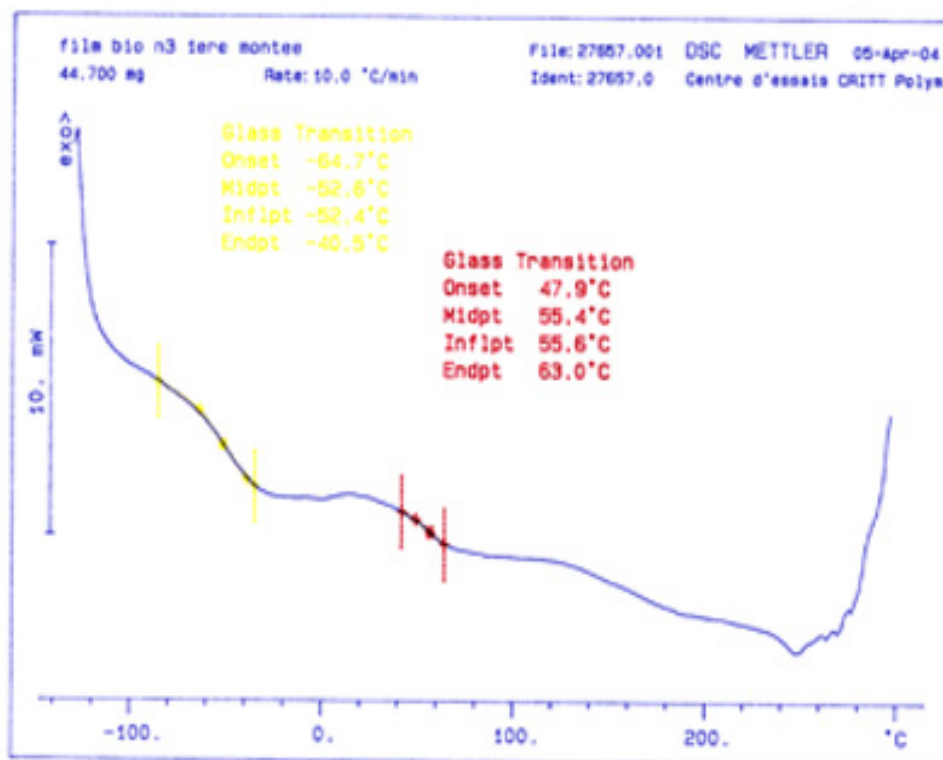


Figure 96: Exemple d'analyse DSC sur un ester d'agar.

Les résultats des thermogrammes des 9 échantillons obtenus en présence de DMAP à partir des modalités du plan d'expérience en carré latin sont reportés dans le Tableau 34.

Tableau 34: Propriétés thermiques des esters d'agar.

Échantillon	Conditions opératoires (N <sub>éq</sub> RCOCl; T; temps)	DS	Rdt massique	Nombre de transitions vitreuses	T <sub>g</sub> (°C)
1	1 éq/OH; 90°C; 5 min	3,62	211 %	1	98,1
2	1 éq/OH; 110°C; 10 min	3,37	192 %	2	-51,9 ; 53,6
3	1 éq/OH; 130°C; 30 min	3,67	184 %	2	-52,6 ; 55,4
4	1,5 éq/OH; 90°C; 10 min	3,47	219 %	2	-48,3 ; 53,9
5	1,5 éq/OH; 110°C; 30 min	3,39	217 %	2	-49,7 ; 54,3
6	1,5 éq/OH; 130°C; 5 min	3,15	190 %	2	-53,3 ; 57,6
7	2 éq/OH; 90°C; 30 min	3,02	176 %	2	-57,0 ; 62,9
8	2 éq/OH; 110 °C; 5 min	3,07	174 %	2	-54,2 ; 55,9
9	2 éq/OH; 130°C; 10 min	3,37	170 %	2	-55,1 ; 53,5

La présence de deux transitions vitreuses pour 8 films suggère une disparité des longueurs des chaînes macromoléculaires. Les conditions drastiques de la réaction (température et durée) peuvent en être à l'origine. Elles conduisent, en effet, à l'hydrolyse partielle du polymère en cours de réaction. La première transition vitreuse (Tg négative) serait le fait des chaînes les plus courtes tandis que la deuxième transition serait associée à des chaînes de DP plus élevé. Cette hypothèse est validée par l'échantillon **1** qui ne possède qu'une seule Tg. Cet échantillon a été obtenu dans les conditions les plus douces de cette étude (90°C, 5 min) qui préservent en théorie l'intégrité du polymère.

Nous pouvons également souligner que les thermogrammes d'esters d'agar ne présentent pas de pics endothermiques d'intensité importante caractéristiques de la fusion du matériau. Ce comportement est similaire aux esters de celluloses qui se dégradent avant de fondre.

## 4.2. Tests mécaniques

L'essai de traction est la contrainte mécanique la plus fréquemment utilisée dans le domaine des tests thermomécaniques. Il s'agit d'une méthode dite " statique " puisque la contrainte est appliquée de façon monotone en fonction du temps. L'éprouvette du matériau à étudier de section S et de longueur l (Figure 97) est soumise à une force de traction F. La contrainte appliquée aux sections de l'éprouvette s'écrit :

$$\sigma = \frac{F}{S}$$

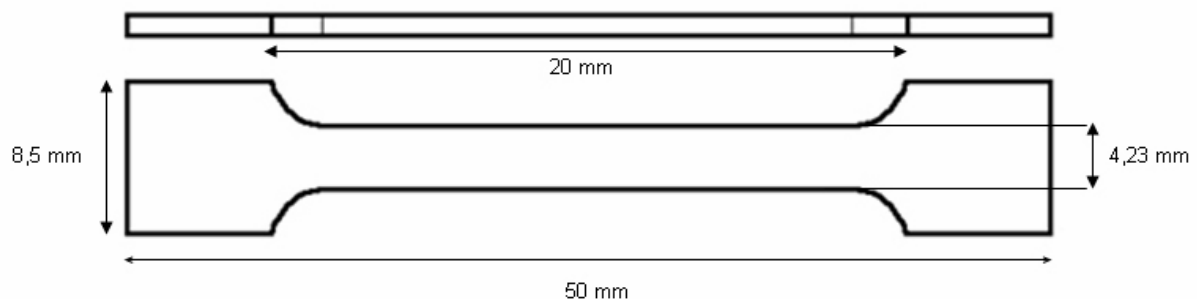


Figure 97: Schéma d'une éprouvette haltère.

Le tracé de la contrainte  $\sigma$  en fonction de la déformation  $\epsilon$ , lors d'un essai de traction, permet de caractériser le comportement élastique du matériau (Figure 98).

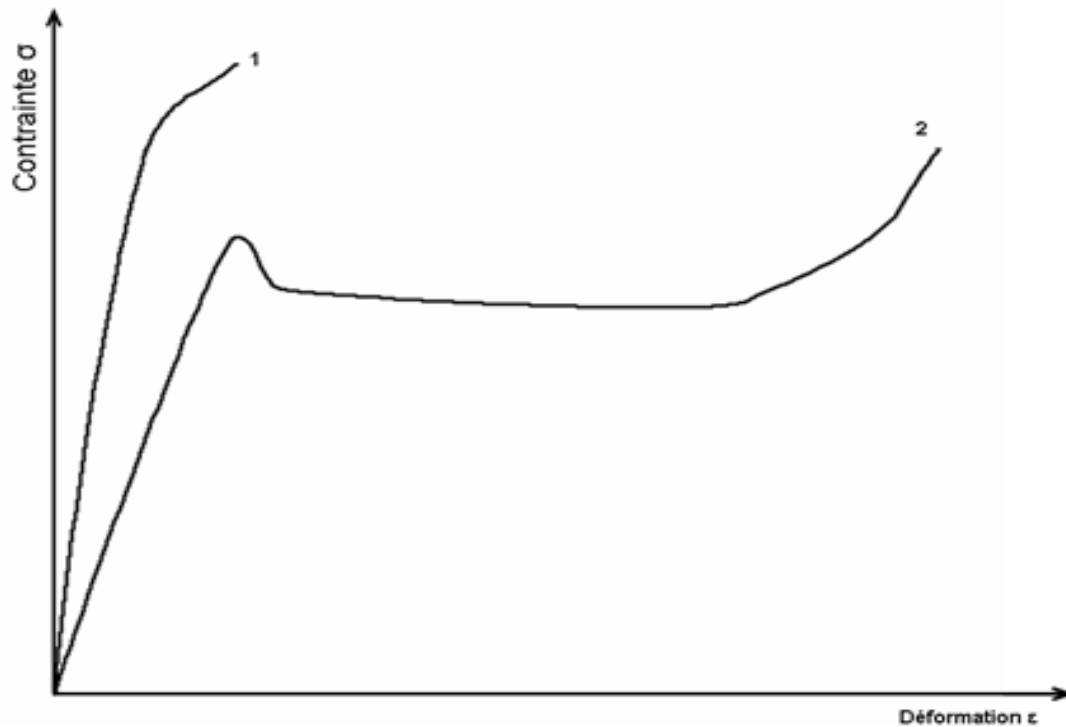


Figure 98: Différents comportements de polymères à la traction.

Plusieurs zones et comportements sont observables. La courbe 1 est typique des matériaux rigides dont la déformation est faible avant la rupture. C'est le cas des thermoplastiques amorphes comme le polystyrène et des thermodurcissables tels que les résines polyesters.

La courbe 2 est représentative des polymères semi-cristallins et des polymères amorphes (à des températures proches de la zone de transition vitreuse). Au-delà d'un seuil de plasticité, on observe la formation d'une striction qui amorce une déformation plastique, c'est-à-dire un étirement à froid. L'allure de cette courbe de traction est commentée Figure 99.

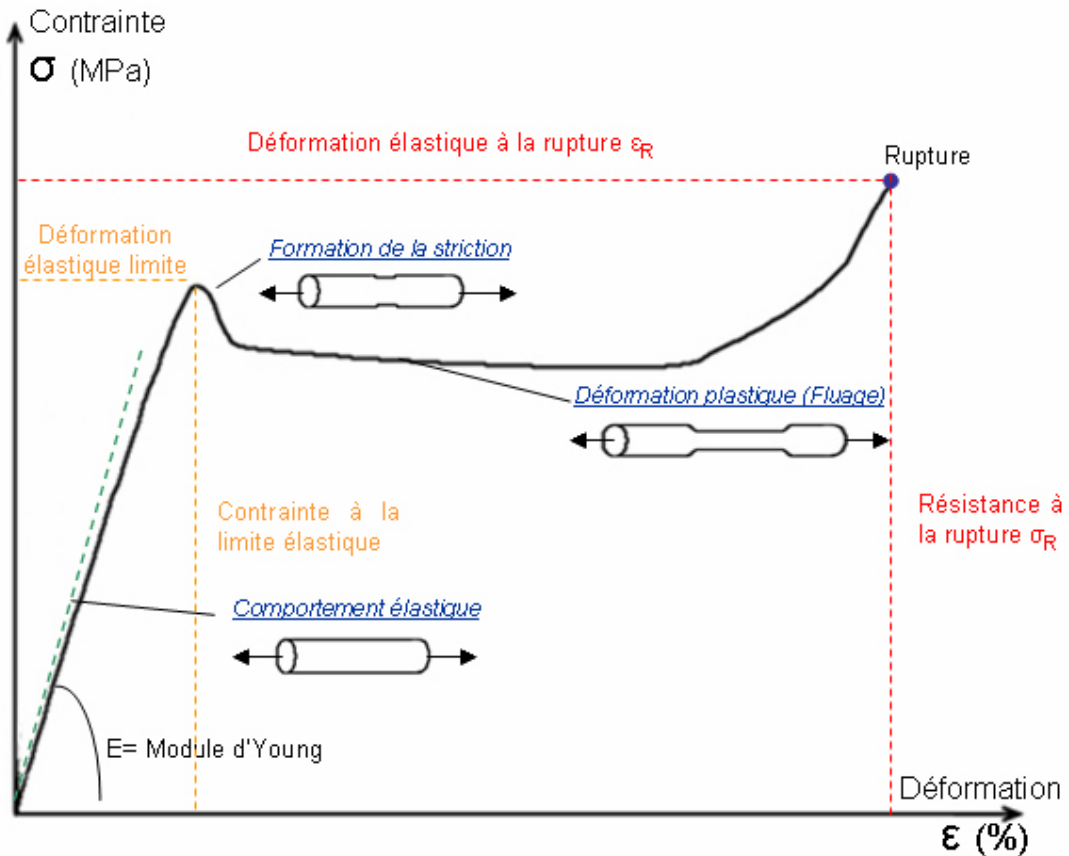


Figure 99: Évolution de la forme d'une éprouvette au cours d'un étirement.

La pente initiale de la courbe permet de déterminer la valeur du module d'Young ou module d'élasticité qui reflète la rigidité du matériau. Dans ce cas, le matériau possède une élasticité instantanée ou de Hooke. Elle est définie comme la réponse  $\sigma$  à une déformation uniaxiale réversible :

$$\sigma = E \times \varepsilon$$

où  $E$  est le module d'Young ;  $\varepsilon$  est l'allongement élastique ou déformation élastique tel que  $\varepsilon = \frac{dl}{l}$ , avec  $dl$  qui représente la longueur de l'allongement du matériau sous la force  $F$  et  $l$  la longueur initiale de l'éprouvette. Au plan moléculaire, l'élasticité s'explique par de légères déformations instantanées et réversibles des liaisons de valence par étirement, par distorsion ou par des changements de distance entre des chaînes voisines. Ce phénomène se produit pour des températures inférieures à  $T_g$ .

Cette courbe permet également de définir une zone plastique pour laquelle la déformation, fonction du temps, est irréversible et croissante à contrainte constante. Il est alors possible de définir plusieurs caractéristiques : la résistance et le degré d'allongement du matériau à la rupture.

Ces deux domaines sont séparés par une zone charnière, la zone de striction où la contrainte diminue localement. Dans ce domaine, il y a une diminution locale de la section de l'éprouvette qui se propage et s'étend jusqu'à la rupture pour des étirements grandissants.

Les mesures effectuées sur la série de plastiques synthétisés, en présence de DMAP, dans le cadre du plan d'expérience en carré latin sont reportées dans le Tableau 35. Le Tableau 36 présente, à titre de comparaison, les propriétés mécaniques de films polymères commerciaux.

*Tableau 35: Propriétés mécaniques des films synthétisés avec DMAP.*

<b>Echantillon</b>	<b><math>\sigma_{Rupture}</math> (MPa)</b>	<b><math>\epsilon_{Rupture}</math> (%)</b>	<b>E (MPa)</b>
<b>1</b>	12,4	137,5	163,5
<b>2</b>	11,7	104,5	208,9
<b>3</b>	11,1	141,8	156,7
<b>4</b>	7,8	118,8	157,4
<b>5</b>	6,4	23,2	167,3
<b>6</b>	8,9	19,5	248,4
<b>7</b>	14,2	19,6	419,3
<b>8</b>	10,7	49,8	302,0
<b>9</b>	6,7	24,3	203,9
<b>Ecart Type</b>	2,7	53,7	87,5

Une première analyse des résultats permet de constater une grande dispersion des valeurs en fonction de l'échantillon. Avec une valeur moyenne de 10 sur l'ensemble des résultats, la contrainte à la rupture est comparable aux polyéthylènes basses densité d'origine pétrochimique. En revanche, les valeurs de l'allongement à la rupture et du module d'Young s'inscrivent respectivement dans la gamme des esters de cellulose et du polypropylène. Au regard des caractéristiques mesurées et de leur étendue, les esters d'agar constituent une famille distincte de polymères viscoélastiques.

