

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Gay Lussac, Sciences pour l'Environnement

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

THESE

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Limoges
2009 – n° 22

Discipline : Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles

Présentée par

Aline BARBAT

Soutenue le 8 juillet 2009

**EXTRACTION, CARACTERISATION CHIMIQUE ET
VALORISATION BIOLOGIQUE DE GLUCURONOXYLANES DE BOIS
DE CHATAIGNIER.**

**DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX PROCEDES DE
DELIGNIFICATION.**

Directeurs de Thèse : M. Vincent Gloaguen et M. Pierre Krausz,

Rapporteurs : M. Henri Morvan, Professeur, Université d'Artois
M. Bernard De Jéso, Professeur, Université de
Bordeaux

Examineurs : M. André Amblès, Professeur, Université de Poitiers
M. Carlos Vaca-Garcia, Professeur, INP de Toulouse
M. Vincent Gloaguen, Maître de Conférences-HDR,
Université de Limoges

Invité : M. Pierre Krausz, Professeur, Université de Limoges
M. Jacques Christen, Professeur Associé, Directeur de
l'Agence de Valorisation de la Recherche Universitaire
en Limousin

Faculté des Sciences et Techniques

*Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles***THESE**Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Limoges
2009 – n° 22**Discipline : Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles**

Présentée par

Aline BARBAT*Soutenue le 8 juillet 2009***EXTRACTION, CARACTERISATION CHIMIQUE ET
VALORISATION BIOLOGIQUE DE GLUCURONOXYLANES DE BOIS
DE CHATAIGNIER.****DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX PROCEDES DE
DELIGNIFICATION.**

Directeurs de Thèse : M. Vincent Gloaguen et M. Pierre Krausz

Rapporteurs : **M. Henri Morvan**, Professeur, Université d'Artois
M. Bernard De Jéso, Professeur, Université de
Bordeaux

Examineurs : **M. André Amblès**, Professeur, Université de Poitiers
M. Carlos Vaca-Garcia, Professeur, INP de Toulouse
M. Vincent Gloaguen, Maître de Conférences-HDR,
Université de Limoges
M. Pierre Krausz, Professeur, Université de Limoges

Invité : **M. Jacques Christen**, Professeur Associé, Directeur de
l'Agence de Valorisation de la Recherche Universitaire
en Limousin

Remerciements

Je remercie tout d'abord le directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles Monsieur Pierre Krausz, pour m'y avoir accueillie. Je vous remercie également pour votre rigueur et pour votre exigence en termes de rédaction notamment et qui ont permis indéniablement d'améliorer la qualité de ce travail.

Je tiens à remercier très chaleureusement Vincent Gloaguen qui m'a encadrée sur ce sujet depuis le Master Recherche. Je vous remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir permis de faire évoluer ce sujet mais aussi pour l'autonomie que vous m'avez accordée et pour votre rigueur scientifique. Merci aussi de m'avoir rassuré quand il le fallait et d'avoir fait profiter de vos connaissances en biologie végétale et en phytochimie. Durant ces quatre années, j'ai pu apprécier vos nombreuses qualités humaines ainsi que votre optimisme à toute épreuve.

J'adresse également tous mes remerciements à Monsieur Bernard De Jéso, Professeur à l'Université de Bordeaux et à Monsieur Henri Morvan, Professeur à l'Université d'Artois, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail, à Monsieur André Amblès, Professeur à l'Université de Poitiers, qui a présidé ce jury et à Monsieur Carlos Vaca Garcia, Professeur à l'INP de Toulouse qui a accepté d'être examinateur de cette thèse.

Je remercie aussi Monsieur Jacques Christen pour son encadrement lors du nouveau chapitre de thèse ainsi que pour ses précieux conseils concernant mon projet professionnel.

Je remercie Vincent Sol de m'avoir suivi et d'avoir accepté de m'initier à la synthèse des porphyrines. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur Rachida Zerrouki pour sa rigueur, sa disponibilité, ses conseils toujours pertinents et sa bonne humeur (contagieuse).

Merci aussi aux biologistes du laboratoire (Céline, Gaëlle S, Sabine, Guy, Caroline, Philippe et Gaëlle B.) pour votre aide et pour avoir pris du temps pour répondre à mes questions.

Monsieur Granet, je vous remercie pour votre aide lors de la synthèse des phthalocyanines et pour m'avoir fait profiter de votre grande culture scientifique.

Je tiens à remercier le Professeur Michel Guilloton pour son esprit critique et pour tout le temps consacré à la rédaction et à la correction de mes articles.

Je voudrais remercier David Ropartz et Hélène Rogniaux de la plateforme Biopolymères-Intéractions-Biologie Structurale de l'INRA de Nantes pour les analyses de spectrométrie de masse MALDI. Merci aussi à Odile Sainte-Catherine et à Michel Kraemer du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Paris XIII pour les tests d'activité biologique.

Mes remerciements également à Yves Champavier pour la réalisation de mes spectres RMN et à Sandra Alves pour les spectres de masse de mes macrocycles tétrapyrroliques.

Je te remercie aussi Vincent Chaleix pour ton aide, notamment pour la RMN. Merci à toi Charlotte pour l'intérêt que tu as porté à ce travail et pour tes remarques perspicaces le concernant.

Merci à Michèle Constantin pour s'être occupée des commandes. Un grand merci à Karine Clériès pour ton aide très précieuse lors de la mise en place et du bon déroulement des TP (ah que la caféine ne fut pas toujours si facile que ça à extraire et à doser !!! mais au final que de bons souvenirs !!!) et merci pour ta bonne humeur et ta jovialité. Merci aussi à vous deux pour l'organisation parfaite des barbecues et autres repas de Noël du laboratoire.

Je remercie tous les doctorants du LCSN (Gaël, Florian, Yannick, Virginie (ah tes playlists sont toujours aussi cultes et aussi demandées lors des repas du labo !), Marc, François, Cris, Nicolas, Julien, Matthieu, Naïma et tous ceux que j'ai pu oublier pour tous les bons moments passés avec eux et pour leur contribution à la bonne ambiance qui règne dans ce labo. Je remercie aussi les différents stagiaires qui ont de près ou de loin contribué à ce travail. Un merci particulier à Karine Teste pour m'avoir si gentiment aidé sur la partie propriétés biologiques mais aussi à Carmen pour les nombreuses discussions constructives que l'on a eues qu'elles soient scientifiques (sur les phtalocyanines et les polysaccharides) ou non d'ailleurs. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse. Je te remercie aussi Cyril pour ton aide sur les porphyrines, pour les bons moments passés à Lisbonne pour le congrès. Romain, merci pour ton aide, ton soutien et ta disponibilité au long des ces quatre années; sache qu'on apprécie aussi tes jeux de mots, ta bonne humeur et ton sens de la répartie (même si ce n'est pas toujours ce qu'on t'a dit !).

Je tiens à remercier plus particulièrement mes collègues du Batiment de Biologie qui m'ont supporté au quotidien. Merci à toi Raphaël pour ton soutien et pour être resté disponible pour mes questions de biologie végétale, je te souhaite bon courage pour cette fin de thèse. Merci Fred pour ton soutien, ton professionnalisme mais aussi pour tes nombreuses facéties qui ont égayé mon quotidien. Je remercie aussi Mr « Delpeck », Loïc (merci pour tous les services informatiques que tu m'as rendus), et Cédric (Mr « Tartuffe ») pour leur aide mais aussi pour leur bonne humeur. Je remercie également Stéphanie pour avoir partagé ces trois années avec moi ; merci de m'avoir initié à la science du bricolage (vidange des pompes, changement de fusibles, démontage des syphons...) et à qui aucune panne ne résiste! Merci aussi pour tous les conseils donnés, pour les nombreuses discussions que nous avons eues et pour tous les bons moments passés dans et en dehors du labo. Merci également à Muriel pour ton aide précieuse lors de ces derniers mois. Merci à vous tous pour avoir passé tous ces moments avec moi.

Ma petite Priscilla, je ne t'oublie pas non plus dans mes remerciements ! Qu'il est long le chemin parcouru depuis la prépa où l'on s'est connu et depuis le Deug où l'on s'était dit que ça pourrait être « sympa » de faire une thèse !!! Merci pour ton amitié et ton soutien dans tous les moments (bons comme moins bons) et merci aussi pour cette année riche en émotions sur un plan plus personnel. Enfin bon courage pour ces derniers mois de labeurs avant la consécration !!!

Merci aussi à toi Paul pour tous les agréables moments passés depuis la licence (et les nombreuses parties de belote que t'as perdues, souviens-toi !). Bon courage à toi aussi pour la rédaction de ta thèse.

Je remercie le Conseil Régional du Limousin pour le financement de ces trois années de thèse sur le programme du Fond Social Européen, ce qui m'a permis de travailler dans des conditions optimales.

Je tiens à remercier aussi mes amis d'enfance et de lycée (Audrey, Aurélie, Emmanuelle, Céline, Eloïse, Manue, Fred, Seb, Virginie, Emilie...) pour leur intérêt porté à ce travail. Merci pour votre amitié. Merci aussi à mes « amis du foot » pour tous les excellents moments passés aux abords et en dehors des terrains. Merci à tous pour votre convivialité.

Enfin, je remercie mes proches. Merci à mes parents sans qui tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir permis d'aller aussi loin dans mes études et de m'avoir soutenu et supporté tout au long de ces années. Merci aussi à ma sœur Clémence et à PJ. Je n'oublie pas non plus le reste de la famille : mamie, tontons, tatas, cousins, cousines et ma belle-famille ; merci pour votre soutien et votre affection.

Merci Hervé, pour avoir partagé tous ces moments avec moi, pour m'avoir réconforté mais aussi pour ton soutien de tous les instants.

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Abréviations

INTRODUCTION GENERALE.....1

Première partie : La paroi cellulaire végétale, les polysaccharides, la lignine -

Etat de la question.....4

I.1. La paroi cellulaire végétale.....	7
I.1.1. Les principaux constituants.....	8
I.1.2. La paroi secondaire des cellules de bois.....	14
I.2. Les xylanes du bois.....	23
I.2.1. Les traitements préalables à l'extraction.....	25
I.2.2. Les solvants d'extraction des xylanes.....	37
I.2.3. Les conditions d'extraction.....	41
I.3. Caractérisation des hémicelluloses du bois.....	42
I.3.1. Détermination de la composition chimique.....	42
I.3.2. Analyse structurale des oligosaccharides.....	50
I.4. Applications, propriétés et valorisation des xylanes.....	64
I.4.1. Xylanes natifs.....	64
I.4.2. Xylooligosaccharides d'intérêt.....	67
I.4.3. Etude de valorisation des xylanes de bois.....	70

Deuxième partie : Nouvelles stratégies de délignification et d'extraction des xylanes de châtaignier (*Castanea sativa* Mill.).....75

Chapitre I. Délignification en milieu oxydant – Extraction des hémicelluloses par des méthodes classiques et non conventionnelles.....	79
I.1. Délignification standard par le chlorite de sodium.....	79
I.2. Extraction alcaline des xylanes.....	80
I.2.1. Conditions opératoires.....	80
I.2.2. Etude qualitative et quantitative du résidu et de la fraction extraite.....	80
I.3. Prétraitements par les ultrasons.....	81
I.3.1. Conditions opératoires.....	82
I.3.2. Analyses qualitative et quantitative des extraits.....	82
I.4. Extraction par micro-ondes.....	83
I.4.1. Conditions opératoires.....	84
I.4.2. Etude qualitative et quantitative des résidus et des fractions extraites.....	84

I.5.	Extraction par les micro-ondes avec prétraitements préalables aux ultrasons.....	85
I.5.1.	Etude qualitative et quantitative des résidus et des fractions extraites.....	85
I.6.	Bilan sur l'extraction par les micro-ondes et les ultrasons dans le DMSO	87
Chapitre II.	Délicignification enzymatique par le système laccase/HOBt/H ₂ O ₂	89
II.1.	Plan d'expériences.....	90
II.1.1.	Principe du plan en carré gréco-latin.....	90
II.1.2.	Mise au point du domaine expérimental.....	91
II.1.3.	Construction du plan d'expériences	91
II.2.	Analyses des résultats.....	93
II.2.1.	Tableau de résultats	93
II.2.2.	Construction d'une grille de dépouillement	94
II.2.3.	Influence de la durée du procédé.....	96
II.2.4.	Influence de la température	96
II.2.5.	Influence de la quantité en enzyme	97
II.3.	Etude qualitative des résidus et des fractions extraites	97
II.3.1.	Compositions monosaccharidiques des extraits et résidus et degré de polymérisation des xylanes extraits.....	97
II.3.2.	Caractérisation des résidus par infrarouge.....	98
II.4.	Bilan sur la délicignification enzymatique.....	99
Chapitre III.	Délicignification induite thermiquement par des macromolécules tétrapyrroliques – Analogues de <i>peroxydases</i>	100
III.1.	Synthèse des phtalocyanines	101
III.2.	Synthèse des porphyrines	101
III.3.	Protocole de dégradation des lignines et d'extraction des xylanes	102
III.3.1.	Etude quantitative de fractions extraites après la délicignification	104
III.3.2.	Etude quantitative et qualitative des résidus et extraits glucidiques.....	105
III.3.3.	Optimisation des paramètres	109
III.3.4.	Hypothèse relative aux mécanismes d'oxydation et leur répercussion sur la structure des molécules	112
III.4.	Bilan sur le système de délicignification MPcS ou MTPPS/H ₂ O ₂	117
Chapitre IV.	Délicignification induite photochimiquement en présence de porphyrines ou de phtalocyanines	118
IV.1.	Synthèse des photosensibilisateurs.....	118
IV.1.1.	Synthèse de la tétraphénylporphyrine sulfonée	118
IV.1.2.	Synthèse des sulfophtalocyanines d'aluminium, de nickel et de zinc	118
IV.2.	Protocole de dégradation des lignines et d'extraction des xylanes	119
IV.2.1.	Etude qualitative et quantitative des extraits après délicignification photochimique.	119
IV.2.2.	Etude qualitative et quantitative des xylanes extraits	122

IV.2.3. Bilan de la délignification photochimique.....	124
IV.3. Bilan général	124
Troisième partie : Quelques propriétés oncologiques de xylanes de châtaignier (<i>Castanea sativa</i>)	127
Chapitre I. Extraction, purification et caractérisation chimique de xylanes de bois de châtaignier et de péricarpe d'argan	131
I.1. Extraction alcaline des xylanes de châtaignier et d'argan	131
I.1.1. Extraction de xylanes de châtaignier	131
I.1.2. Extraction de xylanes d'argan	132
I.2. Caractérisations chimiques	133
I.2.1. Composition centésimale.....	133
I.2.2. Analyse Chromatographique en Phase Gazeuse	134
I.2.3. Distribution en masse	135
I.2.4. Etude de la distribution des acides uroniques.....	136
I.2.5. Analyse structurale (RMN)	139
I.2.6. Conclusion sur les caractérisations chimiques	142
Chapitre II. Evaluation des propriétés biologiques des extraits en oncologie cellulaire et moléculaire.....	143
II.1. Effets sur la prolifération des cellules A431	143
II.2. Effets sur la migration des cellules A 431.....	144
II.3. Effets sur l'invasion des cellules A 431	145
II.4. Effets sur l'expression des métalloprotéases.....	146
II.5. Corrélation entre les effets biologiques et la structure des molécules	147
CONCLUSION GENERALE.....	149
Quatrième partie : Partie Expérimentale.....	153
I.1. Réactifs et solvants	155
II.1. Analyse chimique.....	156
II.1.1. Analyses spectroscopiques	156
II.1.2. Chromatographie	157
III.1. Extraction des xylanes.....	158
III.1.1. Préparation de l'holocellulose	158
III.1.2. Extraction des xylanes.....	160
III.1.3. Extraction des xylanes à partir de péricarpe d'argan.....	161
III.1.4. Extraction alcaline des xylanes	162
III.2. Caractérisations chimique des xylanes.....	162
III.2.1. Etude de la composition centésimale.....	162
III.2.2. Dosage des hydroxyles phénoliques totaux.....	165

III.2.3.	Dosage du <i>peroxyde</i> d'hydrogène résiduel	166
III.2.4.	Dosage des fonctions acides carboxyliques.....	166
III.2.5.	Dosage des fonctions aldéhydes (réaction de Cannizarro).....	167
III.2.6.	Etude de la composition monosaccharidique par CPG	167
III.2.7.	Evaluation du taux d'acétylation et d'acide 4- <i>O</i> -méthylglucuronique.....	168
III.3.	Autohydrolyse des xylanes.....	168
III.3.1.	Protocole.....	168
III.3.2.	Séparation des oligosaccharides	169
III.3.3.	Purification des oligosaccharides	169
IV.1.	Synthèses	170
IV.1.1.	Sel de sodium de l'acide sulfophtalique	170
IV.1.2.	4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine de fer (FePcS)	171
IV.1.3.	4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine de manganèse (MnPcS)	172
IV.1.4.	4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine d'aluminium (AlPcS).....	173
IV.1.5.	4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine de zinc (ZnPcS)	174
IV.1.6.	4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine de nickel (NiPcS).....	175
IV.1.7.	5,10,15,20-tétra(4-sulfonatophenyl)porphyrine (H ₂ TPPS).....	176
IV.1.8.	5, 10, 15,20-tétra(4-sulfonatophényl)porphyrine de fer (FeTPPS).....	177
IV.1.9.	5, 10, 15, 20-tétra(4-sulfonatophényl)porphyrine de manganèse (MnTPPS).....	178
V.1.	Evaluation des propriétés biologiques de cytotoxicité des extraits.....	179
V.1.1.	Efficacité des xylanes en oncologie cellulaire et moléculaire	179
V.1.2.	Etude de la viabilité cellulaire	180
Annexes.....		203
Conduite de Projet de recherche. Un nouveau chapitre de la thèse.....		207
Cadre général et enjeux de la thèse.....		209
Présentation succincte du sujet de thèse		209
Contexte de la thèse.....		209
Gestion, évolution et coût du projet.....		211
Préparation et cadrage du projet		211
Conduite du projet		211
Evaluation et prise en charge du coût du projet.....		212
Compétences et savoir-faire.....		214
Résultats, impacts de la thèse		216

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Composition relative des différents constituants du bois.....	8
Tableau 2 : Pourcentages des liaisons les plus communes retrouvées dans les lignines de feuillus et résineux	12
Tableau 3 : Méthode de dérivation des monosaccharides.....	47
Tableau 4 : Compositions monosaccharidiques des résidus et du filtrat après extraction alcaline	81
Tableau 5 : Essais préliminaires des prétraitements ultrasons	82
Tableau 6 : Résultats des essais de traitements par sonication dans le DMSO.....	82
Tableau 7 : Compositions monosaccharidiques molaires des extraits après prétraitements aux ultrasons	83
Tableau 8 : Suivi quantitatif des teneurs en acides uroniques et des rendements massiques d'extraction.....	84
Tableau 9 : Compositions monosaccharidiques molaires des extraits après traitement micro-ondes.....	85
Tableau 10 : Suivi quantitatif des teneurs en acides uroniques et des rendements massiques d'extraction.....	86
Tableau 11 : Compositions monosaccharidiques molaires des extraits après traitements ultrasons et micro-ondes.....	86
Tableau 12 : Définition des facteurs et des modalités.....	91
Tableau 13 : Plan d'expériences utilisé pour la délignification enzymatique des sciures de châtaignier	92
Tableau 14 : Résultats d'essais de délignification enzymatique	94
Tableau 15 : Grille de dépouillement pour les phénols dosés.....	95
Tableau 16 : Compositions monosaccharidiques molaires des extraits et résidus.....	97
Tableau 17 : Quantification des phénols dosés et de <i>peroxyde</i> consommé après l'étape de délignification.....	104
Tableau 18 : Compositions centésimales des filtrats après extraction aqueuse	105
Tableau 19 : Compositions monosaccharidiques des fractions après extraction aqueuse en % molaire.....	107
Tableau 20 : Compositions monosaccharidiques des résidus après extraction aqueuse en % molaire.....	108
Tableau 21 : Résultats qualitatifs et quantitatifs pour les xylanes extraits sur du matériel de granulométrie 200 et 500 μm	110

Tableau 22 : Résultats qualitatifs et quantitatifs pour les xylnes extraits sur des sciures et de l'holocellulose à 20 et 40°C	111
Tableau 23 : Résultats qualitatifs et quantitatifs pour les xylnes extraits sur de l'holocellulose à des temps variables	111
Tableau 24 : Résultats qualitatifs et quantitatifs pour les xylnes extraits sur des sciures pour des temps de délignification oxydative de 24 et 100 h avec FePcS	112
Tableau 25 : Données qualitatives des xylnes avant et après oxydation par le système FePcS/H ₂ O ₂	113
Tableau 26 : Résultats des dosages des fonctions acides et aldéhydes	114
Tableau 27 : Quantités estimées en phénols par dosages après délignification photochimique	119
Tableau 28 : Compositions centésimales des fractions après extraction aqueuse.....	122
Tableau 29 : Compositions monosaccharidiques des extraits après extraction aqueuse.....	123
Tableau 30 : Compositions monosaccharidiques des résidus après extraction aqueuse des xylnes.....	124
Tableau 31 : Rendements massiques d'extraction en xylnes	134
Tableau 32 : Compositions monosaccharidiques des différents extraits et résidus pour le châtaignier	134
Tableau 33 : Compositions monosaccharidiques des différents extraits et résidus pour l'argan	135
Tableau 34 : Déplacements chimiques (ppm) en RMN ¹ H pour les glucuronoxylnes de châtaignier et d'argan	140
Tableau 35 : Déplacements chimiques (ppm) en RMN ¹ H pour l'homoxylane d'argan	141
Tableau 36 : Caractéristiques chimiques des différents xylnes extraits	142
Tableau 37 : Effets des xylnes de châtaignier et d'argan sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules A431 et sur l'expression des MMP9, ProMMP2 et des ProMMP9 ..	147

Listes des Figures

Figure 1 : Vue perspective d'une paroi ligneuse.....	8
Figure 2 : Liaisons hydrogène intra et intermoléculaires dans la cellulose	9
Figure 3 : Exemples de structures d'hémicelluloses : en haut un L-arabino-D-xylane (AX) et en bas un D-galacto-D-mannane	10
Figure 4: Structure des monolignols	11
Figure 5 : Motifs typiques présents dans la lignine.....	12
Figure 6 : Schéma simplifié de la voie biosynthétique des lignines chez les angiospermes....	16
Figure 7 : Représentation d'un possible assemblage des polymères pariétaux lors de la formation de la paroi secondaire	18
Figure 8 : Structure de la paroi secondaire.....	19
Figure 9 : Possibles liaisons covalentes entre les xylandes et les lignines dans la paroi végétale	22
Figure 10 : Séparation des constituants du bois	24
Figure 11 : Structures d'homoxylandes	25
Figure 12 : Structure du 4- <i>O</i> -méthyl-D-glucurono-D-xylane (MGX)	25
Figure 13 : Unité C ₉ phénylpropane.....	27
Figure 14 : Oxydation de la lignine par la manganèse- <i>peroxydase</i>	29
Figure 15 : Cycle catalytique de la lignine- <i>peroxydase</i>	30
Figure 16 : Proposition de mécanisme d'action de la laccase.....	31
Figure 17 : Principaux médiateurs utilisés (d'après la littérature)	31
Figure 18 : Exemples de médiateurs naturels.....	31
Figure 19 : Hème de type b	32
Figure 20 : Structure générale des porphyrines.....	33
Figure 21 : Structure générale des phtalocyanines.....	33
Figure 22 : Proposition de mécanisme de la conversion de la lignine par l'ozone	35
Figure 23 : Proposition de mécanisme lors de la réaction d'une double liaison et de l'ozone dans la lignine.....	35
Figure 24 : Formation de radicaux hydroxycyclohexadiényles	36
Figure 25 : Le photosensibilisateur Rose de Bengale	36
Figure 26 : Le méthyltrioxorhénium	37
Figure 27 : Dégradation des unités d'acide uronique en milieu basique	39
Figure 28 : Dépolymérisation (peeling) des xylandes en milieu alcalin	40
Figure 29 : Exemples de chromogènes utilisés pour les dosages colorimétriques.....	43

Figure 30 : Dérivés furfuriques obtenus par déshydratation des pentoses, des hexoses et des acides uroniques	43
Figure 31 : Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide	45
Figure 32 : Préparation des <i>O</i> -méthylglycosides	46
Figure 33 : Equilibre mutarotationnel du xylose.....	48
Figure 34 : Méthode de triméthylsilylation des <i>O</i> -méthylglycosides	49
Figure 35 : Principe du dosage enzymatique des acétyles	50
Figure 36 : Hydrolyse enzymatique de GX.....	52
Figure 37 : Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides	53
Figure 38 : Catalyse intramoléculaire par un groupement carboxyle d'une liaison 1→4 précédant un acide uronique.....	54
Figure 39 : Dépolymérisation en milieu basique ou peeling d'un glycane lié en 1→4.....	55
Figure 40 : Dégradation alcaline en milieu réducteur d'un polysaccharide acide	56
Figure 41 : Libération des substituants R ₁ , R ₂ , R ₃ en milieu acide après la β-élimination	56
Figure 42 : Schéma représentant les corrélations ³ J _{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.	59
Figure 43 : Principe du MALDI.....	61
Figure 44 : Exemples d'application des xylo-oligosaccharides	68
Figure 45 : Xylanes fonctionnalisés	69
Figure 46: Hydrolyse des xylanes et exemples d'applications industrielles	71
Figure 47 : Formation d'une cétone C-xylosidée.....	72
Figure 48 : Réduction de la cétone C-xylosidée.....	72
Figure 49: Protocole d'extraction de polysaccharides pariétaux	79
Figure 50 : Extraction alcaline de xylanes	80
Figure 51 : Spectre RMN ¹ H (D ₂ O) du xylane extrait dans le DMSO aux micro-ondes après prétraitement aux ultrasons.	87
Figure 52 : Principe de la délignification enzymatique.....	89
Figure 53 : Protocole d'obtention de xylanes après délignification enzymatique	90
Figure 54 : Disposition des essais.	92
Figure 55 : Disposition des essais lorsque l'on ne fait varier qu'un seul facteur à la fois.....	93
Figure 56 : Tracé des effets moyens sur la quantité en phénols.....	95
Figure 57 : Tracé des effets moyens des facteurs pour le rendement massique en xylanes.....	96
Figure 58 : Spectre IR des résidus après délignification par le système laccase/oxygène/HOBt et par le chlorite de sodium	98