Tableau 36: Caractéristiques mécaniques de films polymères commerciaux, d'après Trotignon, et al., 1996.<sup>194</sup>

Nature du film	$\sigma_{Rupture}$ (MPa)	$\epsilon_{Rupture}$ (%)	E (MPa)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)
<b>Polyéthylène basse densité PEFD</b>	9-12	400-600	200-300	110-120	-110
<b>Polyéthylène haute densité PEHD</b>	24-30	500-900	800-1200	128-135	-110
<b>Polypropylène PP</b>	30-40	150-600	50-1600	162-168	-10, +10
<b>Polychlorure de vinyle PVC rigide</b>	45-60	20-70	2200-	75-85	140-170
<b>Polychlorure de vinyle PVC souple</b>	10-20	200-500	3000	60-75	-10- -40
<b>Polystyrène PS</b>	30-60	2-3	3300	90	
<b>Polyamide PA</b>	90	23	3200	50-60	218-220
<b>Acétate de cellulose CA</b>	25-50	3-70	1400	100-130	
<b>Acétobutyrate de cellulose CAB</b>	20-50	60-100	1000	80-120	
<b>Propionate de cellulose CP</b>	17-50	45-60	800	80-120	
<b>Polycarbonate PC</b>	63	6	2430	150	

Face à la difficulté de décrire les caractéristiques des matériaux synthétisés par rapport aux matériaux commerciaux, nous avons choisi d'évaluer l'effet moyen des différents facteurs sur les grandeurs mesurées en appliquant la méthodologie décrite Tableau 29. Nous pouvons alors tracer les effets moyens des facteurs respectivement sur l'allongement et le module d'Young (Figure 100, Figure 101) en omettant néanmoins volontairement l'étude de la contrainte à la rupture pour laquelle les variations observées sont de trop faible amplitude.

Nous avons déjà montré que l'estérification de l'agar est une réaction rapide qui conduit, dès 1 éq/OH de chlorure d'acide laurique et de façon optimale, à la substitution quasi-totale de l'agar. Le rendement massique est alors maximal. Par ailleurs, une quantité supérieure de chlorure d'acide laurique conduit à une dépolymérisation du polymère puisque le rendement massique chute fortement malgré un DS similaire.



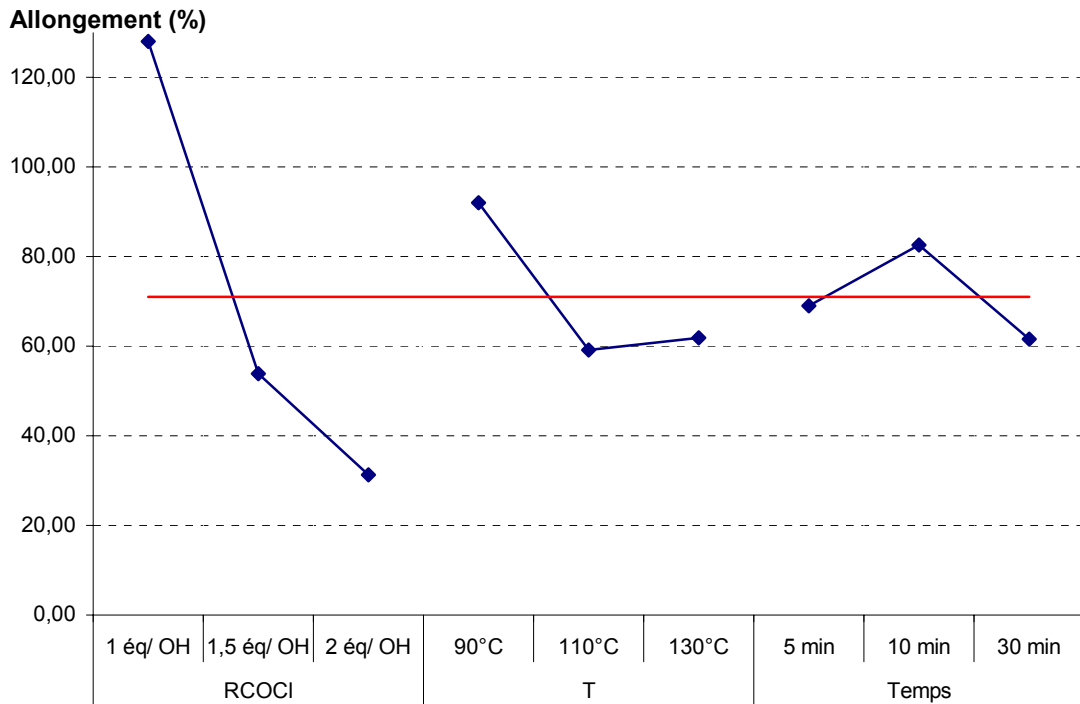


Figure 100: Effets moyens des facteurs sur l'allongement des films d'esters d'agar.

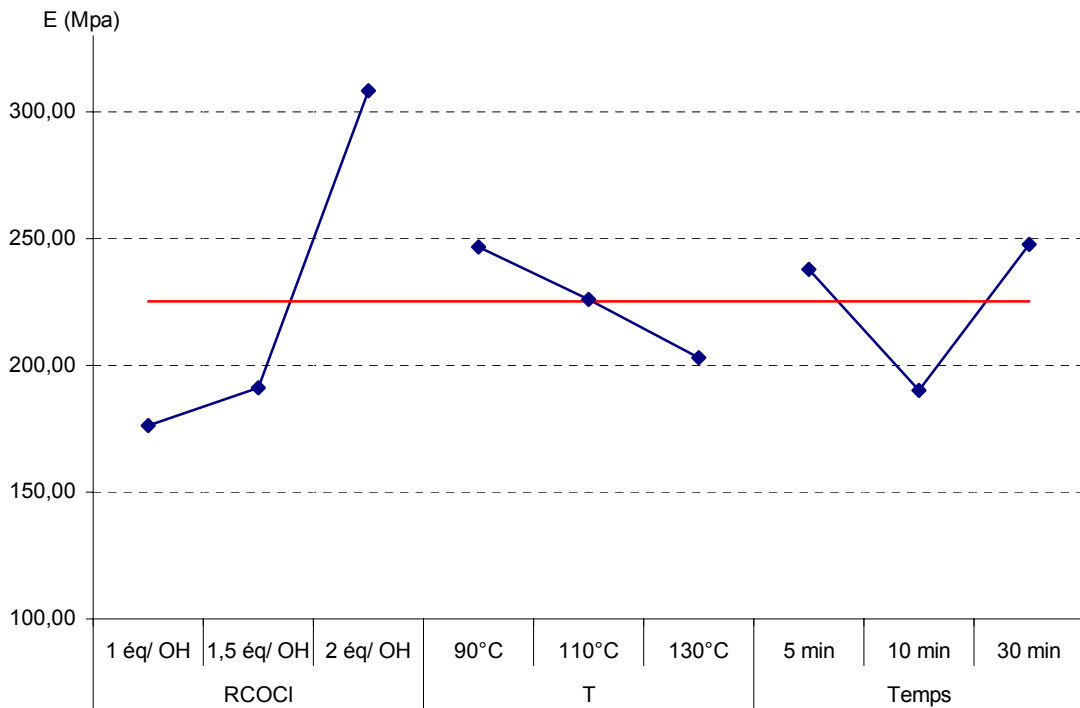


Figure 101: Effets moyens des facteurs sur la contrainte à la rupture des esters d'agar.

Eu égard aux valeurs du DS qui sont toujours optimales, les réponses à la traction des matériaux sont à corrélérer avec les différents facteurs et leurs modalités. Comme pour l'évolution du rendement massique, les plus grandes variations observées sont imputables à la quantité de chlorure d'acide laurique. Une faible quantité de chlorure d'acide permet l'obtention d'un matériau plastique et non élastique et inversement. Nous pouvons supposer que le phénomène physique mis en jeu est fonction du DP des polymères. L'hydrolyse partielle des polymères au cours de la réaction serait déterminante des propriétés des matériaux au même titre que les agencements tridimensionnels des chaînes lors du casting.

Dans des conditions similaires, les films plastiques de xylane ont des propriétés très différentes.<sup>7</sup> Leur élongation (environ 10 %) et leur contrainte à la rupture (en moyenne de l'ordre de 9 MPa) sont très faibles. Ces constatations nous ont donc poussées à explorer et étendre cette méthode à d'autres souches de phycocolloïdes.

## 5. Essais d'acylation de phycocolloïdes anioniques

L'agar est un phycocolloïde neutre de la famille des galactanes produit par les macroalgues rouges. Les résultats que nous venons de présenter démontrent que de tels polymères pouvaient être très facilement estérifiés par le chlorure d'acide laurique dans le but d'obtenir des films plastiques hydrophobes. Les algues sont des organismes producteurs de phycocolloïdes aux structures et à la composition variées souvent destinés à un usage industriel et/ou agroalimentaire. C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité réaliser une étude prospective dans ce domaine afin de corrélérer la structure des polysaccharides à leur capacité à réagir dans un contexte expérimental donné. Parmi les phycocolloïdes connus, nous avons considérés :

- Les carraghénanes, galactanes sulfatés produits par les macroalgues rouges (Figure 102)

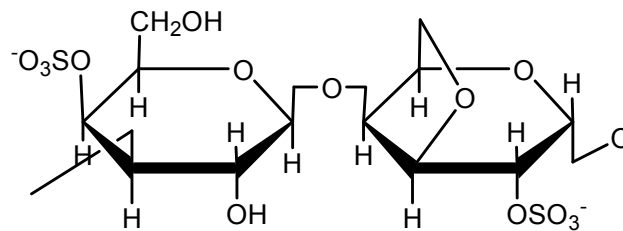


Figure 102: Motif structural du  $\iota$ -carraghénane.

- Les alginates, copolymère anionique linéaire d'acide  $\beta$ -D-mannuronique et d'acide  $\alpha$ -L-guluronique liés en 1→4 produit par les macroalgues brunes (Figure 103),
- Le polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*, hétéropolysaccharide anionique sulfaté.

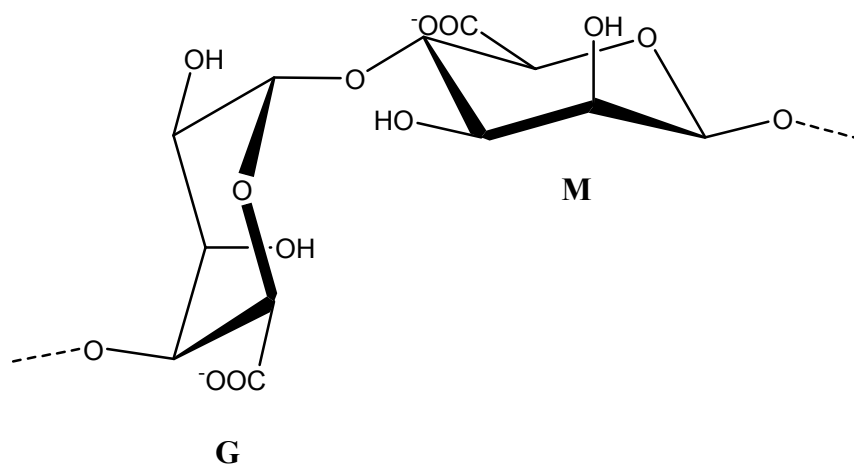


Figure 103: Motif structural de l'alginate. G= acide  $\alpha$ -L-guluronique; M= acide  $\beta$ -D-mannuronique.

Placé dans des conditions expérimentales équivalentes (nombre d'équivalents de chlorure d'acide laurique, de DMAP, température, temps) aucun film plastique ne peut être obtenu à partir de ces phycocolloïdes. Pour chacun de ces polymères et quelque soit les conditions employées. Le produit de la réaction est recueilli sous la forme d'une huile. Analysées par spectroscopie IR, chacune de ces huiles présente une bande intense à  $1740\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la fonction ester ainsi que l'apparition de bandes caractéristiques des bandes alkyles vers  $2920\text{ cm}^{-1}$  (Figure 104).

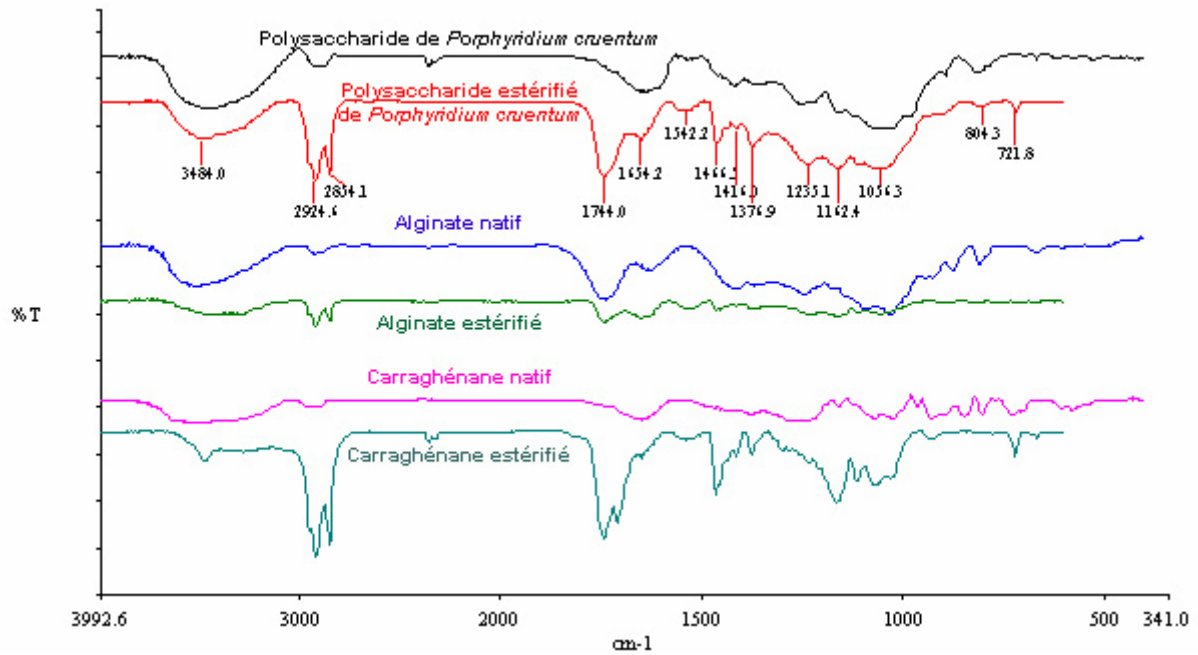


Figure 104: Spectres IR de phycocolloïdes natifs et estérifiés.