Figure 59 : Catalyseurs utilisés pour l'oxydation.....	100
Figure 60 : Principe du système utilisé	100
Figure 61 : Synthèse de phtalocyanines sans solvant.....	101
Figure 62: Synthèses des porphyrines	102
Figure 63 : Protocole d'extraction et de caractérisation des xylanes de châtaignier.....	103
Figure 64: Principe de la délignification par les phtalocyanines et les porphyrines.	104
Figure 65 : Proposition de mécanisme pour le clivage de la liaison C ₂ -C ₃ d'un anhydroglucose	106
Figure 66 : Spectre RMN ¹ H (D ₂ O) du xylane extrait dans l'eau à partir d'un résidu holocellulosique délignifié par le système FePcS/H ₂ O ₂	109
Figure 67 : Réaction de Cannizarro.....	113
Figure 68 : Spectre RMN ¹ H (D ₂ O) du xylane de châtaignier natif avant et après oxydation par le système FePcS/H ₂ O ₂	114
Figure 69 : Réaction d'équilibre d'un aldéhyde dans l'eau	115
Figure 70 : Spectre IR des xylanes de hêtre et de châtaignier avant et après oxydation par le système FePcS/H ₂ O ₂	115
Figure 71 : Profils de masses de glucuronoxylanes de hêtre ayant ou non subi un traitement oxydatif par le système FePcS/H ₂ O ₂	116
Figure 72: Présentation du système de photooxydation.....	118
Figure 73 : Filtrats correspondant aux délignifications photochimiques.	120
Figure 74 : Protocole d'extraction des xylanes de châtaignier MGX C ₁ et MGX C ₂	132
Figure 75 : Protocole d'extraction des xylanes d'argan MGX A et HX	133
Figure 76 : Degrés de polymérisation des différents xylanes extraits.....	135
Figure 77 : Superposition des profils d'élution obtenus par analyse HPLC des MGXs et du HX.	136
Figure 78 : Distribution des acides uroniques des xylanes de châtaignier et d'argan après autohydrolyse et analyses par spectrométrie de masse MALDI.	138
Figure 79 : Spectre RMN ¹ H d'un 4- <i>O</i> -méthylglucuronoxylane dans le D ₂ O avec attribution des signaux	141
Figure 80 : Corrélation de la cytotoxicité des xylanes sur la prolifération des cellules A 431	144
Figure 81 : Effets du MGX C ₁ sur la migration des cellules A 431	145
Figure 82 : Effets du MGX C ₁ sur l'invasion des cellules A 431..	145
Figure 83 : Effets du MGX C1 sur la sécrétion par les cellules A 431 des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2.	146

Figure 84 : Principe de la migration et de l'invasion cellulaires en chambre de Boyden..... 182

Abréviations

4-*O*-MeGlcA : Acide 4-*O*-méthylglucuronique
ABTS : Acide 2,2-azino-bis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
ACS : Acétyl-CoA synthétase
AlPcS : Tétrасulfophtalocyanine d'aluminium
Ara : Arabinose
ATP : Adénosine-5'-triphosphate
AU : Acide uronique
AX : Arabinoxylane
BSTFA : N,O-Bis-Triméthylsilyltrifluoroacétamide
CDTA : 1,2 Diaminocyclohexane tétraacétate
CoA : Coenzyme A
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM : Analyse par couplage CPG- spectroscopie de masse
CS : Citrate synthétase
Da : Dalton
DMA : N,N- diméthylacétamide
DMAP : 4-Diméthylaminopyridine
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité optique
DP : Degré de polymérisation
DS : Degré de substitution
EDTA : Ethylène diamine tétraacétate
f : Furanose
FePcS : Tétrасulfophtalocyanine de fer
FeTPPS : Tétraphénylporphyrine sulfonée de fer
Fuc : Fucose
Gal : Galactose
GalA : Acide galacturonique
GAX : Glucurono(arabino)xylane
Glc : Glucose
GlcA : Acide glucuronique
GX : Glucuronoxylane
H₂TPP : Tétraphénylporphyrine
H₂TPPS : Tétraphénylporphyrine sulfonée
HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
HX : Homoxylane
IR : Infrarouge

L-MDH : L-malate déshydrogénase
MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
Man : Mannose
MGX : 4-*O*-méthylglucuronoxylane
MHDP : Métahydroxydiphényle
MnPcS: Tétrасulfophtalocyanine de manganèse
MnTPPS: Tétraphénylporphyrine sulfonée de manganèse
NAD : Nicotinamide-adénine dinucléotide
NiPcS: Tétrасulfophtalocyanine de nickel
ON : Oses neutres
p : Pyranose
PAHBAH : Parahydroxybenzoïque acide hydrazide
Rha : Rhamnose
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SR : Sucres réducteurs
ST : Sucres totaux
TEMPO : 2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-oxyle
THF : Tétrahydrofurane
TMCS : Chlorure de triméthylsilane
TMS : Triméthylsilylation
US : Ultrasons
Xyl_p : Xylopyranosyle
Xyl : Xylose
ZnPcS : Tétrасulfophtalocyanine de zinc

INTRODUCTION GENERALE

La biomasse est une source abondante et renouvelable de biopolymères qui intéressent fortement les acteurs du développement durable et de la Chimie verte. Les matériaux lignocellulosiques, parmi lesquels la cellulose, les hémicelluloses ou encore les lignines, comptent pour environ 80% de cette biomasse. Les hémicelluloses sont, après la cellulose, le second polymère naturel le plus abondant sur Terre. En raison de leurs propriétés chimiques remarquables mais aussi de leurs activités biologiques diversifiées, les hémicelluloses sont aujourd'hui considérées, au même titre que la cellulose et l'amidon, comme des polysaccharides d'intérêt industriel. Encore nettement moins utilisées que leurs homologues, elles sont considérées comme des polymères en devenir si l'on en juge par les valorisations récentes dans le domaine des biocarburants. Elles sont principalement présentes dans les céréales ; le bois en contient également des quantités significatives.

Avec une superficie de 155 000 km², la forêt française représente 28% du territoire ce qui place la France au quatrième rang européen. Elle est aussi essentiellement boisée par des essences feuillues (63%), le chêne étant l'espèce majoritaire. Si l'on en revient à une échelle régionale, un tiers de la superficie du Limousin - soit 5 850 km² - est boisée dont 5 750 km² de forêts de production.¹ C'est dire l'importance de l'industrie du bois dans cette région où le châtaignier y est reconnu comme une essence emblématique. Entre autres caractéristiques, l'activité forestière génère des quantités considérables de déchets et produits connexes tels que les branchages, les souches, les écorces ou encore les sciures. Malgré des législations récentes et contraignantes, moins de 10% de ces produits connexes sont aujourd'hui valorisés, principalement dans le secteur énergétique (plaquettes) et la production de matériaux bois (panneaux de particules, agglomérés...).

C'est dans ce contexte que depuis plusieurs années, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles s'intéresse à de nouvelles pistes de valorisation de la biomasse forestière. Si la fraction cellulosique trouve déjà un grand nombre d'applications technologiques, les hémicelluloses sont, quant à elles, peu exploitées malgré leur grande richesse structurale. Une étude récente² du Laboratoire consacrée à l'analyse de la structure du 4-O-méthyl-glucuronoxylane caractéristique du bois de châtaignier, a permis d'en préciser des propriétés biologiques remarquables dans le domaine de l'oncologie cellulaire et moléculaire. Localisée dans la paroi secondaire des cellules de bois, les hémicelluloses y sont intimement associées à la cellulose et aux lignines. Cette organisation chimique originale explique des propriétés mécaniques remarquables du bois ; elle s'oppose également - *et malheureusement* - à l'extractibilité de cette catégorie de molécule pariétale et constitue donc

le principal frein à leur valorisation. La délignification préalable de la matière lignocellulosique tout comme leur extraction alcaline sont, encore à l'heure actuelle, des prérequis non écoresponsables à l'extraction des hémicelluloses. C'est la raison pour laquelle nous avons engagé cette étude en poursuivant un double objectif :

- proposer de nouvelles approches de délignification physique, biochimique et chimique alternatives et plus respectueuses de l'environnement suivie d'une extraction dans l'eau des hémicelluloses à partir de sciures de châtaignier. Une attention particulière sera portée à cette occasion à la mise en œuvre de photosensibilisants (porphyrine - phtalocyanine) synthétisés et étudiés par ailleurs au Laboratoire dans le domaine de la photothérapie dynamique.
- préciser la relation structure – activité qui explique la variabilité des propriétés biologiques des xylanes sur les cellules cancéreuses A431 issues d'un épiderme vulvaire.

Avec ces objectifs, nous proposons d'apporter une contribution au développement de la valorisation chimique et biologique des xylanes sur le double aspect fondamental et finalisé.

Première partie : La paroi cellulaire végétale, les polysaccharides, la lignine - Etat de la question

Les hémicelluloses sont des polysaccharides de structures complexes et diversifiés qui restent malgré des perspectives attrayantes peu exploités à l'heure actuelle comparativement à d'autres polymères naturels tels que la cellulose ou l'amidon. Cette étude souhaite apporter des réponses à la question de la valorisation chimique et biologique du 4-*O*-méthylglucuronoxylane, une hémicellulose majoritaire chez les bois issus de feuillus (chêne, châtaignier...). Elle y est exclusivement localisée au niveau des parois cellulaires primaires et secondaires dont il convient au préalable de présenter la structure et la formation biologique. Une attention particulière sera portée à la composition chimique et à la structure de grandes familles de molécules essentiellement polysaccharidiques qui la compose. Par ailleurs, les multiples interactions chimiques qui y sont identifiées, si elles structurent mécaniquement la paroi cellulaire, sont aussi un frein pour l'expérimentateur qui souhaiterait en valoriser le contenu. C'est la raison pour laquelle il convient d'apporter dans un deuxième temps des réponses méthodologiques, sélectives d'une part et compatibles d'autre part avec la notion de chimie verte.

I.1. La paroi cellulaire végétale

La paroi cellulaire végétale est un édifice multimoléculaire qui assure la rigidité et qui évolue en fonction de l'âge des tissus végétaux. Elle entoure chaque cellule végétale et est essentiellement constituée de polyphénols, protéines et de glucides (90% de la masse de matière sèche) qui peuvent être des hémicelluloses, des pectines ou de la cellulose.³

Ces différents constituants forment un réseau complexe de macromolécules responsable des propriétés mécaniques de la paroi cellulaire. Elle a par ailleurs une double spécificité : elle doit à la fois être rigide pour jouer le rôle de squelette et de barrière et assurer une certaine élasticité pour permettre la croissance du végétal. Néanmoins, les échanges intercellulaires doivent pouvoir se faire. Ces contraintes paradoxales sont à l'origine de la complexité de la paroi végétale dont l'organisation repose sur trois territoires bien identifiés (Figure 1) :

- La lamelle moyenne, jonction intercellulaire, permet la cohésion cellulaire. Elle est riche en pectines et dépourvue de cellulose.
- La paroi primaire, est composée de pectines, de cellulose et d'hémicelluloses. Sa structure et sa composition chimique évoluent au gré de la croissance cellulaire.
- La paroi secondaire est constituée des éléments de la paroi primaire dans lesquels s'est insérée de la lignine. Elle est plus rigide que la paroi primaire et ne permet plus la croissance cellulaire. On constate une plus grande proportion de cellulose, dont les

microfibrilles sont disposées en hélices et en strates (S_1 , S_2 et S_3 de la Figure 1). Elle est située en-deçà de la paroi primaire car elle est synthétisée postérieurement à celle-ci.

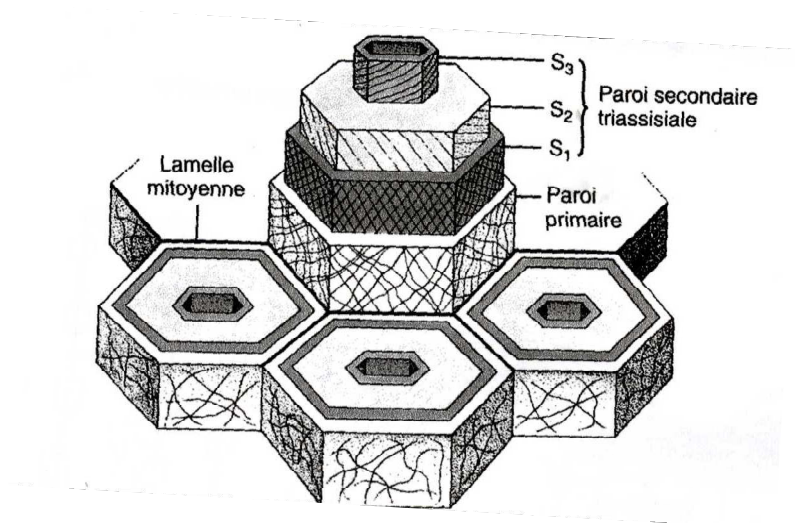


Figure 1 : Vue perspective d'une paroi ligneuse d'après Raven et al. (2007).⁴

I.1.1. Les principaux constituants

Chimiquement, le bois est essentiellement composé de trois biopolymères : de cellulose, d'hémicelluloses, de lignine mais aussi d'extractibles. La proportion relative des différents constituants varie en fonction des essences de bois (Tableau 1) et de la localisation dans la paroi cellulaire. La répartition moyenne des polymères est présentée dans le tableau ci-dessous.⁵

Tableau 1 : Composition relative des différents constituants du bois

	Résineux (% en poids)	Feuillus (% en poids)
Cellulose	42 ± 2	45 ± 2
Lignine	27 ± 2	30 ± 5
Hemicelluloses	28 ± 3	20 ± 4
Extractibles	3 ± 2	5 ± 3

I.1.1.a. La cellulose

La cellulose est la molécule la plus abondamment synthétisée sur Terre en représentant au moins la moitié de la biomasse.⁶ C'est aussi le polymère naturel le plus valorisé, que ce soit sous forme de fibres textiles, de papiers ou à l'état modifié d'esters (acétates ou nitrates de cellulose) ou encore d'éthers. Cet homopolymère linéaire a pour unité de répétition le cellobiose, motif composé de deux D-glucopyranoses en conformation 1C_4 liés par une liaison

glucidique β (1 \rightarrow 4). Le degré de polymérisation (DP) qui représente le nombre d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose est très difficile à estimer et ce pour deux raisons. La première est la difficulté de solubiliser la cellulose sans la dégrader. La seconde provient du fait de la très grande variabilité des DP selon la provenance et la situation de la cellulose au sein de la paroi, allant de quelques centaines à plusieurs milliers. La disposition des hydroxyles libres des glucoses permet l'établissement de liaisons hydrogènes intramoléculaires, stabilisant la cellulose dans son orientation linéaire ce qui lui confère une certaine rigidité, et des liaisons intermoléculaires qui relient plusieurs macromolécules et les maintiennent disposées parallèlement (Figure 2). Ainsi, l'association de nombreuses chaînes de cellulose favorise l'établissement d'un état solide ordonné, pseudocristallin et permet la formation de microfibrilles. La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance mécanique à la traction, ainsi que son caractère non-soluble dans l'eau. Pratiquement, la fraction cellulosique est considérée comme étant le résidu insoluble après l'extraction complète des autres polysaccharides de la paroi par des agents chélateurs et /ou des bases minérales.

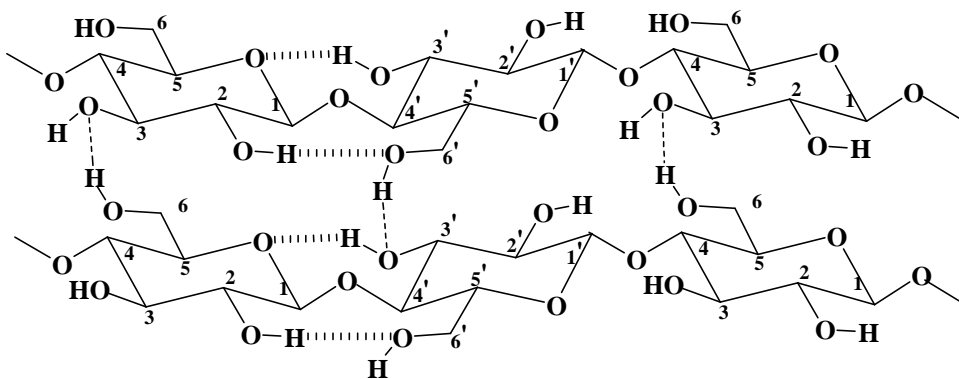


Figure 2 : Liaisons hydrogène intra et intermoléculaires dans la cellulose

1.1.1.b. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses désignent à l'origine les polysaccharides pariétaux alcalinosolubles ; cependant certains d'entre-eux tels que les arabinanes et les arabinogalactanes sont extraits par l'eau. Par extension, les hémicelluloses regroupent donc tous les polysaccharides présents dans les parois des cellules végétales qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques. Contrairement à la cellulose, elles possèdent une grande variété structurale qui dépend de l'origine botanique, de l'âge des cellules et de leur localisation dans la paroi végétale. Leur DP est également plus faible, dépassant rarement 200. Les unités glucidiques peuvent s'agencer de multiples façons dans les hémicelluloses, ce qui explique leur grande diversité. Toutefois, les hémicelluloses sont décrites comme étant constituées d'un axe osidique principal linéaire sur lequel peuvent être fixés des motifs variés. Si

l'enchaînement est constitué d'un seul type de monomère, il s'agira d'un homopolysaccharide, sinon d'un hétéropolysaccharide. Les liaisons qui unissent ces monomères sont elles aussi très variées. Concernant le nom donné aux hémicelluloses, le suffixe-*'ane'* désigne la nature polymérique de l'axe osidique, précédé directement par le nom de la chaîne principale. Les unités la substituant étant signifiées en premier. Par exemple, les xylandes sont construits à partir d'une chaîne de xyloses et les xyloglucanes à partir d'une chaîne de glucoses, plus ou moins substituée par des unités de xylose. Les hémicelluloses peuvent être classées selon cinq grandes familles : les xyloglycanes (ou xylandes), les mannoglycanes (ou mannanes) (Figure 3), les xyloglucanes, les β -D-glucanes (avec des liaisons mixtes 1 \rightarrow 3 et 1 \rightarrow 4) et les arabinogalactanes.⁷

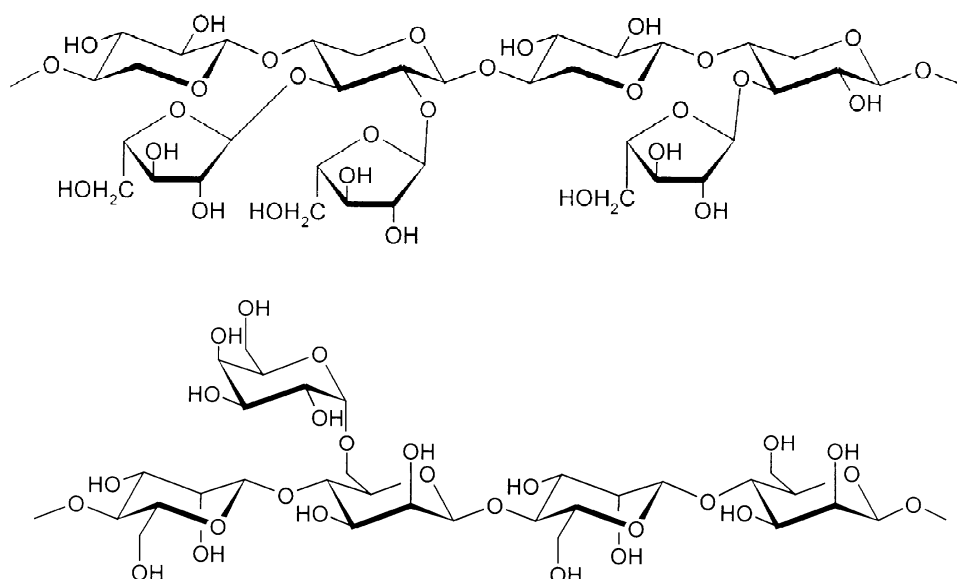


Figure 3 : Exemples de structures d'hémicelluloses : en haut un L-arabino-D-xylane (AX) et en bas un D-galacto-D-mannane (selon Ebringerová et *al.*,⁷)

Les *O*-acétyl-4-*O*-méthylglucuronoxylanes sont les hémicelluloses majoritaires des essences forestières de feuillus (chêne, châtaignier...) ou les glucomannanes, bien que minoritaires, sont aussi caractérisés fréquemment. Les *O*-acétyl-galactomannanes sont en revanche les polysaccharides dominants dans le cas des résineux avec une faible quantité d'arabino-4-*O*-méthylglucuronoxylanes. Les xyloglucanes sont les principaux types d'hémicelluloses trouvées dans la paroi primaire chez la plupart des résineux.

1.1.1.c. Les pectines

Elles constituent l'essentiel des lamelles moyennes qui assurent la cohésion entre les cellules. On parle alors de ciment pectique. Les chaînes principales des pectines sont constituées de motifs d'acides galacturoniques liés en α -(1 \rightarrow 4) (acides polygalacturoniques) dans lesquelles s'intercalent des résidus de L-rhamnose liés en (1 \rightarrow 4) et (1 \rightarrow 2). Cette

insertion crée des déviations de la chaîne appelées coudes pectiques. A l’instar des hémicelluloses, la structure des pectines est très variée puisque des chaînes latérales comme des arabinanes, des galactanes ou des arabinogalactannes peuvent se greffer sur le squelette rhamnogalacturonique. Les fonctions acides sont souvent estérifiées par des groupes méthyles ou salifiées par des ions mono ou divalents tels que le potassium, le sodium ou le calcium. Ces structures donnent sous certaines conditions des gels. Le degré de polymérisation, de méthylestérification et la distribution de ces groupes méthyles sont autant de paramètres qui vont jouer sur la solubilité de ces molécules. C’est pour cela qu’elles sont classées selon leur mode d’extraction ; à l’eau chaude pour les pectines hautement méthylestérifiées, par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d’ammonium) pour les pectines faiblement méthylestérifiées et à l’acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique).⁸

1.1.1.d. Les lignines

Les lignines sont des polyphénols issus de la copolymérisation de trois alcools dits phénylpropénoïques ou encore appelés monolignols: l’alcool coumarylique, l’alcool coniférylique et l’alcool sinapylique.

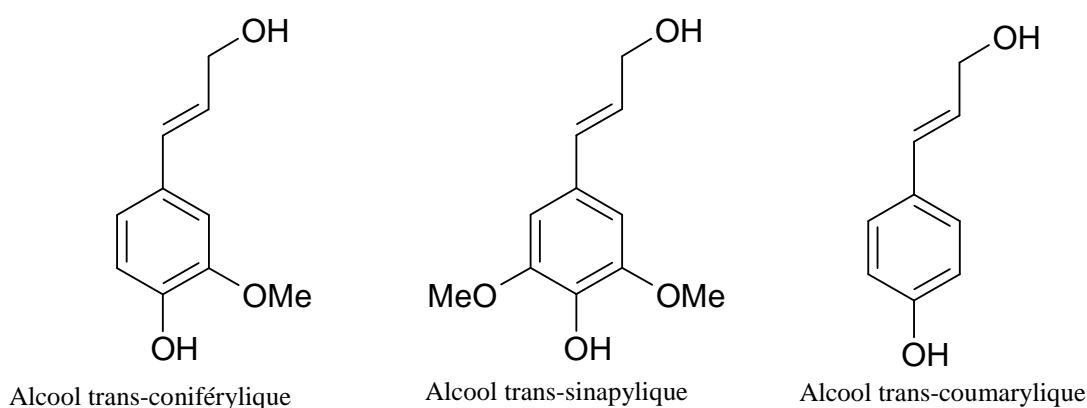


Figure 4: Structure des monolignols

Elles sont le deuxième constituant du bois à hauteur de 30% de la masse sèche chez les résineux et de 20% chez les feuillus. Leur structure est très complexe à cause de la présence de nombreux types de liaisons (Figure 5) entre les diverses unités C-9. Les pourcentages correspondant à ces liaisons trouvées chez les feuillus et les résineux sont présentés dans le Tableau 2.⁹

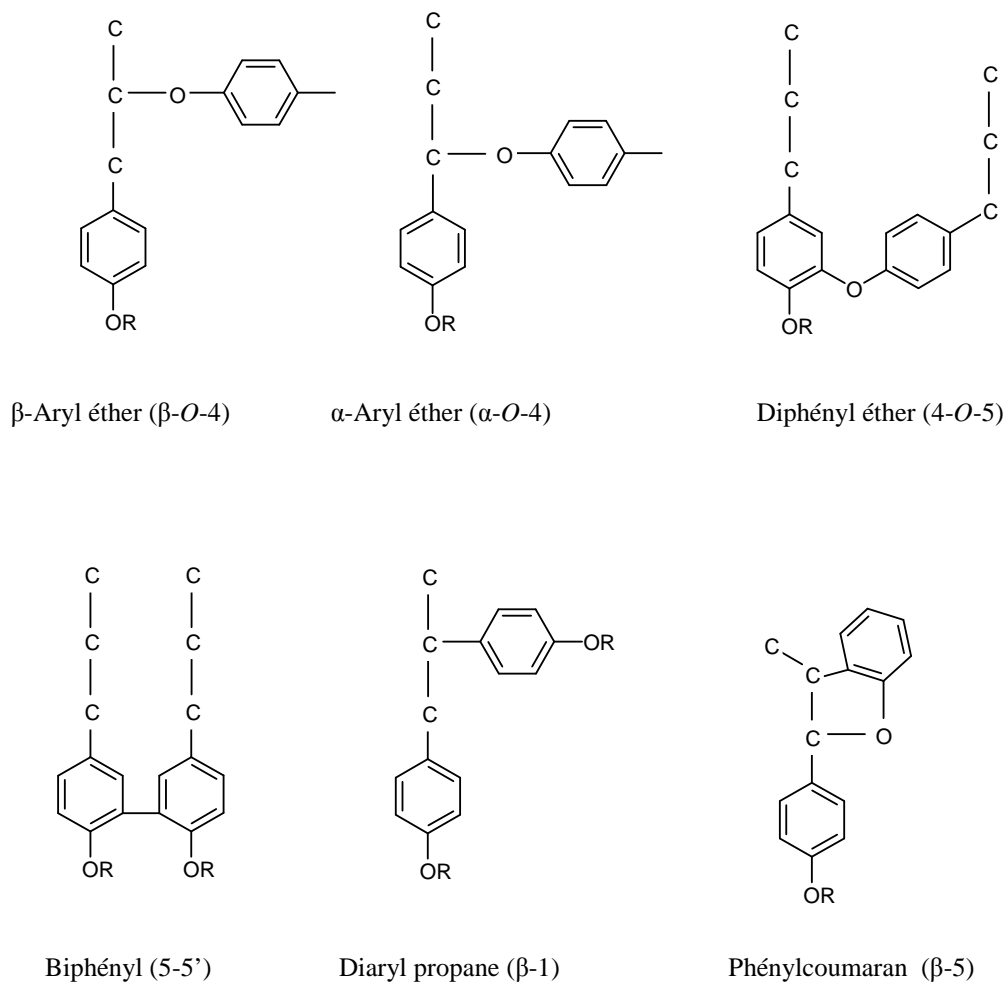


Figure 5 : Motifs typiques présents dans la lignine

Tableau 2 : Pourcentages des liaisons les plus communes retrouvées dans les lignines de feuillus et résineux⁹

Types de liaisons	Résineux ^a	Feuillus ^a
β -Aryl éther (β -O-4)	45-48	60
α -Aryl éther (α -O-4)	6-8	6-8
Diphényl éther (4-O-5)	3,5-8	6,5
Biphényl (5-5')	9,5-17	4,5
Diaryl propane (β -1)	7-10	8
Phénylcoumarane (β -5)	9-12	6

^a % total des unités phénylpropane

Contrairement à d'autres polymères végétaux, tels que la cellulose, pour lesquels une formule structurale générale existe, la structure des lignines ne peut pas être définie de manière claire par la répétition d'unités caractéristiques car elles sont liées entre elles de façon multiple et plus ou moins aléatoire.