Il nous faut donc admettre que les polysaccharides ont bien été estérifiés mais que leur caractère acide, lié à la présence parfois importante de fonctions carboxyliques ou sulfates, conduit à chaud une dépolymérisation complète. Un tel comportement a déjà été observé au laboratoire sur les phytopolysaccharides de la famille des pectines (résultats non publiés).

### **III. Conclusion**

L'objet de cette étude était de démontrer que les phycocolloïdes, polysaccharides produits par les algues, pouvaient être valorisés et servir de support chimique à l'estérification en phase homogène par le chlorure d'acide laurique. Nos résultats dans ce domaine prouvent qu'il est possible d'obtenir, à partir de polymères neutres tels que l'agar, des matériaux plastiques hydrophobes potentiellement biodégradables. En raison de leur caractère polyanionique, les phycocolloïdes acides (carraghénanes, alginate, polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*) ont été écartés de notre étude, l'estérification conduisant en effet à leur dépolymérisation complète.

L'application d'un plan d'expérience a notamment permis d'isoler les paramètres les plus importants mais surtout d'évaluer les effets des facteurs sur les grandeurs mesurées dans un domaine expérimental donné. Nous avons montré que la réaction d'estérification de l'agar suit une cinétique rapide en présence de DMAP avec l'obtention de polymères totalement substitués. Par contre, le rendement massique des esters formés, malgré un DS toujours optimal, est très dépendant des conditions opératoires. L'étude de l'évolution du gain de poids est donc devenue déterminante. Elle traduit la fragilité du polymère face aux conditions opératoires. En protégeant les polysaccharides de l'hydrolyse, le DMAP est donc apparu comme un facteur clé pour l'obtention de films plastiques. Nous avons également corrélié la valeur de gain de poids au DP des polymères dont nous avons démontré l'importance sur les propriétés mécaniques des matériaux. La détermination de grandeurs caractéristiques comme la température de transition vitreuse, le module d'Young, l'élongation et la contrainte à la rupture ont permis de mieux délimiter les propriétés d'une nouvelle catégorie de matériaux. Enfin, l'étude de la modélisation, dans un domaine donné de la réaction, nous permet d'envisager la synthèse de matériaux qui répondraient à un cahier des charges précis.

La poursuite de cette étude passe par la définition de conditions méthodologiques d'estérification plus douces (choix de la base) qui limiteraient la dégradation des polysaccharides, notamment les polysaccharides acides. Les modifications des conditions opératoires, comme l'ajout de plastifiant (glycérol), pourraient enfin être envisagées et devraient nous permettre d'améliorer les caractéristiques thermomécaniques ou les propriétés de biodégradation des matériaux recueillis.

# Conclusion générale





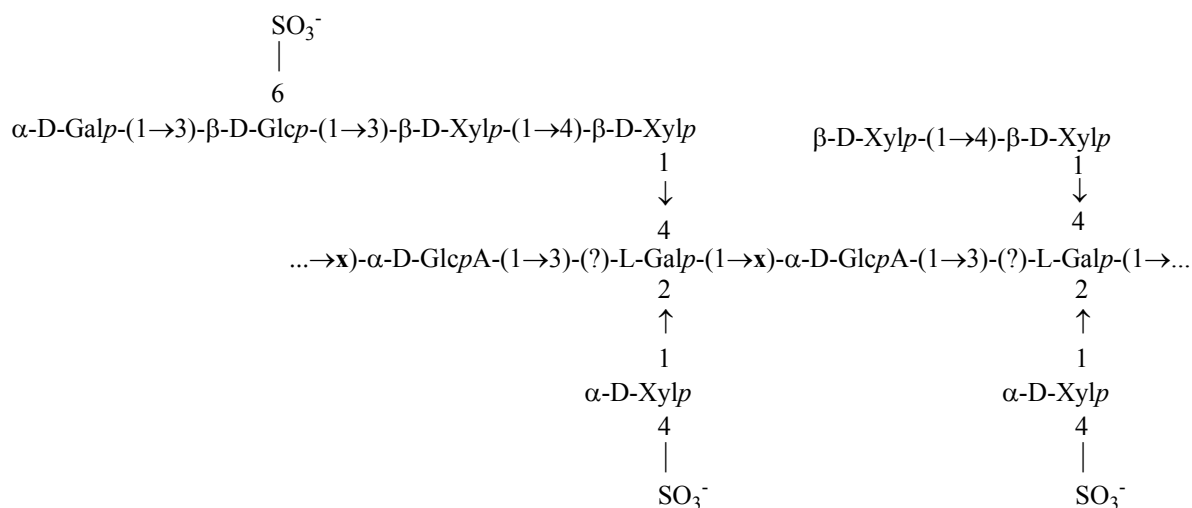
# Conclusion Générale

---

Le travail présenté dans ce mémoire apporte d'un part, des données concernant la structure des polysaccharides d'algues rouges et, d'autre part, propose une nouvelle voie de valorisation chimique des colloïdes produits par ces dernières. A la fois fondamentale et finalisée, notre étude prend appui sur deux objectifs complémentaires :

- établir l'état des lieux bibliographique relatif à la structure du polysaccharide sécrété par *Porphyridium cruentum* et mettre en œuvre une méthodologie d'analyse adaptée qui permettrait d'en préciser la structure et,
- obtenir par greffage chimique des colloïdes d'algues rouges une nouvelle famille de bioplastiques dont les propriétés mécaniques sont contrôlées.

Dans une première partie, après avoir défini le protocole d'extraction et de purification du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*, nous avons décrit la méthodologie d'analyse chimique développée afin d'en préciser la structure. Tout en préservant l'intégrité chimique du polysaccharide, ce protocole présente également l'avantage d'être sélectif des polysaccharides anioniques. De structure trop complexe pour être directement analysée sous sa forme native, le polysaccharide a été fragmenté par voie chimique faute d'enzymes spécifiques. Parmi les méthodes disponibles, l'autohydrolyse, non sélective, et la dégradation au lithium sélective des liaisons uronosidyles ont été employées avec succès et ont permis la libération d'oligosaccharides qui, après avoir été séparés et purifiés par chromatographie liquide, ont été analysés par spectrométrie de masse et spectroscopie RMN. La synthèse des données expérimentales, souvent convergentes, suggère que le motif de répétition du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum* repose sur la structure dodécasaccharidique suivante :



Ce dernier modèle devra toutefois être validé par des analyses complémentaires.

Nôtre travail démontre, en outre, l'extraordinaire diversité de la composition et des structures des phycocolloïdes qui sont associées à des fonctions biologiques variées (régulation mécanique, ionique, hydrique). Reposant d'abord sur des critères morphologiques et physiologiques, la classification des algues a considérablement évoluée au fil des années offrant toujours davantage d'importances aux critères biochimiques, parmi lesquels la composition pigmentaire et la nature des structures polysaccharidiques sécrétées. C'est ce que Tseng<sup>163</sup> définie dès 1945 par le terme de chimiotaaxonomie. Nous avons souhaité illustrer un tel concept en entamant l'étude comparée des structures des polysaccharides extracellulaires sécrétés par *Porphyridium cruentum* et *Rhodella reticulata*, deux microalgues rouges voisines. Les résultats obtenus sont encourageant et confirment la grande variabilité des structures synthétisées par ces deux microalgues très proches. Trop préliminaires, ces dernières devront être complétées par une étude structurale plus approfondie qui devra couvrir un panel plus important de microalgues rouges.

Notre étude s'inscrit aussi dans une perspective de valorisation chimique des phycocolloïdes et, de façon globale, des polysaccharides produits par les plantes. Nous avons souhaité démontrer que les colloïdes d'algues pouvaient venir se substituer aux hémicelluloses et à la cellulose classiquement utilisées comme substrat pour la synthèse de matériaux plastiques hydrophobes après estérification par des acides gras. Les colloïdes d'algues

présentent l'avantage d'être facilement extrait à l'eau; les hémicelluloses nécessitant un traitement alcalin et la cellulose une dégradation oxydative préalable de la lignocellulose. Après avoir démontré qu'un colloïde neutre tel que l'agar pouvait être converti en matériaux plastiques, nous avons optimisé les conditions expérimentales qui conduisent à son obtention. Cette étape, comme toutes les phases d'optimisation d'un procédé complexe, nécessite la compréhension des mécanismes physicochimiques mis en jeu lors de la réaction. La méthodologie du plan d'expérience et l'analyse statistique des données expérimentales nous ont permis de modéliser l'influence de chacun des paramètres sur les grandeurs caractéristiques des propriétés des matériaux et ainsi définir les conditions optimales pour l'obtention de matériaux aux propriétés mécaniques contrôlées. La présence du DMAP, à la fois base et activant de la réaction, apparaît comme indispensable pour obtenir des matériaux dont les propriétés mécaniques se situent, selon les conditions expérimentales, au niveau des acétates de cellulose et du polyéthylène basse densité. Toutefois, il semble que le caractère polyanionique des colloïdes soit un frein à la réaction d'acylation en induisant une hydrolyse partielle ou complète des polysaccharides au cours de l'activation thermique. Cet aspect de notre démarche doit être complété afin de proposer de nouvelles conditions opératoires qui permettraient de recourir à l'utilisation du polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum*, des alginates, des carraghénanes et pourquoi pas des pectines extraits des végétaux supérieurs.

Notre étude, située dans le large domaine de la chimie bioorganique végétale apporte des données supplémentaires sur la structure et la valorisation chimique des polysaccharides extracellulaires d'algues rouges. Sur le plan fondamental, si la séquence méthodologique employée semble adaptée à l'étude des polysaccharides polyanioniques, une phase de séparation chromatographique systématique des oligosaccharides recueillis doit être envisagée. L'analyse par spectrométrie de masse et spectroscopie RMN de chacune des structures isolées devrait venir compléter et préciser le modèle structural théorique proposé pour le polysaccharide de *Porphyridium cruentum*. Enfin, la stratégie d'analyse structurale développée dans notre étude doit pouvoir être transposée à d'autres polysaccharides de la famille des algues rouges dans le but d'apprécier à quel point les caractéristiques structurales de ces derniers peuvent constituer un élément taxonomique fiable.

Sur le plan appliqué, si notre étude souligne l'importance du couple structure-réactivité chimique dans un processus de transformation et de valorisation, elle doit pouvoir être complétée dans deux directions :

- les propriétés physicochimiques des biomatériaux (tests de biodégradabilité, de toxicité et de photosensibilité) et,
- la faisabilité d'un transfert de technologies du procédé à une échelle semi pilote. Une telle perspective devra s'appuyer sur des travaux en cours au laboratoire qui visent à limiter le recours à l'utilisation de solvants organiques et tendre vers l'acétylation des polysaccharides en phase hétérogène.

Pour conclure, ce travail, tout en complétant les structures déjà connues pour les colloïdes d'algues rouges, apporte une solution supplémentaire originale à la valorisation chimique des phycopolysaccharides. Le développement de ce projet nécessite une approche pluridisciplinaire qui prend appui sur la chimie des substances naturelles végétales à l'interface de la chimie des phycocolloïdes et de la chimie des matériaux.

# Matériels et méthodes



# Matériels et Méthodes

---

## **I. Matériel et procédures analytiques**

### **1. Analyses**

#### ***1.1. Spectroscopie infrarouge***

Les spectres infrarouge ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 1310 à transformée de Fourier piloté par ordinateur pour une gamme de fréquences comprises entre 400 et 4 000  $\text{cm}^{-1}$ . Les échantillons sont déposés sur pastilles de KBr. Les nombres d'ondes sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ .

#### ***1.2. Spectroscopie UV Visible***

Les mesures ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible à double faisceau Perkin Elmer Lambda 25 piloté par le logiciel UVWinlab. Elles ont été effectuées dans des cellules en copolymère acrylique (PMMA) de 1 cm de trajet optique.

#### ***1.3. Spectroscopie RMN***

##### ***1.3.a. Appareillage utilisé pour l'analyse des oligosaccharides***

Les oligosaccharides obtenus ont été analysés par RMN homo- et hétéronucléaire au laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR 8576 CNRS) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

L'analyse des oligosaccharides repose sur l'utilisation de différentes techniques.

##### *i. COSY homonucléaire $^1\text{H}/^1\text{H}$ :*

Le COSY permet d'obtenir des informations importantes. Cette technique permet de corréler des protons qui sont couplés scalairement. En d'autres termes, elle permet de

transférer la magnétisation d'un proton sur le proton voisin et donc de visualiser les constantes de couplage J entre les protons.

*ii. COSY hétéronucléaire :*

**HMQC** : Heteronuclear MultiQuantum Coherence. Cette méthode permet de corréler chaque proton avec le carbone sur lequel il est attaché.

**HMBC** : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation. Cette méthode permet d'obtenir des corrélations de couplage  $^3J$  entre un proton et le carbone voisin. Les informations obtenues permettent de déterminer la séquence d'oligosaccharide. Les couplages  $^3J$  permettent de corréler les noyaux distants de trois liaisons covalentes.

**ROESY** : Roating Frame Overhauser Effect Spectroscopy. Cette technique permet de visualiser les corrélations dipolaires proton-proton entre deux voisins proches d'au plus 5 Å.

Les analyses RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker ASX 400-US NB. Les échantillons ont été échangés par D<sub>2</sub>O grâce à trois lyophilisations successives. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au 4,4'-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate de sodium, mais ont été en réalité mesurés par rapport à un standard interne d'acétone ( $\delta^1\text{H} = 2,225$  et  $\delta^{13}\text{C} = 31,55$  dans D<sub>2</sub>O à 27°C).

Les spectres de corrélation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, COSY relayé, TOCSY et ROESY, ainsi que les spectres hétéronucléaires  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC) ont été réalisés avec les séquences d'impulsion standard de la librairie Bruker. Pour les expériences ROESY, les temps de mélange étaient de 400 ms.

***1.3.b. Appareillage utilisé pour la caractérisation des esters synthétisés***

Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Bruker DPX-400 à une fréquence de 400,13 MHz au service commun de RMN de l'Université de Limoges. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm ; le tétraméthylsilane étant pris comme référence interne ( $\delta = 0$  ppm).

**1.4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

Les spectres de masse MALDI-TOF des oligosaccharides ont été réalisés au laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR 8576 CNRS) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre Vision



2000 Finnigan Instrument dont le laser émet dans l'UV à 337 nm pour désorber et ioniser un mélange de matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique. Dans le cas des oligosaccharides, la matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque.

## **1.5. Chromatographie**

### ***1.5.a. Chromatographie sur couche mince***

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. Dans le cas des oligosaccharides, une double migration est réalisée dans le système de solvants ternaire (butanol, acide acétique, eau ; 2/1/1). Après évaporation de l'éluant, les plaques sont pulvérisées par une solution d'orcinol sulfurique (0,1 % d'orcinol dans de l'acide sulfurique à 20 %). Elles sont enfin placées, pour être révélées 10 minutes à l'étuve à 100°C.

### ***1.5.b. Chromatographie en phase gazeuse***

Deux systèmes chromatographiques ont été employés en fonction du type d'échantillons à analyser.