Dans la paroi cellulaire, les monolignols peuvent être oxydés en radicaux libres sous l'influence d'enzymes (laccases et *peroxydases*), et ce, de façon aléatoire expliquant ainsi la grande diversité structurale des lignines. La proportion des trois monomères et les liaisons

intramoléculaires sont très variables selon l'origine botanique, le tissu et la localisation au sein de la paroi. Chez les résineux, la structure de la lignine dérive à plus de 95% de l'alcool coniférylique tandis que chez les feuillus, elle provient de l'alcool coniférylique mais aussi de l'alcool sinapylique. Dans la lignine issue de paille de blé et des autres poacées, la présence d'alcool coumarylique est typique.¹⁰ La lignification est associée au développement des systèmes vasculaires des plantes et cette polymérisation *in situ* s'accompagne de liaisons covalentes avec la cellulose et les hémicelluloses, ce qui assure la bonne rigidité de la paroi, mais s'oppose à une bonne extractabilité des constituants pariétaux, en général et des hémicelluloses, en particulier. Les lignines sont très résistantes à de nombreux agents chimiques et biochimiques. Comme on le verra en détail plus loin, de nombreuses voies d'extraction et de dégradation des lignines existent ; elles sont souvent spécifiques de différents types de liaisons du polymère. Leur caractérisation et leur analyse structurale nécessitent l'emploi de méthodes douces capables de dépolymériser le réseau tridimensionnel sans pour autant dégrader les noyaux aromatiques, ni même la chaîne propane. Cependant, du fait des procédés d'extraction, les lignines isolées (lignines d'extraction) sont souvent différentes des lignines *in situ* (protolignines). Le terme de « lignine de Klason » est parfois employé pour désigner le résidu obtenu après avoir débarrassé la paroi des extractibles hydrophiles et lipophiles et des polysaccharides par de l'acide sulfurique concentré. Lorsqu'elles sont extraites par le bisulfite en milieu acide, les lignines conduisent à des composés nommés lignosulfonates, utilisés à l'échelle industrielle comme plastifiant ou complexant, par exemple. De manière générale, les lignines sont aussi utilisées comme additifs dans des matériaux adhésifs.

1.1.1.e. Autres constituants

Les substrats lignocellulosiques renferment aussi les extractibles c'est-à-dire des composés solubles dans des solvants organiques (éther de pétrole, méthanol, acétone, dichlorométhane...) ou dans l'eau. Le terme d'« extractibles » peut englober les constituants du bois autres que la cellulose, les hémicelluloses et les lignines. Ils comprennent un très large éventail de substances chimiques (plusieurs milliers de composés), souvent de faibles masses moléculaires. Ces substances peuvent être lipophiles ou hydrophiles et isolés par extraction. Le terme « résine » est souvent utilisé pour englober tous les extractibles lipophiles (exceptions faites des substances phénoliques) pouvant être extraits par des solvants organiques non polaires. De manière générale, les composants majeurs des résines des bois résineux sont des acides gras ou leurs esters glycériques, et des terpènes. Les tannins sont des

oligomères de faibles poids moléculaires. Ils représentent environ 2 à 5 % de la masse du bois. Ils peuvent être divisés en deux grands groupes : les tannins hydrolysables (mélange de composés phénoliques simples) et les tannins condensés ou tannins cathéchiques (constitués à partir de monomères appelés flavonoïdes). La paroi contient aussi généralement des protéines (entre 3 et 6%) sous formes de glycoprotéines comme les extensines ou des enzymes telles que les *peroxydases* ou des *glycosidases*.

I.1.2. La paroi secondaire des cellules de bois

I.1.2.a. Présentation générale

La paroi secondaire se forme à la fin du processus d'élongation cellulaire de la paroi primaire et se dépose à l'intérieur de celle-ci. Ses propriétés mécaniques remarquables permettent à la plante de poursuivre sa croissance verticale tout en lui assurant une certaine rigidité. Son rôle est primordial dans le cas de cellules spécialisées qui assurent entre autres des fonctions de coordination ou de maintien. La paroi secondaire est sujette à de nombreux stress tels la tension ou la compression. Elle possède par ailleurs de nombreuses fonctions parmi lesquelles l'adhésion cellulaire, la régulation de la croissance et un effet barrière contre les pathogènes.¹¹ C'est enfin le lieu de dépôt des 4-*O*-méthylglucuronoxylanes, hémicellulose modèle de cette étude.

I.1.2.b. Aspect structural

La paroi secondaire représente environ 60% de la paroi cellulaire et est moins riche en eau que la paroi primaire. Elle est constituée de trois sous-couches S₁, S₂ et S₃, que l'on peut distinguer visuellement grâce à l'orientation différente que prennent les microfibrilles de cellulose dans ces sous-couches. La couche S₁ représente 5 à 10% de l'épaisseur total de la paroi cellulaire et l'orientation de microfibrilles de cellulose est de 60 à 80° par rapport à l'axe longitudinal de la cellule. La couche S₂ compte pour 75 à 85 % de la paroi et est la plus importante au vu des propriétés mécaniques du bois. Ses microfibrilles de cellulose y ont une orientation de 5 à 30° nettement plus prononcé que dans la sous-couche S₃ (60 à 90°) (Figure 1). Cette dernière sous-couche, la plus interne, est relativement fine.

La cellulose et les hémicelluloses y apparaissent néanmoins comme mieux organisées structurellement que dans la paroi primaire. Les parois secondaires sont organisées de façon hélicoïdale ce que Reis¹² explique au travers d'une interaction avec les xylanes. En effet, dans la paroi secondaire, il existe une étroite corrélation entre la présence des glucuronoxylanes et l'apparition d'une organisation hélicoïdale. De plus à la surface des microfibrilles de cellulose des acides sont directement pontés suggérant que les microfibrilles sont cocrystallisées avec

les glucuronoxylanes et induisent l'arrangement hélicoïdal des microfibrilles. Plusieurs études ont montré que la structure des xylanes était elle-même hélicoïdale par diffraction des rayons X ou par calculs théoriques. Dans le cas du xylane natif (c'est-à-dire sans aucune substitution), les hélices les plus stables sont des hélices droites en considérant au départ qu'elles contenaient 2 à 6 résidus par tour d'hélice.¹³ Les résultats obtenus ont montré que seules les configurations avec un pas compris entre 10 et 15 Å (2 ou 3 résidus par tour d'hélice) sont favorables énergétiquement. Ces résultats sont en accord avec les résultats de diffraction des rayons X de Atkins.¹⁴ Les arabinoxylanes possèderaient quant à eux une conformation semi-flexible. Dans ce cas, la substitution de la chaîne de xylose par de l'arabinose n'aurait pas d'influence sur la conformation et les propriétés macromoléculaires des arabinoxylanes.¹⁵ La présence de chaînes latérales d'arabinose induit cependant une contrainte stérique qui oriente la conformation vers une organisation de type « three-fold helical ».¹⁶

1.1.2.c. Biosynthèse de la paroi secondaire

Le dépôt de la paroi secondaire est un phénomène complexe dont le contrôle et la régulation durant la croissance de la plante ne sont aujourd'hui pas totalement expliqués.¹⁷ De nombreuses enzymes sont impliquées dans la synthèse, la modification et la dégradation des oligo- et polysaccharides. La synthèse des glycosides est réalisée par des glycotransférases, leur modification par des carbohydre-esterases et la rupture des liaisons glycosidiques par des glycoside-hydrolases ou des polysaccharide-hydrolases.

➤ *Biosynthèse de la cellulose*

Les chaînes de β -D-glucanes dont est composée la cellulose sont assemblées chez les plantes par la cellulose synthase, qui se présente sous la forme de complexes enzymatiques transmembranaires. Ces derniers sont organisés en structures hexagonales appelées rosettes dont le diamètre est d'environ 25 à 30 nm. Elles utilisent de l'UDP-glucose (uridine-diphosphoglucose) comme substrat de la réaction afin d'induire la synthèse de chaînes de β -D-glucanes qui s'organisent ensuite sous forme de microfibrilles.¹⁸

➤ *Biosynthèse de la lignine*

Les trois monolignols qui entrent dans la composition de la lignine ne diffèrent que par les substitutions sur le cycle aromatique. Ils proviennent tous d'un seul acide aminé : la phénylalanine. D'autres classes de molécules aromatiques contenues dans les plantes telles que les flavonoïdes, les stylobènes, les coumarines et les dérivés d'acides benzoïques, sont

aussi dérivées de la phénylalanine. Cette biosynthèse est un processus multi-étapes qui fait appel à de nombreuses enzymes (lyases, transférases, hydrolases...) (Figure 6).

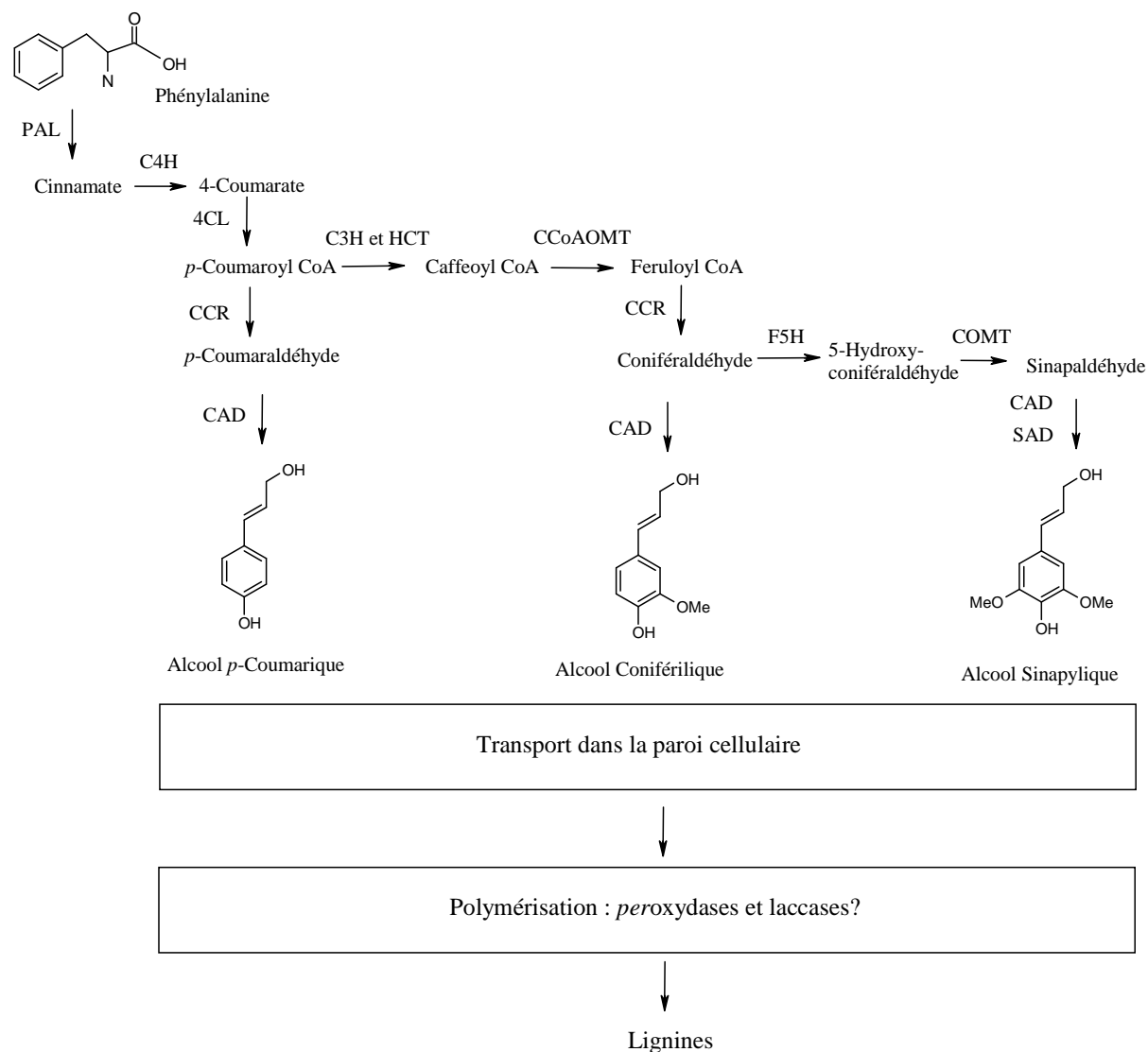


Figure 6 : Schéma simplifié de la voie biosynthétique des lignines chez les angiospermes d'après Boudet *et al.*,¹⁹. Abréviations : PAL, phénylalanine ammonialyase ; C4H, cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL, 4-coumarate CoA ligase ; C3H, *p*-coumarate 3-hydrolase ; HCT, *p*-hydroxycinnamoyl-CoA :quinat shikimate *p*-hydroxycinnamoyl-CoA transférase ; CCoAOMT, cafféoyl-CoA *O*-méthyltransférase ; CCR, hydroxycinnmoyl-CoA reductase ; F5H, férulate 5-hydroxylase ; COMT, acide cafféique/acide 5-hydroxyférulique *O*-méthyltransférase ; CAD, alcool cinnamylique déshydrogénase ; SAD, alcool sinapylique déshydrogénase.