Un système Perichrom PR-2100 a été utilisé pour l'analyse des méthylglycosides triméthylsilylés. Il est équipé d'une colonne capillaire CP-SIL-5CB (Chrompack ; L = 50 m,  $\text{Ø}_{\text{int}} = 0,32$  mm ; phase : diméthylpolysiloxane) 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 et du détecteur est fixée à 260°C. Le chromatographe est piloté par ordinateur et les chromatogrammes traités par le logiciel Winilab v.3 de Perichrom.

Le chromatographe Perkin Elmer Autosystem équipé d'un injecteur de type Split-Splitless, d'une colonne capillaire PE-225 (PE ; L = 30 m,  $\text{Ø}_{\text{int}} = 0,32$  mm ; phase : (50% cyanopropylphenyl)-méthylpolysiloxane) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) a été employé pour le dosage du 3,6-anhydrogalactose. Les données de détection ont été traitées par ordinateur (logiciel Turbochrom). La température de l'injecteur et du détecteur est fixée à 250°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur sous pression constante de 25 PSI. L'acquisition est réalisée en mode isocratique à 210°C. Les données de détection sont traitées par ordinateur sous le logiciel Turbochrom.

## 2. Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et des solvants utilisés est présenté dans le tableau suivant :

Réactifs	CAS [Reg. Num.]	Pureté	Fournisseur
1-méthyl-imidazole	[616-47-7]		Acros
Acétate d'éthyle	[141-78-6]		SDS
Acétonitrile	[75-05-08]	HPLC	SDS
Acide acétique	[64-19-7]	99-100 %	Fisher Labosi
Acide chlorhydrique	[7647-01-1]	37 %	Fisher Labosi
Acide perchlorique	[7601-90-3]		Acros
Acide sulfurique	[7664-93-9]	95-98 %	Acros
Acide trichloroacétique	[76-03-9]		Acros
Acide trifluoroacétique	[76-05-1]	99 %	Acros
Anhydride acétique	[32-010-2]	99 %	Aldrich
BaCl <sub>2</sub>	[10326-27-9]		Aldrich
BSTFA			Alltech
Butanol	[71-36-3]		Acros
Chlorure d'acétyle	[75-36-5]	98 %	Acros
Chlorure d'acide laurique	[112-16-3]	98 %	Acros
CTAB	[57-09-0]	99 %	Acros
DMAP	[1122-58-3]	99%	Acros
DMSO	[67-68-5]	99,7 %	Acros
Ethylène diamine	[107-15-3]	99 %	Acros
Formiate d'ammonium	[540-69-2]		Sigma
Gélatine	[0143-15]		Difco
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	[7778-80-5]		Acros
MeOH	[67-56-1]	99,9 %	Fisher
Méthyl morpholine borane	[15648-16-5]		Aldrich
MHDP	[580-51-8]	90 %	Aldrich
NaBH <sub>4</sub>	[16940-66-2]		Acros
NaOH	[1310-73-2]	p.a.	Acros
Phénol	[108-95-2]	99 %	Sigma
Pyridine	[110-86-1]	99,8 %	Aldrich
Toluène	[108-88-3]		SDS

Les solvants techniques utilisés, acétone (Elvetec, 99 %), éthanol (Elvetec, 99,9 %), chloroforme (SDS, 99,9 %), DMA (Aldrich, 99 %) ont été utilisés sans purification supplémentaire.

## **II. Matériels biologiques**

*Porphyridium cruentum* a été obtenue au Centre d'Etudes Atomiques de Cadarache (France) où des cultures pilotes en photobioréacteur tubulaire étaient entretenues.

*Rhodella reticulata* a été cultivée en photobioréacteur au Laboratoire de Biochimie et de Biotechnologies Marines de l'Université Ibn Tofail de Kénitra (Maroc).

Ces souches ont, après leur récolte, été rincées à l'eau distillée, lyophilisées, broyées et conservées au dessiccateur avant utilisation.

Les phycocolloïdes utilisées pour les essais de valorisation sont d'origine commerciale. L'agar extrait de *Gelidium*, le ι-carraghénane et l'alginate sont obtenus auprès des sociétés Difco sous la référence Bacto Agar (Réf. 214010), Fluka [9062-07-1] et Aldrich [9005-32-7], respectivement.

## **III. Méthodologie d'extraction et de purification des polysaccharides**

Le schéma d'extraction séquentielle et sélective des polysaccharides extracellulaires produits respectivement par *Porphyridium cruentum* et *Rhodella reticulata* est présenté Figure 38. Il se décompose en 3 étapes principales :

- Une étape de dépigmentation,
- Une phase d'extraction des polysaccharides à l'eau chaude,
- Une étape de purification des polysaccharides.

### **1. Dépigmentation**

La dépigmentation est effectuée préalablement sur 5 g de matière sèche placée durant 12 h sous agitation dans 150 mL d'acétone. Le mélange est filtré sur verre fritté de porosité 3 puis rincé par de l'éthanol absolu jusqu'à disparition de la couleur verte qui traduit l'élimination des chlorophylles. Le résidu est ensuite dépigmenté par 200 mL d'éthanol

absolu bouillant pendant 1 h. Cette étape est répétée 2 fois et, entre chaque étape de dépigmentation, le mélange est filtré et rincé par de l'éthanol absolu jusqu'à disparition de la coloration. Le résidu ainsi obtenu est séché à l'étuve (50°C) pendant 12 h puis pesé.

## **2. Extraction**

L'extraction proprement dite du polysaccharide extracellulaire est effectuée à l'eau chaude. En présence de 300 mL d'eau distillée, le résidu dépigmenté est porté à reflux du solvant pendant 1 h. La solution est ensuite centrifugée 30 min à 2500 tr.min<sup>-1</sup> afin de séparer le culot cellulaire (ou phase polysaccharidique fibrillaire) du surnageant renfermant la phase polysaccharidique matricielle. Cette séquence est répétée deux fois ; les surnageants rassemblés et filtrés sur papier Whatman 41 afin d'éliminer d'éventuels débris cellulaires. Le culot cellulaire est lyophilisé puis pesé.

## **3. Purification**

La phase polysaccharidique matricielle est concentrée sous vide puis précipitée sélectivement par l'ajout d'un volume d'une solution de bromure d'hexadecyltriméthylammonium (CTAB) à 3 %. Les polysaccharides anioniques ainsi précipités sont purifiés par 4 cycles successifs de solubilisation dans des solutions de NaCl de concentrations décroissantes (1 M à 0,5 M), suivis de précipitations par 3 volumes d'éthanol absolu. Le polysaccharide extracellulaire ainsi purifié est enfin dissous dans l'eau distillée, filtré, dialysé contre de l'eau distillée (Spectrapor 6-8 000 Da) puis lyophilisé.

# **IV. Caractérisation chimique des polysaccharides extracellulaires**

## **1. Composition centésimale**

L'appréciation de la quantité en oses neutres et en acides uroniques présents dans le polysaccharide extracellulaire de *Porphyridium cruentum* et *Rhodella reticulata* repose sur 2 dosages complémentaires :

- le dosage des sucres totaux par la méthode de Dubois (1956)<sup>102</sup>,
- le dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973)<sup>103</sup>.

### **1.1. Dosage des sucres totaux**

Les solutions de polysaccharide à doser, de concentrations comprises entre 5 et 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ainsi que des solutions de glucose et d'acide glucuronique constitutives de la gamme étalon sont préparées simultanément. A 200  $\mu\text{L}$  des solutions à doser ou de gamme étalon, on ajoute 200  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de phénol à 5 %. Le mélange est homogénéisé au vortex et 1mL d'acide sulfurique concentré est rapidement introduit à la pipette dans le milieu réactionnel. Après homogénéisation au vortex, le mélange est porté au bain-marie à 100°C durant 5 minutes. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace et placés 30 minutes à l'obscurité. Les densités optiques sont par la suite mesurées à 492 nm sur un spectrophotomètre UV-visible.

### **1.2. Dosage des acides uroniques**

Les solutions de polysaccharide à doser sont préparées simultanément avec une gamme étalon composée de solutions d'acide glucuronique à 25, 50 et 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et de glucose à 50, 100, 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A 200  $\mu\text{L}$  des solutions à doser, on ajoute 1,2 mL d'une solution de tétraborate de sodium à 0,0125 M dans de l'acide sulfurique concentré. Le mélange est homogénéisé au vortex puis refroidi dans de la glace. Les tubes sont ensuite portés à 100°C au bain-marie durant 5 minutes. Les tubes sont refroidis dans un bain de glace puis on ajoute 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de MHDP (*mé*ta-hydroxydiphényle) à 0,15 % dans NaOH 0,5 %. Les tubes sont homogénéisés au vortex, une coloration rose apparaît. Les densités optiques sont par la suite mesurées à 520 nm.

Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques des solutions polysaccharidique sont obtenues en utilisant la méthode de calcul décrite par Montreuil et Spik (1986) <sup>104</sup> qui permet d'éliminer les interférences des acides uroniques dans le dosage des oses neutres et réciproquement (Annexe I).

## **2. Détermination du taux de sulfates par turbidimétrie**

La détermination du taux de sulfate est effectuée par turbidimétrie selon la méthode développée par Dodgson et *al.* (1962).<sup>114</sup> La gamme étalon réalisée lors de ce dosage nécessite la préparation préalable de solutions de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  de concentration en  $\text{SO}_4^{2-}$  comprises

entre 50 et 1200 µg/mL. A 0,2 mL de solution à doser sont ajoutés 3,8 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 3 % (M/V) et 1 mL d'une solution de gélatine-BaCl<sub>2</sub> à 0,5 % (M/M/V). Le précipité de BaSO<sub>4</sub> ainsi formé est stabilisé dans de la gélatine et la turbidité de la solution est mesurée à 360 nm par rapport à un blanc approprié.

Dix milligrammes de polysaccharides lyophilisés sont hydrolysés par 0,5 mL d'une solution de HCl 2 M pendant 12 h à 110°C. L'hydrolysate est alors filtré et fractionné en deux. Au premier échantillon sont ajoutés 3,8 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 3 % (M/V) et 1 mL d'une solution de gélatine-BaCl<sub>2</sub> à 0,5 % (M/M/V). Le mélange est ensuite homogénéisé au vortex et la turbidité de la solution est mesurée à 360 nm contre un blanc approprié. Au second échantillon sont ajoutés 3,8 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 3 % (M/V) et 1 mL d'une solution de gélatine à 0,5 % (M/V). De la même façon, le mélange est homogénéisé puis la densité optique est mesurée à 360 nm contre un blanc approprié. Cette seconde mesure permet de soustraire la contribution non spécifique de tout autre matériel que le BaSO<sub>4</sub> d'absorber.

### **3. Identification et dosage des monosaccharides par CPG**

#### ***3.1. Méthode des méthylglycosides O-triméthylsilylés***

##### ***3.1.a. Méthanolyse***

Les monosaccharides sont libérés sous forme de méthylglycosides par ajout de 1 mL d'une solution de chlorure d'acétyle 1 M dans du méthanol anhydre (Instant methanolic HCl ; Alltech Réf. 18053) sur 100 µg d'un échantillon polysaccharidique anhydre contenant 10 µg d'un étalon interne, le méso-inositol (MI). La méthanolyse est stoppée après 24 h de réaction à 80°C par évaporation du méthanol chlorhydrique sous un flux d'argon.

##### ***3.1.b. Triméthylsilylation***

Les méthylglycosides sont triméthylsilylés pendant 2 h à température ambiante par 80 µL d'un mélange V/V pyridine/BSTFA (*N,O*-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide) à 1 % de triméthylchlorosilane (TMCS).

##### ***3.1.c. Analyses des dérivés méthylglycosides O-triméthylsilylés par CPG***

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont ensuite identifiés et dosés par CPG sur un chromatographe Perichrom PR-2100 en comparaison avec des échantillons témoins.

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 palier de 5 min à 190°C, puis de 210 à 260°C à raison de 5°C.min<sup>-1</sup>. Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics chromatographiques par des facteurs de correction.

Cette analyse, qui a été adaptée à l'analyse de poudres d'origine végétale par Marga et *al.* (1995)<sup>195</sup>, a été également utilisée pour l'étude de la composition monosaccharidique des broyats d'algues et résidus d'extraction. Dans ce cas, la méthanolyse est suivie d'une étape de délipidation par trois lavages successifs à l'heptane.

### **3.2. Dosage du 3,6-anhydrogalactose**

Le principe de cette méthode développée par Stevenson et *al.* (1991)<sup>187</sup> repose sur la réduction des monosaccharides par du méthyle morpholine borane (MMB) au fur et à mesure de l'hydrolyse du polymère par de l'acide trifluoroacétique. Ceci permet d'éviter, lors de l'hydrolyse, la dégradation du pont 3,6-anhydrogalactose.

#### **3.2.a. Hydrolyse réductive**

L'hydrolyse réductive de 1 mg de polysaccharide anhydre est réalisée par l'ajout de 0,05 mL de MMB à 8 % (M/V) et 0,1 mL d'acide trifluoroacétique 6 M pendant 30 min à 80°C. L'échantillon est refroidi puis 0,05 mL de MMB est ajouté. L'échantillon est ensuite évaporé à sec, repris dans 0,1 mL d'eau et hydrolysé une seconde fois par 0,1 mL d'acide trifluoroacétique 4 M. Après 1 h à 120°C, on ajoute 0,1 mL de MMB et l'échantillon, séché sous un flux d'azote, est repris dans 0,5 mL d'acétonitrile. L'échantillon est à nouveau évaporé à sec afin d'éliminer toute trace d'eau.

#### **3.2.b. Acétylation**

L'acétylation est réalisée par l'ajout de 0,5 mL d'acétate d'éthyle, 1,5 mL d'anhydride acétique et 0,05 mL d'acide perchlorique à 70 %. Après homogénéisation au vortex, la solution est mise à réagir 10 min aux ultrasons puis 15 min à température ambiante. Cinq millilitres d'eau distillée et 0,05 mL de 1-méthyl-imidazole sont ensuite ajoutés et la solution est abandonnée 10 min à température ambiante. Deux millilitres de dichlorométhane sont ajoutés puis la phase organique est lavée 3 fois avec 5 mL d'eau distillée.

### ***3.2.c. Analyse par CPG***

Les acétates alditols sont ensuite identifiés et dosés par CPG sur un système Perkin Elmer Autosystem en comparaisons avec des échantillons témoins. L'acquisition est réalisée en mode isocratique à 210°C et les données de détection sont traitées par ordinateur sous le logiciel Turbochrom.

## **V. Méthodes d'analyses des polysaccharides**

### **1. Hydrolyse acide ménagée**

#### ***1.1. Protocole***

Un suivi de la cinétique d'hydrolyse a été réalisé sur les polysaccharides extracellulaires afin de déterminer le temps d'hydrolyse optimal conduisant à la libération d'oligosaccharides. Pour cela, 1 mg de polysaccharide est introduit dans un tube à solvolysé ainsi que 1 mL d'acide (HCl 0,5 M ou CF<sub>3</sub>COOH 0,05 M). Le tube est placé à l'étuve à 100°C. Pour des temps variables compris entre 0 et 120 minutes, 10 µL d'hydrolysats sont déposés sur plaques CCM. Après une double migration dans le système de solvant butanol, acide acétique, eau (2/1/1), les plaques sont révélées (pulvérisation d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 20 % à 0,1 % d'orcinol puis 10 min de chauffage à l'étuve à 110°C).