En raison de leur toxicité, les monolignols ne peuvent s'accumuler en grandes concentrations dans la paroi cellulaire végétale. Les groupes hydroxyles phénoliques de ces monolignols sont alors glycosidés pour donner des composés plus stables et non toxiques.²⁰

➤ *Biosynthèse des hémicelluloses*

La biosynthèse des hémicelluloses a lieu dans l'appareil de Golgi et est suivie par le dépôt dans la paroi cellulaire par exocytose : des vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et leur contenu, ici les hémicelluloses, est relargué dans le milieu extracellulaire. Dans le règne végétal, la diversité structurale des hémicelluloses est grande et dépend à la fois du type de plante et de sa localisation dans la plante. C'est pour cela que tout un panel d'enzymes est nécessaire pour leur biosynthèse ; des glycosyltransférases principalement mais des hydrolases, des lyases et des estérases peuvent intervenir afin de modifier la structure des polysaccharides. Parmi les hémicelluloses, le galacto(gluco)mannane est celui dont la biosynthèse est la plus détaillée.¹⁸ Dans le cas des arabinoxylanes, majoritairement présents chez les graminées, des activités de xylosyl-transférases et d'arabonisyl-transférases ont été détectées dans des fractions isolées de blé et l'orge.²¹ La biosynthèse des glucuronoxylanes requiert pour sa part une xylosyltransférase. Le greffage latéral des acides glucuroniques par une glucuronyltransférase tout comme l'incorporation des groupes méthyliques n'est à ce jour, pas compris.²²

➤ *Formation de la paroi secondaire*

Lors de la formation de la paroi secondaire, la localisation et la fonction précise de chaque composant n'est, là aussi, pas totalement compris. De nombreuses études proposent des mécanismes de lignification de la paroi secondaire. Selon Awano et coll.,²³ chez le hêtre du Japon, les microfibrilles de cellulose néosynthétisées sont déposées dans la couche la plus interne de la paroi secondaire et recouvertes d'une fine couche de xylanes déposée ultérieurement. Par la suite, les dépôts successifs de xylanes augmentent le diamètre des microfibrilles leur donnant un aspect globulaire. La lignine se dépose simultanément avec les xylanes de façon à rendre homogène l'apparence de la paroi cellulaire. Les complexes lignine-hémicelluloses chez le ginkgo forment des tubules dont la taille dans la couche S₂ est estimée à 16 nm de long, 25 nm de diamètre et 4 nm d'épaisseur environ. Ils remplissent les espaces entre les microfibrilles de cellulose²⁴. Ruel et coll.,²⁵ précisent ces modèles chez le peuplier (Figure 7). Ainsi les xylanes ne seraient pas déposés tous en même temps lors de l'épaississement de la paroi cellulaire et donc pas répartis de façon homogène. Une première partie des xylanes (xylanes 1 sur la Figure 7) est liée aux microfibrilles de cellulose permettant leur agencement hélicoïdal.¹² Une première couche de lignine condensée est ensuite déposée alors que les types non condensées sont déposés plus tard. La deuxième partie

des xylanes fortement liée à la lignine s'accumule avec cette dernière. Les cycles aromatiques se positionnent de façon parallèle aux microfibrilles de cellulose. Dans ce cas, les xylanes sont des structures hôtes pour les précurseurs de la lignine.¹² L'ensemble des molécules de par leur diversité structurale, leur localisation et fonction spécifique au sein de la paroi participe à la cohésion et à la rigidité de la paroi secondaire.

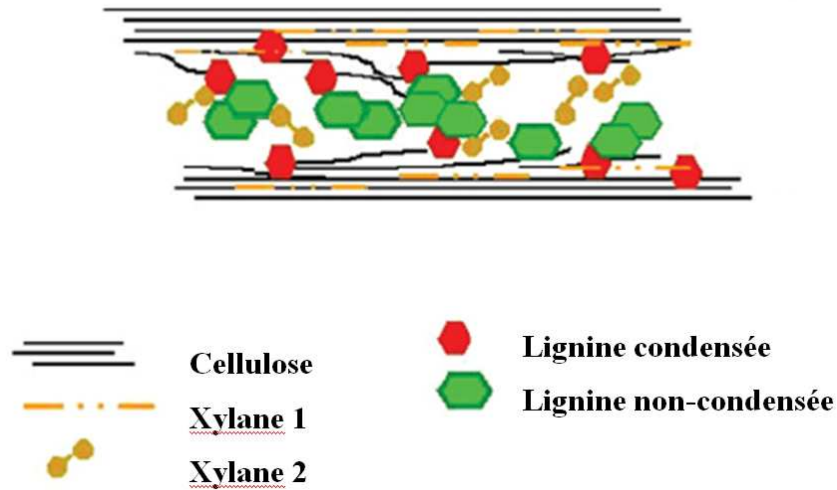


Figure 7 : Représentation d'un possible assemblage des polymères pariétaux lors de la formation de la paroi secondaire (d'après Ruel *et al.*,²⁵).

La paroi secondaire se présente alors comme un arrangement complexe et tridimensionnel de macromolécules essentiellement polysaccharidiques, arrangement dont Bidlack *et coll.*,¹⁷ proposent une représentation dans le cas des poacées (Figure 8).

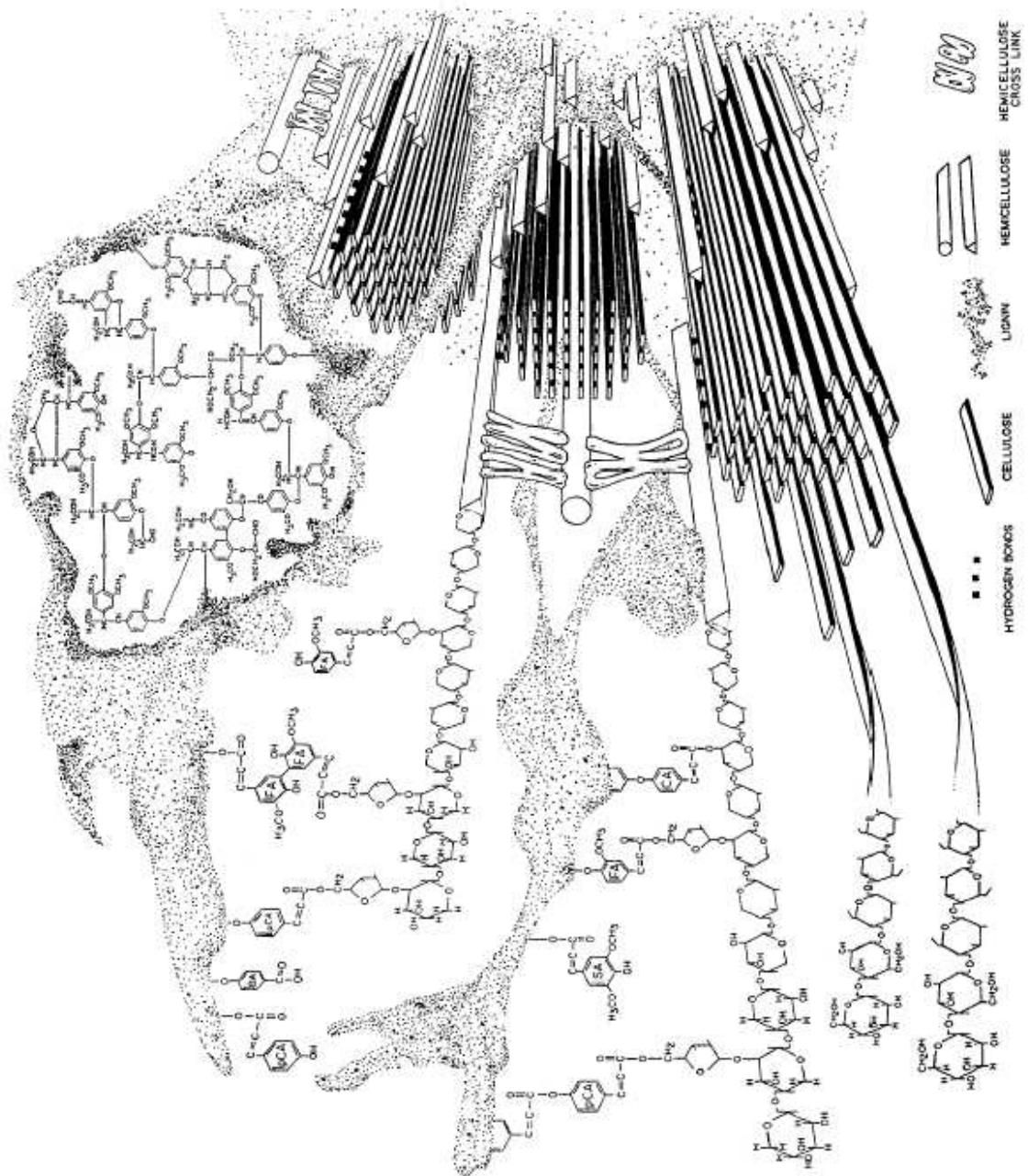


Figure 8 : Structure de la paroi secondaire chez les poacées (d'après Bidlack et coll.,¹⁷)

1.1.2.d. Interactions entre les polyosides constitutifs de la paroi secondaire

Au sein de la paroi secondaire, les composants sont étroitement associés et interagissent via diverses associations physiques et chimiques. Ces liaisons qu'elles soient covalentes, hydrogène ou ioniques ont un rôle dans la structure et la stabilité de la paroi. Cependant elles conditionnent aussi l'extractabilité des polysaccharides constitutifs. Les protocoles devront alors être adaptés selon la nature de la liaison et le type de polymère pariétal à extraire, la lignification de la paroi engendrant une difficulté supplémentaire par rapport à la paroi primaire.

➤ *Interactions cellulose-hémicelluloses*

De nombreuses liaisons hydrogène peuvent se former entre les hémicelluloses de la paroi et la cellulose par l'intermédiaire de leurs groupements hydroxyle. Mais des liaisons plus fortes peuvent exister. Gurjanov et *coll.*,²⁶ ont ainsi pu isoler un galactane fortement lié à de la cellulose dans la paroi gélatineuse de fibres de lin, paroi secondaire typique des fibres de produits agricoles et des bois de tension. Le galactane a probablement été piégé lors de la cristallisation des microfibrilles de cellulose. Des interactions cellulose-galactomannanes ont été caractérisés par RMN ¹³C²⁷ dans le caroube. Dans ce cas, il semblerait que les liaisons impliqueraient uniquement les résidus mannose. La nature de l'hémicellulose intervient dans l'interaction avec la cellulose. En effet, Akerholm et *coll.*,²⁸ ont montré que le glucomannane et le xylane, les deux hémicelluloses majoritaires du bois d'épicéa, ne sont pas associés de la même façon à la cellulose. Le glucomannane serait lié de façon plus intime à la cellulose que le xylane, suggérant alors que ces deux polysaccharides n'ont pas le même rôle au sein de la paroi végétale du bois. Un tel constat est justifié par Tokoh et *coll.*,²⁹ qui suggèrent que les acides uroniques, que l'on retrouve chez les glucuronoxylanes, empêcheraient les interactions avec la cellulose, conduisant alors à des altérations de la structure pseudo-cristalline de la cellulose.

➤ *Interactions hémicellulose-lignine*

Les lignines peuvent établir des liaisons étroites avec les hémicelluloses par l'intermédiaire de liaisons glycosidiques, benzyl éther et benzyl ester.³⁰ Dans le cas des liaisons ester, elles s'établissent souvent entre l'un des groupes carboxyle d'un

glucuronoxylane avec l'un des groupes hydroxyle de la lignine.^{31,32} Ces liaisons sont alcalilabiles contrairement aux liaisons éther, plus stables tant en milieu acide que basique. Ces dernières relient le carbone C2 ou C3 des unités de xylose (dans le cas de glucuronoxylanes) avec les carbones α et γ du groupement phénylpropane de la lignine.^{33,34} Dans le cas des poacées l'association covalente entre les arabinoxylanes, hémicelluloses majoritaires, et la lignine se met en place via les acides phénoliques (notamment l'acide coumarique, l'acide férulique et leurs dimères) qui substituent la chaîne principale.³⁵ Les liaisons sont alors de type éther via leur groupe hydroxy-phénol ou de type ester par l'intermédiaire de leurs fonctions carboxyliques puisque ces acides sont des molécules bifonctionnelles.³⁶ Il semblerait que les liaisons engageant les acides féruliques et la lignine soient des liaisons éther. Selon Jacquet,³⁷ l'acide férulique serait lié à la position β de l'alcool coniférylique, précurseur de la lignine. Cela implique que les acides féruliques liés par des esters aux arabinoxylanes soient co-polymérisés de façon oxydative avec les précurseurs des lignines, du moins dans le cas des poacées. Ils apparaissent comme des points de d'accroissement pour la lignine ainsi fortement associée aux hémicelluloses. Des liaisons phénylglycosides formées par la réaction des unités réductrices des xylanes avec les groupements hydroxyles phénoliques de la lignine sont également fréquemment rencontrées. Ce type de liaison est facilement rompu en milieu acide. La structure des polysaccharides et en particulier des hémicelluloses tout comme leur mode d'association avec la lignine sont des facteurs potentiellement déterminants de l'édification comme de la structure finale ation de la paroi végétale lignifiée.

La Figure 9 résume les différents types de liaisons ester et éther rencontrées dans les parois lignifiées. Les liaisons ester entre les fonctions carboxyliques des glucuronoxylanes, par exemple, et les hydroxyles des lignines sont représentées, ainsi que les liaisons éther entre polysaccharides et lignines. Des esters hydroxycinnamiques peuvent être liés directement aux polysaccharides. Un acide férulique bifonctionnel peut former des pontages covalents de type ester-éther entre les polysaccharides et les lignines ou par l'intermédiaire de l'acide déhydrodiférulique, former des ponts diester entre polysaccharides et être éthérifié à la lignine. L'acide *para*-coumarique n'est pas impliqué dans de tels pontages. Il s'associe aux constituants de la paroi après lignification sous forme de liaisons éther et surtout ester.