A des fins d'analyse structurale, l'hydrolyse a été renouvelée sur 100 mg de polysaccharide dispersés dans 10 mL d'acide à 100°C. Après refroidissement, l'hydrolysats est neutralisé par une solution de soude à 2 M. La fraction macromoléculaire non dégradée est précipitée par l'ajout de 3 volumes d'éthanol. Après filtration, l'hydrolysats est concentré par évaporation sous vide.

#### ***1.2. Séparation des oligosaccharides***

Les produits d'hydrolyse ont été séparés et purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur colonnes de gels de polyacrylamide (BioGel P-2, P-4 ou P-6 ; Biorad ; colonne : Ø 2,5 cm × 70 cm) équilibrés dans le système d'élution (H<sub>2</sub>O) sous un débit constant de 10 mL.h<sup>-1</sup> assuré par une pompe péristaltique (Pump P-1 ; Amersham Biosciences). Les fractions oligosaccharidiques sont recueillies en sortie de colonne à l'aide d'un collecteur (Redifrac ; Pharmacia-Biotech.) et contrôlées par CCM.



## **2. Auto Hydrolyse**

### **2.1. Protocole**

Le protocole utilisé a été adapté de Cescutti et *al.* (1999) <sup>196</sup> pour l'analyse d'un exopolysaccharide acide. Une solution aqueuse de polysaccharide à 1 mg.mL<sup>-1</sup> est convertie en sa forme acide par passage sur résine Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>). Cette solution est alors placée à l'étuve à 110°C durant des temps variables dépendants de la résistance du polysaccharide à l'hydrolyse. Après refroidissement, la fraction polymérique pas ou peu hydrolysée est précipitée par 3 volumes d'éthanol absolu et éliminée par filtration. L'hydrolysate constitué d'oligosaccharides est concentré par évaporation sous vide.

### **2.2. Séparation des oligosaccharides**

Les produits d'hydrolyse ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne de résine basique Dowex 1×2 sous forme Cl<sup>-</sup> (mesh 200-400 ; Fluka ; colonne : Ø 1 cm × 50 cm). Un gradient d'élution linéaire de formiate d'ammonium de 0,05 M à 0,5 M a été appliqué pour séparer les oligosaccharides selon leur charge. La purification des fractions homogènes se poursuit ensuite sur une colonne de Biogel P-2 (100-1800 Da ; Biorad ; colonne : Ø 2,5 cm × 70 cm) équilibrée dans l'eau sous un débit de 10 mL.h<sup>-1</sup>. Les fractions oligosaccharidiques sont recueillies en sortie de colonne à l'aide d'un collecteur (Redifrac ; Pharmacia-Biotech.) et contrôlées par CCM (éluant : butanol, acide acétique, eau ; 2/1/1) après révélation par pulvérisation d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 % à 0,1 % d'orcinol et passage à l'étuve à 110°C.

## **3. Acétolyse**

L'acétolyse conduit à la rupture sélective des liaisons glycosidiques du polysaccharide préalablement acétylé. Dix milligrammes de polysaccharide sont dissous dans 1 mL d'une solution à acétolyse composée d'anhydride acétique, acide acétique et acide sulfurique (10/10/1 ; V/V/V). Après 3 h à 40°C, on ajoute 1 mL de pyridine afin de stopper la réaction. La solution est concentrée sous vide par coévaporation des solvants avec du toluène puis on procède à une déacétylation par un excès de méthanolate de sodium à 0.01 M. La solution est ensuite neutralisée sur résine H<sup>+</sup> (Dowex, 50×8) puis concentrée sous vide. L'hydrolysate est

contrôlé par CCM (éluant : butanol, acide acétique, eau ; 2/1/1) après révélation par pulvérisation d'une solution d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 20 % à 0,1 % d'orcinol et passage à l'étuve à 110°C.

## **4. Dégradation au Lithium**

### **4.1. Protocole**

Le protocole utilisé a été adapté de celui de Mort et Bauer (1982).<sup>118</sup> Vingt milligrammes de polysaccharide sont lyophilisés en présence d'un barreau magnétique dans un tube de 15 mm de diamètre équipé d'un bouchon en bakélite muni d'une pastille téflon. Le polymère anhydre est ensuite dispersé dans 3 mL d'éthylène diamine pendant 2 heures sous agitation magnétique. La dégradation est effectuée par addition d'un morceau de lithium et le mélange est maintenu sous agitation magnétique. Une coloration bleue se développe alors. L'ajout de lithium est nécessaire pour conserver cette coloration. La réaction est maintenue durant une période de 3 heures. Ces manipulations se font sous atmosphère d'argon et en l'absence de composés protoniques qui limitent la réaction en détruisant le lithium. En effet, en présence de traces d'eau, on observe la formation d'un anneau blanc d'hydroxyde de lithium.

Après congélation de l'échantillon, la réaction est stoppée par addition de 5 mL d'eau. Les produits sont transférés dans un ballon rond de 100 mL et l'éthylène diamine est éliminé par co-distillation en présence de toluène (jusqu'à l'obtention d'un résidu blanc d'hydroxyde de lithium). Après addition d'eau, le pH de la solution est ajusté à 4-5 par de l'acide acétique. Les sels de lithium sont éliminés par chromatographie acide échangeuse d'ions (résine Dowex 50×8, 200-400 mesh, forme  $\text{H}^+$  ; colonne : Ø 1 cm × 50 cm).

### **4.2. Séparation des oligosaccharides**

Les oligosaccharides libérés lors de la dégradation au lithium sont séparés et purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de BioGel P-2 (100-1800 Da ; Biorad ; colonne : Ø 2,5 cm × 70 cm) équilibrée dans l'eau. Les oligosaccharides élués sont détectés par réfractométrie. Ils sont enfin contrôlés par chromatographie sur couche mince de silice (éluant : butanol, acide acétique, eau ; 2/1/1) après révélation par pulvérisation d'une solution de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20 % à 0,1 % d'orcinol et passage à l'étuve à 110°C.

## **5. Dégradation alcaline en milieu réducteur**

### **5.1. Protocole**

Les oligosaccharides alditols sont obtenus après dégradation alcaline en milieu réducteur. Dix milligrammes de polysaccharide sont dissous dans 1 mL d'une solution de NaOH, NaBH<sub>4</sub> 2 M. La solution est portée à 100°C pendant des temps variables puis est refroidit à 0°C. La solution est concentrée et ajusté à un pH de 7,5 avec de l'acide chlorhydrique à 2 M puis concentrée sous vide. Les sels de borate sont éliminés par des co-évaporations successives en présence de méthanol.

### **5.2. Séparation des oligosaccharides**

L'hydrolysate ainsi obtenu est déposé sur colonne de BioGel P-2 (100-1800 Da ; Biorad ; colonne : Ø 2,5 cm × 70 cm) et P-4 (800-4000 Da ; Biorad ; colonne : Ø 2,5 cm × 70 cm). Les oligosaccharides sont élués avec de l'eau distillée sous un débit de 10 mL.h<sup>-1</sup> et collectés.

## **VI. Modification chimique – Synthèse d'esters d'agar**

### **1. Solubilisation des phycocolloïdes dans le DMA**

Cinq grammes de polysaccharide sont dissous dans 100 mL d'eau à 80°C, un volume de DMA est ensuite ajouté et l'échange de solvant est réalisé par évaporation de l'eau à l'évaporateur rotatif. Au cours de l'évaporation, dès que la solution devient visqueuse, un volume de DMA est ajouté et ceci à plusieurs reprises. La concentration finale de la solution est ajusté à 1 g/ 40 mL.

### **2. Synthèse des esters laurique**

L'acylation est réalisée en phase homogène sur 1 g de polysaccharide (40 mL) avec des quantités variables de chlorure d'acide laurique et en présence/ou non d'un équivalent de DMAP par fonction hydroxyle. La synthèse est effectuée pour des températures et des temps variables sous agitation magnétique dans un bicol de 100 mL surmonté d'un réfrigérant. Après la réaction, le bicol est refroidi puis l'ester formé est précipité dans 3 volumes d'eau et 3 volumes d'éthanol. Après filtration, le solide est dissous dans 40 mL de chloroforme puis précipité de nouveau dans 3 volumes d'éthanol. Le précipité est filtré puis séché à l'air libre.

### **3. Mise en forme des films plastiques**

L'ester ainsi formé est dissous dans 40 mL de chloroforme et la solution transférée dans une boîte de Pétri. Le film plastique est obtenu par casting, c'est-à-dire après une évaporation lente du solvant.

### **4. Caractérisation des esters formés**

#### **4.1. Analyse par spectroscopie infrarouge**

L'estérification est mise en évidence par spectroscopie infrarouge. Les spectres Infra-Rouge ont été enregistrés sur un appareil Perkin Elmer Spectrum 1310 à transformée de Fourier, piloté par ordinateur dans une gamme de nombre d'onde compris entre 400 et 4 000  $\text{cm}^{-1}$ . Les échantillons ont été conditionnés en pastilles de KBr.

## 4.2. Calcul du degré de substitution par RMN

Le calcul du degré de substitution a été effectué par utilisation de la RMN-<sup>1</sup>H. Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Bruker DPX-400 à une fréquence de 400,13 MHz au Service commun de RMN de l'Université de Limoges. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm ; le tétraméthylsilane étant pris comme référence interne ( $\delta = 0$  ppm). Les spectres sont enregistrés dans le chloroforme deutérié. Le DS a été calculé selon la méthode décrite en annexe II pour les différents esters d'agar que nous avons synthétisé.

## 5. Tests thermomécaniques

Les tests thermomécaniques ont été réalisés au CRITT matériaux de Rochefort, spécialisé dans la caractérisation des matériaux.

### 5.1. Essais de traction

Les essais de traction ont été réalisés sur des éprouvettes haltères normalisées H3 découpées dans différents films plastiques (Figure 105).

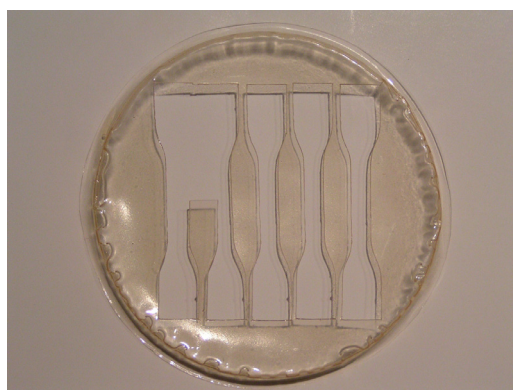


Figure 105: Découpe d'haltères normalisés H3 dans un film plastique.

Les épaisseurs des éprouvettes ont été mesurées en plusieurs points avant d'effectuer, à une température stabilisée autour de 23°C, les tests de traction à 1 mm.min<sup>-1</sup> sur une machine MTS Q Test/25. Trois paramètres caractéristiques ont été relevés : la contrainte à la rupture, la déformation à la rupture et le module d'élasticité.

## **5.2. Analyse thermique différentielle (DSC)**

Les mesures de DSC ont été conduites sur un équipement DSC METTLER programmé de -130 à 300°C avec une montée en température de 10°C/min. Les variations d'énergie, par rapport à une référence (une coupelle vide), ont été mesurées sur 20 mg d'échantillons placés dans une enceinte en aluminium scellée.

# Références bibliographiques





# Références Bibliographiques

---

- 1 Radmer, R.J., Parker, B.C. - Commercial application of algae: opportunities and constraints. *J. Phycol.*, **1994**, 6, 93-98.
- 2 Mc Hugh, D.J. - A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper - T441, FAO Fisheries Department & FAO Regional Fisheries Officers, Rome, Italy, **2003**, pp 118.
- 3 John, D.M. - Biodiversity and conservation: an algal perspective. *The Phycologist*, **1994**, 38, 5-15.
- 4 Muller-Feuga, A. - Microalgues marines, les enjeux de la recherche. *In*: Barbier, G., Baud, J.P., Blancheton, J.P., Durand, P., Gentien, P., Hervé, A., Hussenot, J., Lassus, P., Nicolas, J.L., Robert, R., Robin, J., Roy, P., Samain, J.F., Baudimant, G., Bergé, J.P., Berland, B., Divanach, P., Dubacq, J.P., Lissolo, T., Largeau, C., Robert, J.M. (Eds), Ifremer, Plouzané, France, **1997**, pp 35.
- 5 Miyamoto, K. - Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. *In*: Ado, Y., Asada, Y., Benemann, J.R., Kishimoto, M., Miyake, J., Miyamoto, K., Nishio, N. (Eds), FAO - Agricultural Services Bulletins, FAO, Osaka, Japan, **1997**, 128, pp 97.
- 6 Edgar, K.J., Buchanan, C.M., Debenham, J.S., Rundquist, P.A., Seiler, B.D., Shelton, M.C., Tindall, D. - Advances in celluloses ester performance and application. *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, 26, 1605-1688.
- 7 Moine, C., Gloaguen, V., Gloaguen, J.M., Granet, R., Krausz, P. - Chemical valorization of forest and agricultural by-products. Obtention, chemical characteristics, and mechanical behavior of a novel family of hydrophobic films. *J. Environ. Sci. Health. B*, **2004**, 39, 627-640.
- 8 Reviers, B. - Biologie et phylogénie des algues. Belin, **2002**, 1, pp 351.
- 9 Lamouroux, J.V.F. - Essai sur les genres de la famille des Thalassiphytes non articulées. *In*: Dufour, C. (Eds.), Annales du Muséum d'Histoire naturelle, Paris, **1813**.
- 10 Kützing, F. - Phycologia generalis oder anatomie, physiologie und systemkunde der tange. *In*: Brockhaus, F.A. (Eds.), Leipzig, **1843**, pp 457.
- 11 Jahn, W., Steinbeiss, J., Zetsche, K. - Light intensity adaptation of phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium*. *Planta*, **1984**, 161, 536-539.