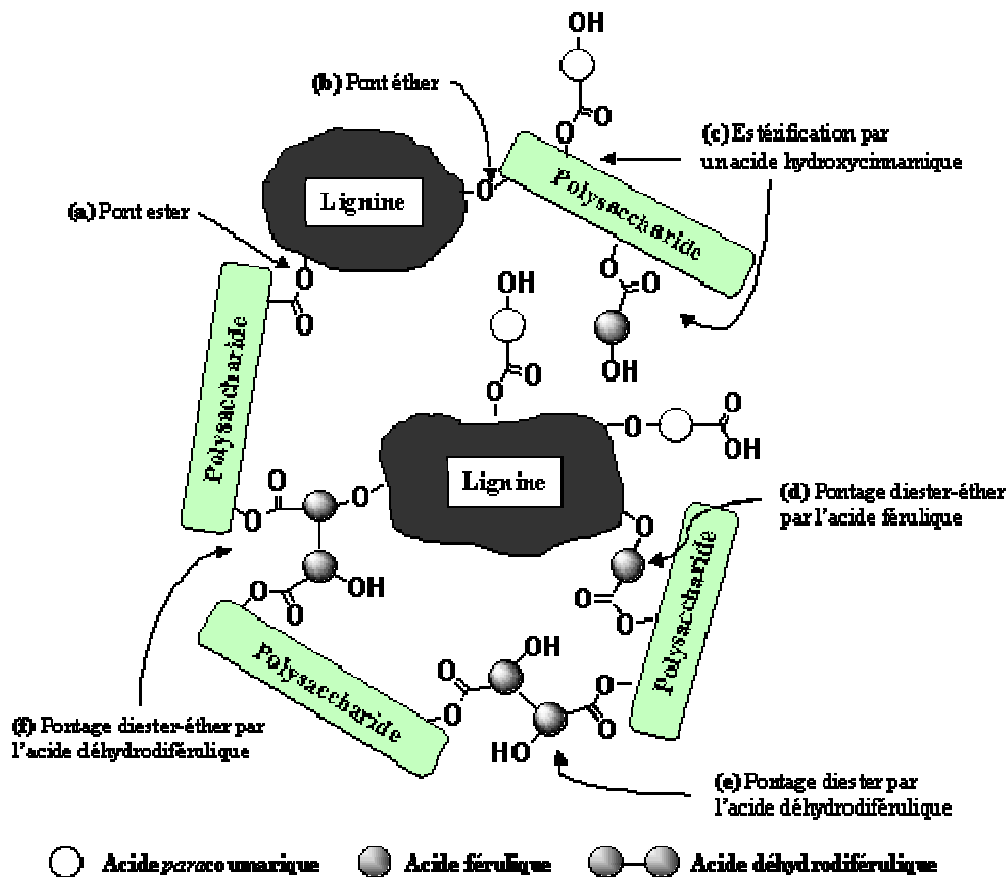


Figure 9 : Possibles liaisons covalentes entre les xylanes et les lignines dans la paroi végétale (d'après Iiyama et coll.,³⁸)

➤ Interactions cellulose-lignine

Les interactions entre la cellulose et la lignine sont comparables à celles qui associent entre elles les hémicelluloses (liaisons hydrogène, liaisons électrostatiques et liaisons covalentes) grâce aux nombreux groupements hydroxyles de la cellulose.³⁰ La connaissance actuelle de l'existence d'associations entre la lignine et la cellulose lors de la formation de la paroi secondaire se limite principalement à des calculs théoriques.^{39,40} Ces calculs suggèrent un certain niveau d'organisation des noyaux aromatiques de la lignine dans la paroi cellulaire native. Ils s'orienteraient préférentiellement de façon parallèle à la surface de la paroi cellulaire et à proximité de la matrice cellulosique. Les précurseurs de la lignine s'adsorbent à la surface des microfibrilles de cellulose au travers d'interactions fortes, influençant par la même l'organisation spatiale de la lignine.

I.2. Les xylanes du bois

Les xylanes sont les hémicelluloses majoritaires du bois et en particulier des bois de feuillus, dont fait partie le châtaignier. Ils n'en sont cependant pas les seuls constituants. Comme cela a été mentionné précédemment, la paroi cellulaire est un compartiment caractéristique de la cellule végétale riche en macromolécules de structures diversifiées. Les protocoles d'extraction à utiliser doivent donc être suffisamment sélectifs afin de permettre l'extraction d'une catégorie de molécules tout en préservant l'intégrité de leur structure. De nombreux protocoles d'extraction plus ou moins sélectifs des xylanes sont décrits dans la littérature. Cependant selon l'origine du matériel végétal et/ou la voie de valorisation envisagée pour les xylanes qui peuvent en être extraits, les protocoles sont évolutifs.

Dans le cas de l'extraction à partir du bois (Figure 10), des contraintes supplémentaires existent. En effet, les xylanes de bois sont fortement liés à la cellulose et aux lignines. La dégradation oxydative des lignines, souvent utilisé pour l'extraction des xylanes, ne permet pas d'isoler des structures natives. De nombreux auteurs préconisent la rupture préalable des liaisons covalentes entre la lignine et les xylanes. La solution classique pour extraire les xylanes est l'extraction alcaline qui permet de rompre les liaisons esters entre xylane et lignine et donc de récupérer en solution les hémicelluloses. Dans ce cas, l'acétylation native des xylanes n'est toutefois pas conservée. Le schéma général classique de séparation des différents constituants du bois est présenté Figure 10.

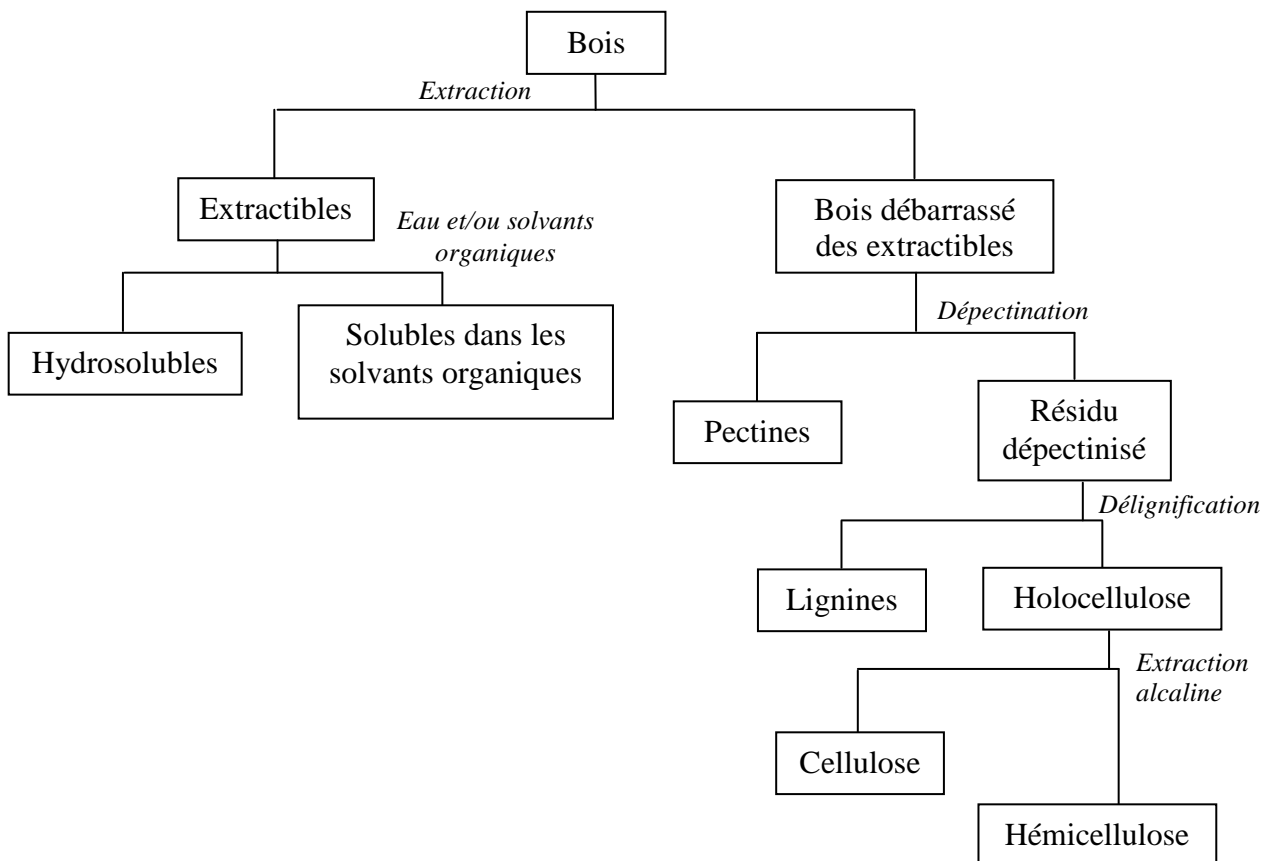


Figure 10 : Séparation des constituants du bois (selon Baeza et Freer⁴¹)

Après les poacées où les xylanes peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse de certains tissus de grains de céréales, le bois est la principale source de xylanes terrestres. Ils pourront y représenter de 25 à 35 % de la matière sèche du bois.⁷ Les xylanes sont extraits sous différentes formes structurales. Les homoxylanes (HX) composés de résidus xyloses liés par des liaisons β -(1→3)(a), β -(1→4)(b) ou mixtes β -(1→3, 1→4)(c) en sont les représentants les plus simples. Ils sont identifiés principalement chez les algues. Cependant, Habibi et *al.*,⁴² les ont récemment identifiés dans le péricarpe d'argan.

Plus généralement ces polymères dont les motifs D-xylopyranosyl de conformation 4C_1 sont liés par des liaisons β -(1→4) pouvant être ramifiés par de courtes chaînes carbonées telles des acides glucuroniques, des 4-O-méthyl éthers, des L-arabinose pour former des arabinoxylanes (AX), des glucuronoxylanes (GX), ou encore des 4-O-méthylglucuronoxylanes (MGX). Il existe également des hétéropolysaccharides plus complexes comme les glucurono-arabinoxylanes ou les arabinoglucuronoxylanes ayant la même structure que les AX ou les GX sur lesquels se greffent d'autres monosaccharides sur les chaînes latérales.

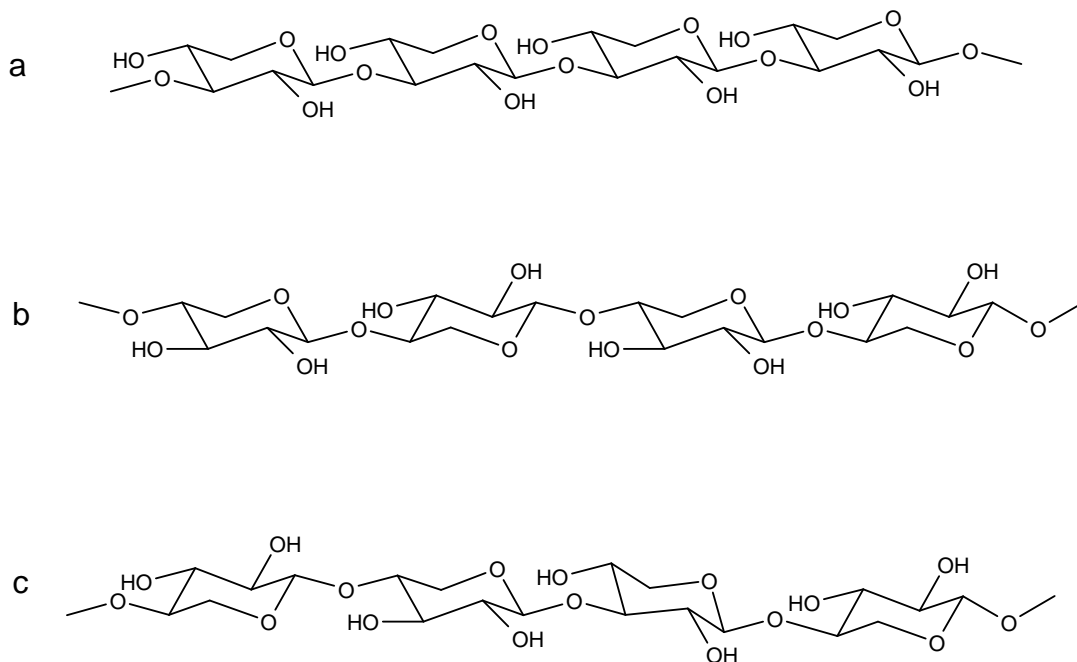


Figure 11 : Structures d'homoxylanes (selon Ebringerova⁴³)

Les glucuronoxylanes (GX) sont des hémicelluloses très présentes dans le bois notamment de feuillus.² Ils possèdent outre la chaîne xylane un groupement acide 4-*O*-méthyl- α -D-glucopyranosyluronique lié à la chaîne principale en position 2. La proportion 4-*O*-méthyl- α -D-glucopyranosyluronique/xylane est variable selon les conditions d'extraction utilisées ; le ratio est en moyenne de 1 pour 10.⁷

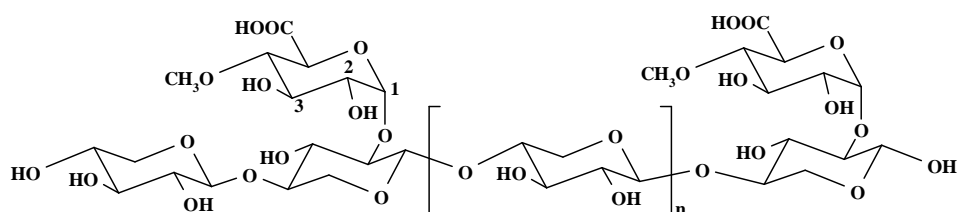


Figure 12 : Structure du 4-*O*-méthyl-D-glucurono-D-xylane (MGX) (selon Ebringerova⁴³)

Cette structure appelée 4-*O*-méthyl-D-glucurono-D-xylane (MGX) est l'hémicellulose principale du bois de châtaignier. A l'état natif, les xylanes sont *O*-acétylés en position 2 et/ou 3.⁴⁴

I.2.1. Les traitements préalables à l'extraction

La grande diversité structurale de la paroi ainsi que du matériel végétal (ici le bois) à partir duquel les xylanes sont extraits nécessitent au préalable divers traitements afin d'améliorer l'extractibilité de ces polysaccharides pariétaux. Qu'ils soient physiques (broyage

explosion à la vapeur, ultrasons), ou chimiques (alcalis, chélateurs de métaux, oxydants, acides), ils ont pour but d'altérer les propriétés physiques, de réduire la surface de contact ou d'éliminer certaines molécules non-désirables (extractibles, lignines, ...)

1.2.1.a. Le broyage

La granulométrie et la forme des particules solides ont une influence sur le rendement d'extraction. Il a été montré que le rendement d'extraction en hémicelluloses est inversement proportionnel à la taille des particules solides. Le broyage réduit la taille des particules, augmentant ainsi la surface d'échange disponible pour le solvant d'extraction par exemple.

1.2.1.b. Elimination des extractibles

Dans le bois, les extractibles correspondent essentiellement aux tannins, aux composés aromatiques, aux phénols, aux sucres circulants et aux flavonoïdes et peuvent donc être extraits par des mélanges de solvants tels éthanol-eau, éthanol-benzène ou éthanol-toluène.