- 12 Saffo, M.B. - New light on seaweeds. *BioScience*, **1987**, 37, 654-664.
- 13 Gayral, P., Cosson, J. - Connaitre et reconnaître les algues. Ouest France, Rennes, **1986**, pp 220.
- 14 Greenwood, C.T., Thompson, J. - Physiochemical studies on starch. Physical properties of floridean starch and the characterization of structure-type of branched alpha-1,4-glucans. *J. Chem. Soc.*, **1961**, 1534-1537.
- 15 Banks, W., Greenwood, C.T. - Fractionation of the starch granule and the fine structure of its components. *Starch and its components*, Edinburgh University Press, Edinburgh, **1975**, 5-66.
- 16 Mc Candless, E.L. - The importance of cell wall constituents in algal taxonomy. *In: Irvine, D.E.G., Price, J.H. (Eds), Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae*, Academic Press, London, **1978**, 63-85.
- 17 Mc Neil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., Alberstein, P. - Structure and function of the primary cell walls plants. *Annu. Rev. Biochem.*, **1984**, 53, 625-663.
- 18 Ramus, J. - Cell surface polysaccharides of the red alga *Porphyridium*. *In: Loewus, F. (Eds.), Biogenesis of plant cell wall polysaccharides*, Accademic Press, Yale University, New York, **1973**, 333-359.
- 19 Craigie, J.S. - Cell walls. *In: Cole, K.M., Sheath, R.G. (Eds), Biology of the red algae*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1990**, 221-257.
- 20 Percival, E. - Carbohydrate sulfates. *ACS Symposium Series, In: Schweiger, R.G. (Eds.)*, **1978**, 203-213.
- 21 Yamamoto, M. - Physiochemical studies on sulfated polysaccharides extracted from seaweeds at various temperatures. *Agric. Biol. Chem.*, **1980**, 44, 589-593.
- 22 Rees, D.A. - Some properties of the cell wall mucilage of marine algae. *Brit. Phycol. Bull*, **1962**, 2, 180-181.
- 23 Kloareg, B. - Structure et rôle écophysiological des parois des algues littorales: contribution à la résistance aux variations de salinité. *Physiol. Veg.*, **1981**, 19, 427-441.
- 24 Kloareg, B., Quatrano, R.S. - Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceangr. Mar. Biol. Rev.*, **1988**, 26, 259-315.
- 25 Quillet, M., De Lestang, G. - Action synergique à l'égard de l'eau de certaines associations de polysaccharides dans les parois des Fucales et Gigartinales. *Bull. Soc. Phycol. Fr.*, **1978**, 23, 88-93.
- 26 Rees, D.A., Conway, E. - The structure and biosynthesis of porphyran: a comparison of some samples. *Biochem. J.*, **1962**, 84, 411-416.

- 27 Woelkerling, W. - An Introduction. *In: Cole, K.M., Sheath, R.G. (Eds), Biology of the red algae*, Cambridge University Press, **1990**, 1-6.
- 28 Kraft, G.T. - Rhodophyta: morphology and classification. *In: Lobban, C.S., Wynne, M.J. (Eds), The biology of Seaweeds*, Blackwell Sci. Publ., Oxford, **1981**, 17, 6-51.
- 29 Sheath, R.G. - The biology of freshwater red algae. *Prog. Phycol. Res.*, **1984**, 3, 89-157.
- 30 Chrétiennot-Dinet, M.J. - Atlas du phytoplancton marin. C.N.R.S., Paris, **1990**.
- 31 Littler, M.M., Littler, D.S., Blair, S.M., Norris, J.N. - Deepest known plant life discovered on an uncharted seamount. *Science*, **1985**, 227, 57-59.
- 32 Van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M. - Algae. An introduction to phycology. Cambridge University Press, **1996**, pp 637.
- 33 Perez, R., Kaas, R., Campello, F., Arbault, S., Barbaroux, O. - La culture des algues marines dans le monde. Ifremer, **1992**, pp 614.
- 34 Perez, R. - Ces algues qui nous entourent. Ifremer, **1997**, pp 272.
- 35 Smith, D.B., Cook, W.H. - Fractionation of carragening. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1953**, 45, 232-233.
- 36 Rees, D.A. - Structure conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1969**, 24, 267-332.
- 37 Mc Candless, E.L., Craigie, J.S. - Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Annu. Rev. Biochem.*, **1979**, 30, 41-53.
- 38 Greer, C.W., Yaphe, W. - Characterization of hybrid (beta, kappa, omega) carrageenan from *Euchema gelatinea*. *Bot. Mar.*, **1984**, 27, 473-478.
- 39 Painter, T.J. - Algal polysaccharides. *In: Aspinall, G.O. (Eds.), The Polysaccharides*, Academic Press, New York, **1983**, 2, 195-285.
- 40 Indergaard, M. - The aquatic ressource. *In: Cote, W.A. (Eds.), Biomass utilization*, Plantum Press, New York, **1983**, 137-168.
- 41 Araki, C. - Structure of the agarose constituent of agar-agar. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1956**, 29, 543-544.
- 42 Yaphe, W. - Properties of *Gracilaria* agars. *Hydrobiol.*, **1984**, 116/117, 171-186.
- 43 Tong, H.K., Lee, K.H., Wong, H.A. - The molecular weight and viscosity of the water-soluble polysaccharide(s) from *Euchema spinosum*. *Carbohydr. Res.*, **1980**, 81, 1-6.

- 44 Tong, H.K., Lee, K.H., Wong, H.A. - *Euchema spinosum* polysaccharides having different average molecular weights. *Carbohydr. Res.*, **1981**, 88, 162-166.
- 45 Lahaye, M., Rochas, M., Yaphe, W. - A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers extracted in cell walls *Gracilaria sp.* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Can. J. Bot.*, **1986**, 64, 579-585.
- 46 Usov, A.I., Klochkova, N.G. - Polysaccharides of algae. 45. Polysaccharide composition of red seaweeds from Kamchatka coastal water (north western pacific) studied by reductive hydrolysis of biomass. *Bot. Mar.*, **1992**, 35, 371-378.
- 47 Craigie, J.S., Wen, Z.C. - Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). *Can. J. Bot.*, **1984**, 62, 1665-1670.
- 48 Orosco, C.A., Sawamura, M., Ohno, M., Kusunose, K. - Effects of thallus age and alkali treatment on pyruvic acid contents of agars from the red alga *Gracilaria chorda*. *Nippon Suisan Gakk.*, **1992**, 58, 1493-1498.
- 49 Cote, G.L., Hanisak, M.D. - Production and properties of native agar from *Gracilaria tikvahiae* and other red algae. *Bot. Mar.*, **1986**, 29, 359-356.
- 50 Bird, K.T., Hinson, T.K. - Seasonal variations in agar yields and quality from North Carolina agarophytes. *Bot. Mar.*, **1992**, 35, 291-295.
- 51 Givernaud, T., El Gourji, A., Mouradi-Givernaud, A., Lemoine, Y., Chiadmi, N. - Seasonal variations of growth and agar composition of *Gracilaria multipartita* harvested along the Atlantic coast of Morocco. *Hydrobiol.*, **1999**, 398/399, 167-172.
- 52 Mouradi-Givernaud, A., Hassani, L.A., Givernaud, T., Lemoine, Y., Benharbet, O. - Biology and agar composition of *Gelidium sesquipedale* harvested along the Atlantic coast of Morocco. *Hydrobiol.*, **1999**, 398/399, 391-395.
- 53 Mollet, J.C., Rahaoui, A., Lemoine, Y. - Yield, chemical composition and gel strenght of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria cf. vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *J. Appl. Phycol.*, **1998**, 10, 59-66.
- 54 Araki, C. - Some recent studies on polysaccharides agarophytes. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **1966**, 5, 3-17.
- 55 Duckworth, M., Hong, K.C., Yaphe, W. - The agar polysaccharides of *Gracilaria* species. *Carbohydr. Res.*, **1971**, 19, 1-9.
- 56 Duckworth, M., Yaphe, W. - The strcuture of agar. I. Fractionation of complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, **1971**, 16, 189-197.
- 57 Guiseley, K.B. - The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. *Carbohydr. Res.*, **1970**, 13, 247-256.

- 58 Yaphe, W., Duckworth, M. - The relationship between the structure and biological properties of agars. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **1972**, 7, 15-22.
- 59 Porse, H. - Global seaweed market trends. *Plenary presentation at XVIth International Seaweed Symposium*, Cebu City, Philippines, **1998**, april 12-17.
- 60 Chapman, V.J., Chapman, D.J. - Seaweeds and their uses. *In: Chapman, Hall (Eds)*, London and New York, **1980**, pp 334.
- 61 Armisen, R., Galatas, F. - Production, properties and uses of agar. *In: McHugh, D.J. (Eds.)*, *Production and Utilisation of Products from Commercial Seaweeds*, FAO Technical paper, **1987**, 288, 1-57.
- 62 Callegari, J.P. - Feu vert pour les microalgues. *Biofutur*, **1989**, Fevrier, 25-38.
- 63 Barnier, H., Ferreira Dos Santos, P., Gudin, C., Thepenier, C. - Procédé de production et d'extraction des polysaccharides à partir d'une culture de *Porphyridium cruentum* et dispositif pour la mise en oeuvre du procédé. France, **1988**, Brevet Européen, EP 0311496 A2.
- 64 Glazer, A.N. - Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used of fluorophores. *J. Appl. Phycol.*, **1994**, 6, 105-112.
- 65 Dodet, B. - La chasse aux radicaux libres oxygénés. *Biofutur*, **1991**, 101, 23-34.
- 66 Gudin, C. - An overview of microalgae biotechnology for fine chemicals. *The first International Marine Biotechnology Conference*, Tokyo, Japan, **1989**, 3-6 September.
- 67 Bannister, J.V., W.H., B., Rotilio, G. - Aspect of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Rev. Biochem.*, **1987**, 22, 110-180.
- 68 Reveillaud, I., Niedzwiecki, A., Bensch, K.G., Fleming, J.E. - Expression of bovine superoxide dismutase in drosophila augments resistance to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*, **1991**, 11, 1026-1030.
- 69 Gorecki, M., Beck, Y., Hartman, J.R., Fischer, M., Weiss, L., Tochner, Z., Slavin, S., Nimrod, A. - Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Radic. Res. Commun.*, **1991**, 12-13,
- 70 Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. - Current status of antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.*, **1993**, 15, 77-96.
- 71 Borowitzka, M.A. - Microalgae as sources of essential fatty acids. *Aust. J. Biotechnol.*, **1988**, 1 c, 58-62.
- 72 Cohen, Z., Cohen, S. - Preparation of eicosepentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1991**, 68, 16-19.

- 73 Becker, E.W. - Microalgae biotechnology and microbiology. University Press, Cambridge, **1994**, pp 293.
- 74 Ahern, T.J., Katoh, S., Sada, E. - Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **1983**, 25, 1050-1070.
- 75 Cohen, Z., Norman, H.A., Heimer, Y.M. - Microalgae as a source of omega-3 fatty acids. *In: Simopoulos, A.P. (Eds.), Plants in human nutrition, World Rev. Nutr. Diet.*, **1995**, 77, 1-31.
- 76 Yongmanitchai, W., Ward, O.P. - Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.*, **1989**, 24, 117-124.
- 77 Moore, R.E., Patterson, M.L., Carmichael, W.W. - New pharmaceuticals from cultured blue-green algae. *In: Fautin, D.G. (Eds.), Biomedical Importance of Marine Organism*, California Academy of Science, San Francisco, **1988**, 143-150.
- 78 Kellam, S.J., Walker, J.M. - Antibacterial activity from marine microalgae. *Br. Phycol. J.*, **1989**, 24, 191-194.
- 79 Ucko, M., Cohen, E., Gordin, H., Arad, S.M. - Relationship between the unicellular red alga *Porphyridium sp.* and its predator, the dinoflagellate *Gymnodinium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, **1989**, 55, 2990-2994.
- 80 Benemann, J.R. - Microalgae aquaculture feeds. *J. Appl. Phycol.*, **1992**, 4, 233-245.
- 81 Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., Abalde, J. - Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities. *Aquaculture*, **1984**, 42, 207-215.
- 82 Yamaguchi, K., Ward, O.P. - Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 2963-2967.
- 83 Cohen, Z., Vonshak, A., Richmond, A. - Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J. Phycol.*, **1988**, 24, 328-332.
- 84 Thepenier, C., Gudin, C., Sarrobert, B. - Procédé de production sélective de lipides poly-insaturés à partir d'une culture de micro-algues du type *Porphyridium cruentum*. France, **1993**, Brevet Européen, EP 0554162A1.
- 85 Antia, N.J., Desai, I.D., Romilly, M.J. - The tocopherol, vitamin K, and related isoprenoid quinone composition of an unicellular red alga (*Porphyridium cruentum*). *J. Phycol.*, **1970**, 6, 301-312.
- 86 Gantt, E. - Properties and ultrastructure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiol.*, **1969**, 44, 1629-1638.
- 87 Lüning, K. - Seaweed. Their environment, biogeography, and ecophysiology. *In: Yarish, C., Kirkman, H. (Eds), Wiley, New York, USA, 1990*, pp 572.

- 88 Fabregas, J., Garcia, D., Morales, E., Dominguez, A., Otero, A. - Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. *J. Ferment. Bioeng.*, **1998**, 86, 477-481.
- 89 Thepenier, C., Gudin, C. - Optimal conditions studies for polysaccharides production by *Porphyridium cruentum*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1985**, 1, 257-268.
- 90 Dubinsky, O., Simon, B., Karamanos, Y., Geresh, S., Barak, Z., Arad, S.M. - Composition of the cell wall polysaccharide produced by the unicellular red alga *Rhodella reticulata*. *Plant. Physiol. Biochem.*, **1992**, 30, 409-414.
- 91 Arad, S.M., Lerental, Y.B., Dubinsky, O. - Effect of nitrate and sulfate starvation on polysaccharide formation in *Rhodella reticulata*. *Bioresource Technol.*, **1992**, 42, 141-148.
- 92 You, T., Barnett, S.M. - Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.*, **2004**, 19, 251-258.
- 93 Friedman, O., Dubinsky, Z., Arad, S.M. - Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green Rhodophyta unicells. *Bioresource Technol.*, **1991**, 38, 105-110.
- 94 Camacho, F.G., Gomez, A.C., Sobczuck, T.M., Grima, E.M. - Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process Biochem.*, **2000**, 35, 1045-1050.
- 95 Borowitzka, M.A. - Micro-algae as sources of fine chemicals. *Microbiol. Sci.*, **1986**, 3, 372-375.
- 96 Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S.M. - Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on *Herpes simplex* and *Varicella zoster* viruses. *The Era of Biotechnology*, Beer-Sheva, Israel, **2000**, October 24-27, 34.
- 97 Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S.M. - Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **2002**, 50, 189-200.
- 98 Talyshinsky, M., Souprun, Y., Huleihel, M. - Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell Int.*, **2002**, 2-8.
- 99 Shopen-Katz, O., Ling, E., Himelfarb, Y., Lamprecht, S.A., Arad, S.M., Shany, S. - The effect of *Porphyridium* sp., biomass and of its polysaccharide in prevention and inhibition of human colon cancer. *The Era of Biotechnology*, Beer-Sheva, Israel, **2000**, October 24-27, 32.
- 100 Dvir, I., Chayoth, R., Sod-Moriah, U., Shany, S., Nyska, A., Stark, A.H., Madar, Z., Arad, S.M. - Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp.

- alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *Brit. J. Nutr.*, **2000**, 84, 469-476.
- 101 Ramus, J. - The production of extracellular polysaccharides by the unicellular red alga *Porphyridium aeruginum*. *J. Phycol.*, **1972**, 8, 97-111.
- 102 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.
- 103 Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. - New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **1973**, 54, 484-489.
- 104 Montreuil, J., Spik, G., Chosson, A., Segard, E., Scheppler, N. - Methods of study of the structure of glycoproteins. *J. Pharm. Bel.*, **1963**, 18, 529-546.
- 105 Ciancia, M., Cerezo, A.S. - Autohydrolysis of polysaccharides. *Carbohydr. Res. Brazil*, **1993**, 45, 54-61.
- 106 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.
- 107 Chambers, R.E., Clamp, J.R. - An assessment of methanolysis and other factors used in analysis of carbohydrate-containing material. *Biochem. J.*, **1971**, 125, 1009-1018.
- 108 Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G., Clamp, J.R. - Characterization by gas liquid chromatography mass spectroscopy of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochem. J.*, **1975**, 151, 491-495.
- 109 Michalski, J.C. - Analysis of monosaccharides by GLC and by HPLC. In: Verbert, A. (Eds.), *Methods on glycoconjugates*, Harwood Academic Press, Chur, Switzerland, **1986**, 31-38.
- 110 Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., Strecker, G. - Glycoproteins. In: Chaplin, M.F., Kennedy, J.F. (Eds), *Carbohydrate analysis, a practical approach*, IRL Press, Oxford, Whashington D.C., **1986**, 143-204.
- 111 Rochas, C., Lahaye, M., Yaphe, Y. - Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Bot. Mar.*, **1986**, 29, 335-340.
- 112 Melo, M.R.S., Feitosa, J.P.A., Freitas, A.L.P., Paula, R.C.M. - Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 49, 491-498.
- 113 Dodgson, K.S. - Determination of inorganic sulfate in studies on enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.*, **1960**, 312-319.



- 114 Dodgson, K.S., Price, R.G. - A note on the determination of the ester sulphate content of sulfated polysaccharides. *Biochem. J.*, **1962**, 84, 106-110.
- 115 BeMiller, J.N. - Acid-catalysed hydrolysis of glycosides. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **1967**, 22, 25-108.
- 116 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, 2296.
- 117 Hirst, E.L., Jones, J.K.N. - The constitution of Damson gum. Part I. Composition of Damson gum and structure of aldobionic acid (glycuronosido-2-mannose) derived from it. *J. Chem. Soc.*, **1938**, 1174-1180.
- 118 Mort, A.J., Bauer, W.D. - Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharides fragments. *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257, 1870-1875.
- 119 Lau, J.M., Mc Neil, 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.
- 120 Monneret, C., Florent, J.C., Kabore, I., Khuong-Huu, Q. - Nouvelle méthode de O-déméthylation de méthoxy-sucre. *J. Carbohydr. Nucleos. Nucleot.*, **1974**, 1, 161-168.
- 121 Fransen, C.T.M., Haseley, S.R., Huisman, M.M.H., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. - Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. *Carbohydr. Res.*, **2000**, 328, 539-547.
- 122 Gloaguen, V., Morvan, H., Hoffman, L., Plancke, Y., Wieruszkeski, J.M., Lippens, G., Strecker, G. - Capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus Laminosus*. *Euro. J. Biochem.*, **1999**, 266,
- 123 Smith, H.A., Huff, B.J.L., Power, W.J., Caine, D. - The reduction-methylation of cyclohexenone derivatives. *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 2851-2856.
- 124 Burgstahler, A.W., Worden, L.R., Lexis, T.B. - Direct reduction of carboxylic acids to aldehydes by lithium in ethylenediamine. *J. Org. Chem.*, **1963**, 28, 2918-2919.
- 125 Lai, Y.Z. - Chemical degradation. In: Hon, D.N.S., Shiraishi, N. (Eds), *Wood and Cellulosic Chemistry*, Marcel Dekker Inc Published, **2000**, 443-512.
- 126 Lindberg, B., Lonngren, J., Thompson, J.L. - Degradation of polysaccharides containing uronic acid residues. *Carbohydr. Res.*, **1973**, 28, 351-357.
- 127 Mc Cleary, C.W., Rees, D.A., Samuel, J.W., Steele, L.W. - Selective splitting of polysaccharide chains at the linkage involving C-4 of uronic acid residues. *Carbohydr. Res.*, **1967**, 5, 493-495.

- 128 Lawson, C.L., Mc Cleary, C.W., Nakada, H.I., Rees, D.A., Sutherland, I.W., Wilkinson, J.F. - Structural analysis of colanic acid from *Escherichia coli* by using methylation and base-catalysed fragmentation. *Biochem. J.*, **1969**, 115, 947-958.
- 129 Björndal, H., Lindberg, B., Lonngren, J., Meszaros, M., Thompson, J.L., Nimmich, W. - Structural studies of polysaccharide of *Klesiella* type 52. *Carbohydr. Res.*, **1973**, 31, 93-100.
- 130 Curvall, M., Lindberg, B., Lonngren, J. - Modification of polysaccharides containing uronic acid residues. *Carbohydr. Res.*, **1975**, 41, 235-239.
- 131 Lindberg, B., Lonngren, J. - Specific degradation of polysaccharides containing uronic acids residues. *Methods Carbohydr. Chem.*, **1976**, VII, 142-148.
- 132 Chopin, T., Kerin, B.F., Mazerolle, R. - Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: a review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycol. Res.*, **1999**, 47, 167-188.
- 133 Strecker, G. - Analyse structurale des chaînes glycaniques. *Biofutur*, **1993**, 125, 46-52.
- 134 Strecker, G. - NMR. In: Verbert, A. (Eds.), *Methods on glycoconjugates*, Harwood Academic Publishers, **1995**, 137-145.
- 135 Vliegthart, J.F.G., Dorland, L., Van Halbeck, H. - High resolution <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrate related to glycoproteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1983**, 41, 209-374.
- 136 Dabrowski, J. - Two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy. In: Ginsburg, V. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc, **1989**, 179, 122-156.
- 137 Karas, M., Hillenkamp, F. - Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299-2301.
- 138 Harvey, D.J. - Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 226, 1-35.
- 139 Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., Hillenkamp, F. - Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption /ionization mass spectroscopy. *Anal. Chem. Acta*, **1990**, 241, 175-185.
- 140 Percival, E., Foyle, R.A.J. - The extracellular polysaccharides of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. *Carbohydr. Res.*, **1979**, 72, 165-176.
- 141 Heaney-Kieras, J., J. Chapman, D. - Structural studies on the extracellular polysaccharide of the red alga, *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Res.*, **1976**, 52, 169-177.

- 142 Evans, L.V., Callow, M.E., Percival, E., Fareed, V. - Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. *J. Cell. Sci.*, **1974**, 16, 1-21.
- 143 Medcalf, D.G., Scott, J.R., Brannon, J.H., Hemerick, G.A., Cunningham, R.L., Chessen, J.H., Shah, J. - Some structural features and viscometric properties of the extracellular polysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr. Res.*, **1975**, 44, 87-96.
- 144 Heaney-Kieras, J., Roden, L., Chapman, D.J. - The covalent linkage of protein to carbohydrate in the extracellular protein-polysaccharide from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochem. J.*, **1977**, 165, 1-9.
- 145 Shrestha, R., Bar-Zvi, D., Arad, S.M. - Proceeding of the XIV International Symposium on Glycoconjugates, Zurich, **1997**, September.
- 146 Lupescu, N., Arad, S.M., Geresh, S., Bernstein, M.A., Glaser, R. - Structure of some sulfated sugars isolated after acid hydrolysis of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp., a unicellular red alga. *Carbohydr. Res.*, **1991**, 210, 349-352.
- 147 Geresh, S., Dubinsky, O., Arad, S.M., Christiaen, D., Glaser, R. - Structure of 3-*O*-( $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic acid)-L-galactopyranose, an aldobiouronic acid isolated from the polysaccharides of various unicellular red algae. *Carbohydr. Res.*, **1990**, 208, 301-305.
- 148 Lupescu, N., Solo-Kwan, J., Christiaen, D., Morvan, H., Arad, S.M. - Structural determination by means of gas chromatography-mass spectrometry of 3-*O*-([ $\alpha$ ]-D-glucopyranosyluronic acid)-galactopyranose, an aldobiuronic acid derived from *Porphyridium* sp. polysaccharide. *Carbohydr. Polym.*, **1992**, 19, 131-134.
- 149 Simon, B., Geresh, S., Arad, S.M. - Degradation of the cell-wall polysaccharide of *Porphyridium* sp. (Rhodophyta) by means of enzymic activity of its predator, *Gymnodinium* sp. (Pyrrophyta). *J. Phycol.*, **1992**, 28, 460-465.
- 150 Keristovesky, G., Barak, Z., Arad, S.M. - *The 5th International Conference of Society of Applied Algology. Recent Advances in Algal Biotechnology*, Tiberias, **1990**, 14.
- 151 Arad, S.M., Keristovesky, G., Simon, B., Barak, Z., Geresh, S. - Biodegradation of the sulphated polysaccharide of *Porphyridium* by soil bacteria. *Phytochemistry*, **1993**, 32, 287-290.
- 152 Arad, S.M. - Production of sulfated polysaccharides from unicellular red algae. *In: Stadler, T., Mollion, J., verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H., Christiaen, D. (Eds), Algal Biotechnol.*, Elsevier Applied Science, London, **1988**, 65-87.
- 153 Knutsen, S.H., Myslabodski, D.E., Larsen, B., Usov, A.I. - A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot. Mar.*, **1994**, 37, 163-169.

- 154 Geresh, S., Mamontov, A., Weinstein, J. - Sulfatation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **2002**, 50, 179-187.
- 155 Yamagaki, T., Tsuji, Y., Maeda, M., Nakanishi, H. - NMR spectroscopic analysis of sulfated beta-1,3-xylan and sulfation stereochemistry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1997**, 61, 1281-1285.
- 156 Nagel, C.W., Wilson, T.M. - Isolation of oligogalacturonic acids by column chromatography. *J. Chromatogr.*, **1969**, 41, 410-416.
- 157 Lindberg, B., Lonngren, J., Svensson, S. - Degradation of polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1975**, 31, 185-240.
- 158 Stewart, T.S., Ballou, C.E. - A comparison of yeast mannans and phosphomannans by acetolysis. *Biochemistry*, **1968**, 7, 1855-1863.
- 159 Pedersen, C., Bock, K. - Carbon-13C NMR spectroscopy of monosaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1983**, 41, 27-66.
- 160 Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. - Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary g.l.c. *Carbohydr. Res.*, **1979**, 62, 349-359.
- 161 Gloaguen, V., Ruiz, G., Morvan, H., Mouradi-Givernaud, A., Maes, E., Krausz, P., Strecker, G. - The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 97-103.
- 162 Lau, J.M., Mc Neil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P. - Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine. *Carbohydr. Res.*, **1987**, 168, 254-274.
- 163 Tseng, C.K. - Terminology of seaweed colloids. *Science*, **1945**, 101, 597-602.
- 164 Geresh, S., Lupescu, N., Arad, S.M. - Fractionation and partial characterization of the sulphated polysaccharide of *Porphyridium*. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 4181-4186.
- 165 Ray, B., Lahaye, M. - Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydr. Res.*, **1995**, 274, 251-261.
- 166 Lahaye, M. - NMR spectroscopic characterisation of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. *Carbohydr. Res.*, **1998**, 314, 1-12.
- 167 Lahaye, M., Inizan, F., Vigouroux, J. - NMR analysis of the chemical structure of ulvan and ulvan-boron complex formation. *Carbohydr. Polym.*, **1998**, 36, 239-249.

- 168 Saunders, G.W., Hommersand, M.H. - Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *Am. J. Bot.*, **2004**, 91, 1494-1507.
- 169 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, 373-376.
- 170 Gerngross, T., Salter, S. - Des plastiques extraits des plantes. *Pour la Science*, **2000**, 276, 66-71.
- 171 IBAW - Advances Bioplastics, International Biodegradable Polymers Association and Working Groups (IBAW), Nuremberg, Germany, **2003**, February 12-13.
- 172 Viljanmaa, M., Södergrad, A., Törmälä, P. - Lactic acid based polymers as hot adhesives for packaging application. *Int. J. Adhes. Adhes.*, **2002**, 22, 219-226.
- 173 Nakano, T. - Mechanism of thermoplasticity for chemically modified wood. *Holzforschung*, **1994**, 48, 318-324.
- 174 Malm, C.J., Mench, J.W., Kendall, D.L., Hiatt, G.D. - Properties. *J. Ind. Eng. Chem.*, **1951**, 43, 688-691.
- 175 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.
- 176 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**, 37, 345-352.
- 177 Sealey, J.E., Samaranyake, G., Todd, J.G., Glasser, W.G. - Novel cellulose ester derivatives, IV, Preparation and thermal analysis of waxy esters of cellulose. *J. Polym. Sci., Part B*, **1996**, 34, 1613-1620.
- 178 Samaranyake, G., Glasser, W.G. - Cellulose derivatives with low DS, I, A novel acylation system. *Carbohydr. Polym.*, **1993**, 22, 1-7.
- 179 Morooka, T., Norimoto, M., Yamada, T., Shiraishi, N. - Viscoelastic properties of cellulose acylates. *Wood Res.*, **1983**, 69, 61-70.
- 180 Wang, P., Tao, B.Y. - Synthesis and characterization of long-chain fatty acid cellulose ester (FACE). *J. Appl. Polym. Sci.*, **1994**, 52, 755-761.
- 181 Wang, P., Tao, B.Y. - Synthesis of cellulose-fatty acid esters for use as biodegradable plastics. *J. Environ. Polym. Degr.*, **1995**, 3, 115-119.
- 182 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, 3040-3045.

- 183 McCormick, C.L., Callais, P.A. - Derivatization of cellulose in lithium chloride and *N,N*-dimethylacetamide solutions. *Polymer*, **1987**, 28, 2317-2323.
- 184 Thiebaud, S., Borredon, M.E. - Solvent-free wood esterification with fatty acid chlorides. *Bioresource Technol.*, **1955**, 52, 169-173.
- 185 Kwatra, H.S., Caruthers, J.M., Tao, B.Y. - Synthesis of long chain acids esterified onto cellulose via vacuum-acid chloride process. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1992**, 31, 2647-2651.
- 186 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, Toulouse, **1997**, pp 222.
- 187 Stevenson, T.T., Furneaux, R.H. - Chemical methods for the analysis of sulfated galactans from red algae. *Carbohydr. Res.*, **1991**, 210, 277-298.
- 188 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.
- 189 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, 287-306.
- 190 Morineau, A., Aluja-Banet, T. - Analyse en composantes principales. *In*: Cisia-Ceresta (Eds.), Paris, **1998**, pp 142.
- 191 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, Portland, Oregon, **1990**, pp 243.
- 192 Moine, C. - Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois. Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes. Thèse du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de Limoges, Limoges, **2005**, pp 239.
- 193 Dodge, Y. - Analyse de régression appliquée. Dunod, Paris, **1999**, pp 278.
- 194 Trotignon, J.P., Verdu, J., Dobraczynski, A., Piperaud, M. - Matières plastiques, structures-propriétés, mise en oeuvre, normalisation. *In*: Nathan, AFNOR (Eds), Paris, **1996**, pp 232.
- 195 Marga, F., Freyssac, V., Morvan, H. - Rapid gas-liquid chromatography microanalysis of carbohydrates in woody plant tissues. *J. Trace. Microprobe. Techn.*, **1995**, 13, 473-478.

- 196 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, 159-168.





# Glossaire



# Glossaire

---

Antithrombine : Protéine permettant d'éviter les pathologies entraînant la formation de caillots de sang dans les vaisseaux sanguins.

Artériosclérose : Maladie d'obstruction des artères qui se caractérise par la formation de dépôts de matières grasses ou plaques artérioscléreuses au niveau de la paroi interne des artères.

Arthrose : Maladies rhumatismales inflammatoires liées à la dégénérescence des tissus de l'articulation.

Athérosclérose : Processus pathologique qui accélère le vieillissement normal des artères par des dépôts lipidiques.

Autotrophe : Qualifie un organisme capable de synthétiser de la matière organique à partir de la matière minérale, en utilisant, soit l'énergie lumineuse, soit l'énergie chimique.

Benthique : Terme relatif à l'ensemble des organismes aquatiques vivant en relation étroite avec le fond marin.

Cytoplasme : Partie interne de la cellule contenant les vacuoles et les organites

Dulçaquicole : Qualifie un organisme vivant en eau douce.

Endophyte : Organisme vivant à l'intérieur d'un végétal, sans pour autant en être le parasite.

Épiphyte : Organisme vivant sur un végétal, sans pour autant en être le parasite.

Hétérotrophe : Qualifie un organisme qui assure sa subsistance en assimilant des substances organiques et incapable de produire ses substances organiques à partir de matière minérale.

Lugol : Réactif composé d'iode et d'iodure de potassium dans de l'eau bidistillée.

Phylogénie : Recherche des liens de parentés entre des organismes, aboutissant à l'établissement d'un arbre généalogique.

Plaste : Organite cellulaire qui peut se charger de pigments ou de diverses substances nutritives.

Saprophyte : Organisme vivant qui tire sa subsistance de matières organiques en décomposition.

Taxon : Groupe d'êtres vivants constituant une unité systématique d'un niveau hiérarchique donné (espèce, genre, famille, classe, embranchement, etc.).

Taxonomie : Science de la classification des êtres vivants.

Thylacoïde : Système de membranes indépendantes de la membrane plasmique contenant les pigments photosynthétiques.

Vacuole : Espace cellulaire plus ou moins en forme de sac, limité par une simple membrane.

# Annexes



# Annexes

---

## **I. Méthode de calcul de la concentration en oses neutres et acides uroniques**

En raison de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres, il est nécessaire de corriger les calculs par la méthode établie par Montreuil et Spik (1963).<sup>104</sup> L'analyse UV-visible des solutions témoins d'oses neutres (Glc) et d'acides uroniques (GlcA) permet de tracer les droites d'étalonnages du dosage. La pente de chaque droite étalon est ensuite mesurée :

Dosage au phénol : Pente =  $\alpha$  pour le Glc  
Pente =  $\beta$  pour le GlcA

Dosage au MHDP : Pente =  $\alpha'$  pour le Glc  
Pente =  $\beta'$  pour le GlcA

A partir de ces pentes et en fonction des densités optiques (D.O) mesurées lors des dosages, les concentrations en acides uroniques (AU) et oses neutres (ON) sont déterminés grâce aux expressions suivantes :

$$D.O_{\text{Phénol}} = \alpha [\text{ON}] + \beta [\text{AU}]$$

$$D.O_{\text{MHDP}} = \alpha' [\text{ON}] + \beta' [\text{AU}]$$

On a alors :

$$[\text{ON}] = \frac{D.O_{\text{Phénol}} - \beta [\text{AU}]}{\alpha}$$

$$[\text{AU}] = \alpha \times \frac{D.O_{\text{MHDP}} - \alpha' D.O_{\text{Phénol}}}{\alpha\beta' - \alpha'\beta}$$

## II. Méthode de calcul du DS par RMN-<sup>1</sup>H

Le DS correspond au nombre de chaînes greffées par unité osidique. L'agarose qui possède 18 protons constitue le motif de base du polymère. L'analyse par RMN-<sup>1</sup>H d'un ester laurique d'agar permet d'écrire :

$$I_{\text{protons osidique}} = \frac{I_{\text{osidique}}}{n_{\text{protons osidique}} - DS}$$

Ici, le nombre de proton osidique,  $n_{\text{protons osidique}}$ , est égal à 18

$$I_{\text{protons chaîne alkyle}} = \frac{n_{\text{protons osidiques}} \times I_{\text{chaîne}}}{n_{\text{protons de la chaîne alkyle}} \times DS}$$

Ici, le nombre de protons de la chaîne alkyle,  $n_{\text{protons de la chaîne alkyle}}$  est égale à 23

$$\text{Or } I_{\text{protons osidique}} = I_{\text{protons chaîne alkyle}}$$

On a donc :

$$DS = \frac{n_{\text{protons osidique}} \times I_{\text{chaîne}}}{n_{\text{protons chaîne alkyle}} \times I_{\text{osidique}} + I_{\text{chaîne}}}$$

$$DS = \frac{18 \times I_{\text{chaîne}}}{23 \times I_{\text{osidique}} + I_{\text{chaîne}}}$$

Avec

$I_{\text{osidique}}$  = somme des intégrations des protons osidique

$I_{\text{proton osidique}}$  = intégration d'un proton osidique

$I_{\text{chaîne}}$  = somme des intégrations des protons de la chaîne alkyle greffée

$I_{\text{proton chaîne alkyle}}$  = intégration d'un proton de la chaîne alkyle greffée

DS = degré de substitution



### **III. Analyse en Composantes Principales (A.C.P)**

#### **1. Centrage et réduction des données brutes**

L'analyse des similitudes entre variables et individus étant délicate, il est nécessaire de centrer et réduire les données brutes. 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 par rapport à l'écart type  $s(U_j)$ . L'opération suivante permet de calculer des variables sans dimension et de construire la matrice  $X$  des données centrées réduites.

$$x_{ij} = \frac{u_{ij} - \bar{u}_j}{\sigma(U_j)}$$

#### **2. Matrice des corrélations**

Le coefficient de corrélation  $r(U_j, U_{j'})$  entre deux variables  $U_j$  et  $U_{j'}$  est calculé à partir des coordonnées centrées réduites selon l'expression suivante :

$$r(U_j, U_{j'}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ij} x_{ij'}, \text{ avec } N \text{ le nombre d'individus.}$$

Cette expression se généralise à l'écriture de la matrice des corrélations ( $R_I$ ), matrice symétrique d'ordre  $p$ . Elle est obtenue à partir de l'équation suivante :

$$R_I = \frac{1}{N} ({}^t X)(X)$$

#### **3. Valeurs propres associées à la matrice des corrélations**

La matrice des corrélations ( $R_I$ ) admet  $p$  valeurs propres  $\lambda_j$  (Tableau 37) calculées à partir de la relation suivante :

$$\det [(R_I) - \lambda_j(I_p)] = 0$$

Tableau 37: Valeurs propres de la matrice des corrélations.

$\lambda_1$	2,197
$\lambda_2$	1,314
$\lambda_3$	1,096
$\lambda_4$	0,598
$\lambda_5$	0,531
$\lambda_6$	0,246

#### 4. Vecteurs propres associés à la matrice des corrélations

Le vecteur propre ( $\vec{u}_j$ ) associé à la valeur propre  $\lambda_j$  vérifie l'équation suivante :

$$(R_I)(\vec{u}_j) = \lambda_j(\vec{u}_j)$$

On peut alors construire le Tableau 38 des vecteurs propres associés aux valeurs propres.

Tableau 38: Vecteurs propres associés à la matrice des corrélations.

$\vec{u}_1$	$\vec{u}_2$	$\vec{u}_3$	$\vec{u}_4$	$\vec{u}_5$	$\vec{u}_6$
0,489	0,258	-0,350	-0,210	-0,574	-0,446
0,084	-0,181	0,886	-0,151	-0,321	-0,222
0,482	-0,204	0,049	0,850	-0,038	0,020
-0,416	0,565	0,124	0,384	0,129	-0,573
0,251	0,731	0,249	0,002	-0,061	0,580
0,535	0,073	0,115	-0,252	0,739	-0,294

#### 5. Calcul des composantes principales

Les composantes principales se calculent à partir du produit matriciel suivant et sont reportées dans le Tableau 39 :

$$(C_j) = (X)(\vec{u}_j)$$

Ce sont de nouvelles variables dont les valeurs correspondent aux coordonnées des projections des individus  $i$  sur les nouveaux axes définis à partir des vecteurs. Il est à noter

que les nouvelles variables  $C_k$  ne sont pas corrélées entre elles puisque les composantes sont orthogonales deux à deux.

Tableau 39: Coordonnées des individus.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>
<b>1</b>	-2,01	2,34	1,57	0,79	0,45	-1,29
<b>2</b>	-1,47	1,19	1,26	0,16	-0,18	-0,01
<b>3</b>	-1,96	1,12	1,16	0,40	-0,87	0,27
<b>4</b>	-3,48	-0,36	-1,41	1,05	-1,10	-0,25
<b>5</b>	-1,69	1,55	-0,55	0,50	0,41	0,47
<b>6</b>	-0,80	0,90	-0,62	-0,14	0,93	0,74
<b>7</b>	-1,82	-1,05	-1,37	-0,02	0,01	0,21
<b>8</b>	-1,05	0,68	-1,07	-0,06	-0,07	0,43
<b>9</b>	0,22	2,07	-0,76	-0,38	1,36	-0,81
<b>10</b>	0,62	-0,21	-1,40	-1,13	1,18	-0,60
<b>11</b>	-2,01	-1,08	0,14	-2,01	-1,03	-0,15
<b>12</b>	-1,09	-0,83	0,38	-1,80	-0,31	-0,21
<b>13</b>	0,54	0,44	1,04	-1,76	0,84	0,29
<b>14</b>	0,35	-0,60	0,75	0,03	-0,25	0,28
<b>15</b>	1,52	-0,32	1,06	0,75	0,32	0,39
<b>16</b>	0,79	-0,93	0,74	0,37	0,02	0,06
<b>17</b>	1,15	-0,35	0,97	0,30	0,28	0,30
<b>18</b>	1,14	-0,25	1,00	0,33	0,30	0,28
<b>19</b>	0,81	0,27	1,11	0,63	0,10	0,27
<b>20</b>	-0,27	0,13	0,82	-0,79	-0,72	0,96
<b>21</b>	1,12	0,11	-1,27	0,55	0,02	0,40
<b>22</b>	1,38	0,44	-1,61	0,46	-0,88	0,20
<b>23</b>	2,08	0,86	-1,85	0,18	-1,18	-0,20
<b>24</b>	0,08	-1,37	0,98	0,67	0,39	0,35
<b>25</b>	1,69	-0,22	0,62	0,05	-0,08	-0,29
<b>26</b>	1,96	0,02	0,25	-0,05	-0,91	-0,58
<b>27</b>	-1,22	-3,71	0,33	0,92	0,40	-0,98
<b>28</b>	2,73	0,68	0,09	-0,33	-1,26	-0,79
<b>29</b>	0,25	-0,50	-1,12	0,26	0,66	0,41
<b>30</b>	0,45	-1,00	-1,23	0,07	1,17	-0,14

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

## **IV. Régression linéaire**

### **1. Méthode des moindres carrés**

Après la construction d'un plan d'expérience adapté, la modélisation de la réaction d'estérification consiste en la résolution d'un système de N équations à p inconnues de la forme :

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

Dans cette expression, (X) représente la matrice du modèle obtenue par codage de la matrice de données brutes. L'opération de codage est exprimée ci-dessous :

$$x_i = \frac{u_i - \left(\frac{u_{\max} + u_{\min}}{2}\right)}{\left(\frac{u_{\max} - u_{\min}}{2}\right)}$$

Le nombre d'inconnues associées au modèle est défini selon la formule suivante :

$$p = \frac{(k+2)!}{k!2!} = \frac{(k+2)(k+1)}{2}, \text{ avec } k \text{ qui est égal au nombre de facteurs.}$$

La résolution du système d'équations, et donc la détermination des coefficients  $a_i$ , par la méthode des moindres carrés nécessite la résolution de l'équation matricielle suivante :

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

La valeur des coefficients ainsi déterminés permet de calculer les réponses estimées par le modèle à partir de l'équation suivante :

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

## 2. Calcul du coefficient de détermination $R^2$

Le coefficient de détermination  $R^2$  se calcule selon l'expression suivante :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2}$$

où  $y_i$  et  $\hat{y}_i$  représentent respectivement la réponse mesurée et la réponse calculée de l'essai  $i$ .

Pour tenir compte du degré du modèle polynomial et éventuellement comparer les modèles entre eux, il est préférable de calculer le coefficient  $R^2$  ajusté défini par :

$$R^2_{ajusté} = 1 - \frac{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}}{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}}$$

où  $p$  est le nombre d'inconnues  $a_i$ .





## Résumé

---

Les algues rouges sécrètent parfois en abondance des polysaccharides extracellulaires. Ces polymères, outre des masses moléculaires élevées, présentent généralement des compositions hétérogènes et des taux de sulfatation variables. Malgré l'attention grandissante que leur porte l'industrie pharmaceutique en raison de leurs propriétés biologiques parfois attractives, la structure de ces polymères a été peu, ou pas, étudiée ce qui limite leur valorisation potentielle.

Après avoir défini les conditions optimales de son extraction, nous avons mis en œuvre une stratégie d'analyse structurale du polysaccharide extracellulaire sécrété par *Porphyridium cruentum*, une algue rouge unicellulaire. Ce polysaccharide a été fragmenté en ayant recours à une série de dégradations chimiques sélectives (dégradation au lithium et dégradation alcaline en milieu réducteur) ou non (hydrolyse acide, autohydrolyse, acétolyse). L'analyse par spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C des différents fragments oligosaccharidiques libérés nous a permis d'en préciser la structure et de proposer pour lui une unité de répétition dodécasaccharidique comme base de sa structure. Enfin, l'analyse comparée des compositions des polysaccharides sécrétés par *Porphyridium cruentum* et *Rhodella reticulata*, deux micro-algues rouges de la famille des Porphyridiaceae, tout en complétant notre étude, en précise la position chimiotaxonomique.

Dans une dernière partie, les colloïdes d'algues rouges ont servi de substrats à la synthèse, par acylation avec des chlorures d'acide gras, de matériaux plastiques hydrophobes potentiellement biodégradables. La mise en œuvre d'un plan d'expérience nous a permis d'optimiser la réaction d'acylation de l'agar et d'en identifier les paramètres les plus influents afin de permettre la synthèse de matériaux dont les propriétés physicochimiques sont comprises entre celles des acétates de cellulose et du polyéthylène basse densité.

## Abstract

---

Red algae secrete large amounts of extracellular matrices mainly composed of sulphated polyanionic polysaccharides that present interesting biotechnological properties. However, valorization of these polymers is underdeveloped because of their poorly understood structure. Our analysis of the exo-polysaccharide from *Porphyridium cruentum*, based on selective and non-selective degradations, and on NMR spectra of oligosaccharidic fragments, has led to the proposal of a dodecasaccharidic repeating unit for its structure. In a second section, phycocolloids have been chemically modified with lauroyl chloride in order to obtain potentially biodegradable hydrophobic plastic films. Experimental design and statistical analysis were used to evaluate the most significant factors governing polysaccharide acylation. Thermomechanical properties of the obtained phycocolloid laurate esters stand between those of cellulose acetate and low density polyethylene.

## Keywords

---

Red algae, *Porphyridium cruentum*, Polysaccharide, Structure, Valorization, Hydrophobic Plastic Film, Principal Components Analysis, Experimental Design.