1.2.1.c. Elimination des lipides

L'extraction des lipides au dichlorométhane permet de les éliminer pour faciliter la réduction de la matière en farine notamment.

1.2.1.d. Déprotéination

Les protéines peuvent être éliminées par une simple extraction à l'eau chaude ou à l'eau froide, ce qui risque cependant de solubiliser une partie des hémicelluloses qui nous intéressent. Des protéases peuvent également être utilisées dans le cas de matériels fortement protéinés.

1.2.1.e. Dépectination

Les pectines sont extraites selon leur degré de méthylestérification. Les pectines fortement méthylestérifiées sont facilement extraites par l'eau chaude alors que l'extraction des pectines faiblement méthylestérifiées nécessite l'utilisation de chélateurs de calcium tels le CDTA, l'EDTA, l'imidazole ou encore l'oxalate d'ammonium. Le recours à des enzymes pectinolytiques peut également être envisagé à une échelle industrielle.

1.2.1.f. Délignification

La présence d'une trame phénolique intimement liée aux xylanes dans le bois ne favorise pas leur extraction, d'où l'importance de l'étape de la délignification. Celle-ci augmente l'accessibilité des réactifs aux constituants de la matière végétale. Le résidu obtenu, constitué alors de cellulose et d'hémicelluloses est appelé holocellulose. Lors de l'étape de délignification, on remarque un blanchiment du substrat causé par l'extraction ou la dégradation des lignines. Cette décoloration recherchée entre autres dans l'industrie papetière est expliquée par la présence d'acides hexénuroniques qui contribue en partie à la couleur de ce substrat.^{45,46}

De nombreuses procédures de délignification sont décrites dans la littérature. Elles se basent soit sur l'extraction des lignines, soit sur leurs dégradations oxydatives. Dans ce dernier cas, l'unité C₉ phénylpropane (Figure 13) caractéristique des monomères de lignine n'est pas conservée.

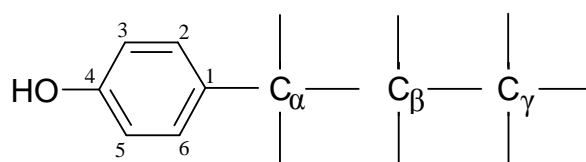


Figure 13 : Unité C₉ phénylpropane

➤ La méthode d'acidolyse

Ces méthodes non dégradatives des cycles phénoliques permettent d'extraire les lignines. Elles sont hydrolysées et il en résulte la formation de produits homologues des trois alcools monomères précurseurs. Cette méthode est également utilisée pour caractériser les lignines selon leurs proportions relatives en trois types de produits d'acidolyse. Le système de solvant le plus utilisé est le dioxane/HCl⁴⁷ où généralement le dioxane est à hauteur de 80-85% et la concentration en HCl peut varier de 10 mM à 2 M. Le dioxane peut également être remplacé par le THF moins nocif.

➤ La méthode d'acétolyse

C'est une méthode de dégradation des lignines par l'acide thioacétique qui conduit à l'hydrolyse des liaisons éther-benzyliques, et donc à la dépolymérisation des lignines. Cette

méthode est utilisée afin de caractériser à la fois les unités condensées et non-condensées de la lignine.⁴⁷

➤ *Le système acide formique/acide acétique*

Ces méthodes à base d'organosolvants sont des alternatives sans soufre pour la délignification du bois.⁴⁸ L'acide formique a été utilisé comme agent de délignification pour la première fois en 1917⁴⁹ mais ce n'est que dans les années 1980 que des études s'y sont réellement intéressées. Même si certains protocoles ne font appel qu'à de l'acide formique dilué,⁵⁰ la plupart ont recours à des systèmes de solvants acide formique/ acide acétique/eau. L'acide formique semblerait jouer le rôle de donneur de proton,^{32,51} ce qui aurait pour effet d'hydrolyser les lignines tandis que l'acide acétique solubiliserait les fragments. Cette dissolution est possible suite au clivage des liaisons éther dans la lignine.⁵²

➤ *La méthode d'oxydation par le nitrobenzène*

Depuis le milieu du XXème siècle où elle a été introduite, cette méthode fut l'une des plus utilisées malgré la très grande toxicité du nitrobenzène. Elle permet aussi de caractériser les lignines mais de façon limitée par rupture oxydative entre les carbones α et β de la chaîne propane des unités monomériques des phénylpropanes (Figure 13). Cependant ce système ne peut pas couper certaines liaisons éther des unités condensées.⁴⁷

➤ *La double oxydation par le permanganate et l'eau oxygénée*

Au préalable de cette oxydation, les fonctions phénoliques sont méthylées pour prévenir la dégradation du cycle aromatique. Le permanganate de potassium rompt les liaisons entre les carbones β et γ des phénylpropanes. Après une seconde méthylation, l'eau oxygénée complète la dégradation de la chaîne propane en conduisant à l'obtention de squelettes en C₇ pour les unités non condensées et en C₁₄ pour les unités condensées, ce qui permet de caractériser les deux types d'entités.^{47,53}

➤ *Oxydation par le système chlorite de sodium/acide acétique*

Cette méthode est sans doute la plus utilisée. Elle a été décrite par Green⁵⁴ et Adams⁵⁵ et fait intervenir une solution aqueuse de chlorite de sodium tamponnée par de l'acide acétique. En général deux traitements de deux heures à 80°C suffisent pour délignifier des sciures de bois. Bien que le chlorite lui-même ne soit pas trop agressif, du chlore et l'acide

hypochloreux, beaucoup plus réactifs, sont libérés *in situ*, ce qui permet l'oxydation des structures phénoliques et non phénoliques de la lignine par rupture de double liaison C=C. D'autres méthodes plus douces ont recours à une solution diluée d'acide *peracétique*.

➤ *Les méthodes enzymatiques*

La lignine, de par sa structure, est très résistante à de nombreux agents chimiques et biochimiques et n'est dégradée que par un petit nombre d'organismes comme certaines bactéries ou champignons. Ce sont en fait les enzymes extracellulaires biosynthétisées et sécrétées par ces organismes qui parviennent à dégrader la lignine en CO₂ et H₂O. Découvertes dans les années 80, elles n'ont depuis cessé d'être étudiées pour des applications industrielles pour le blanchiment de la pâte à papier. Il existe trois principaux types d'enzymes appelées lignolytiques : les laccases, les manganèse-*peroxydases* et les lignine-*peroxydases*, caractérisées par des potentiels redox élevés.⁵⁶

- La manganèse-*peroxydase* (MnP)

Cette enzyme agit sur la lignine via l'ion Mn³⁺ sous forme complexée mais seule, elle est incapable d'attaquer la paroi lignocellulosique dans son intégralité. Elle a besoin pour cela de l'action synergique d'autres enzymes. De plus son activité sur les polysaccharides est nulle dans une gamme de pH comprise entre 3,5 et 7, mais des composés modèles de la lignine sont quant à eux oxydés à pH 4,5.⁵⁷ Les protocoles de la littérature (Figure 14) utilisent une solution tampon de malonate pH 4,5 à 37°C dans laquelle est ajouté la manganèse-*peroxydase*, du MnSO₄, un surfactant (le tween 80), un composé oxygéné (O₂ ou H₂O₂) et la lignine à oxyder.^{58,59}

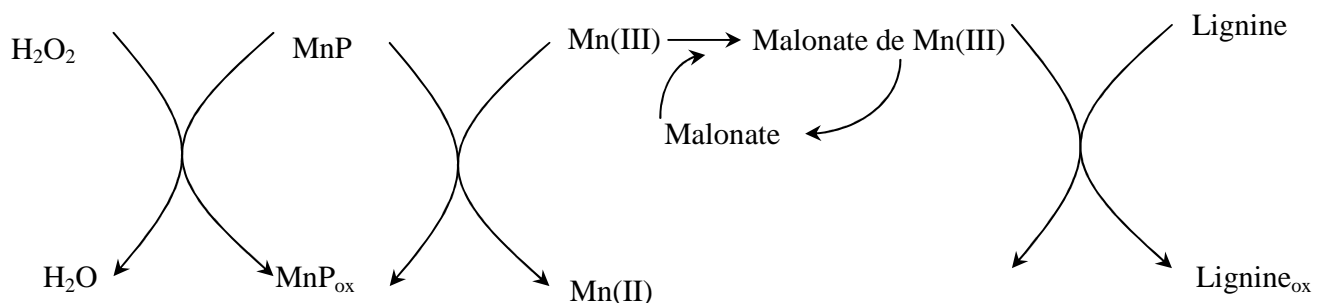
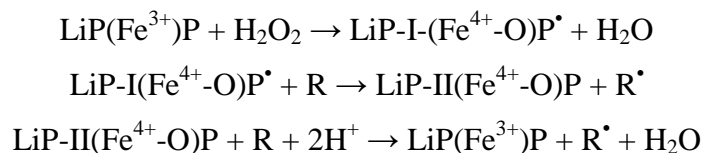


Figure 14 : Oxydation de la lignine par la manganèse-*peroxydase* (Gold and Glenn.,⁶⁰)

- La lignine-*peroxydase* (LiP)

La lignine-*peroxydase* est une glycoprotéine d'environ 41 kDa contenant 1 mole de protoporphyrine IX de fer par mole d'enzyme. Elle est capable d'oxyder les modèles non-phénoliques de lignine⁵⁶ à un pH optimal de 3 en présence de *peroxyde* d'hydrogène selon l'Équation 1⁶¹ et schématisé par la Figure 15⁶² mais elle est sensible à un excès de ce dernier.



Équation 1 : Oxydation de lignine par la lignine-*peroxydase* en présence de *peroxyde* d'hydrogène

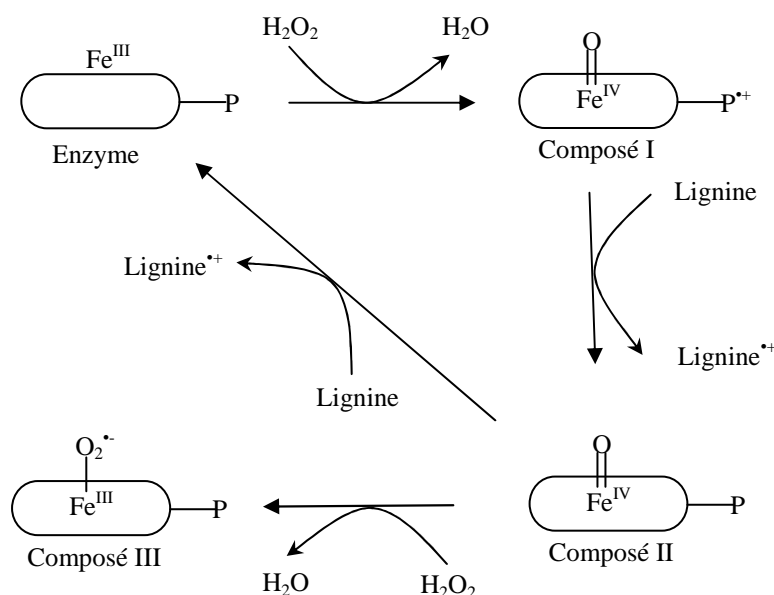


Figure 15 : Cycle catalytique de la lignine-*peroxydase*⁶²

- La laccase

Les laccases sont des oxydases très largement répandues dans le règne végétal et fongique. Découvertes par Yoshida en 1893, elles sont sans doute les plus étudiées.^{63,64} Ce sont des enzymes à cuivre dont la première caractérisation a été faite par Bertrand⁶⁵ en 1985. Associées à des médiateurs, elles oxydent les cycles phénoliques des enzymes en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Le site actif est composé de 4 atomes de cuivre : le premier isolé, est responsable de l'oxydation des phénols ; un cluster de 3 atomes de cuivre, est responsable de l'activation du dioxygène.⁶⁶ Cependant, seule, elle ne peut oxyder les composés non-phénoliques et pénétrer dans la fibre du bois; le recours à un médiateur est indispensable. Celui-ci joue le rôle de navettes d'électrons qui, après être oxydé

par l'enzyme, diffuse autour du site activé pour oxyder les substrats alors que l'enzyme, de par sa taille, ne pourrait entrer directement dans cette maille lignocellulosique. C'est une réaction radicalaire dont le principe est décrit en Figure 16.⁶⁷

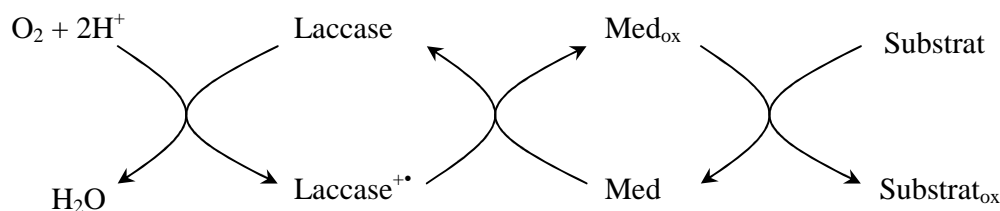


Figure 16 : Proposition de mécanisme d'action de la laccase

Dans le cas d'oxydation des composés non-phénoliques ou pour le blanchiment de la pâte à papier, la plupart des protocoles⁶⁸⁻⁷⁰ utilisent la laccase en milieu tamponné (citrate, tartrate ou acétate de sodium) et oxygéné (O_2) à un pH compris entre 4 et 5,5, une température inférieure ou égale à $50^\circ C$ de façon à ne pas dénaturer l'enzyme et entre 30 minutes et 24 h. Les médiateurs les plus souvent utilisés sont l'ABTS (acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), l'acide violurique et le HOBt (1-hydroxybenzotriazole) (Figure 17) mais l'utilisation de médiateurs naturels⁷¹ comme la vaniline et ses dérivés ou encore des di et triméthylphénols (Figure 18) permettent également la délignification mais dans de moindres proportions que les précédents médiateurs.

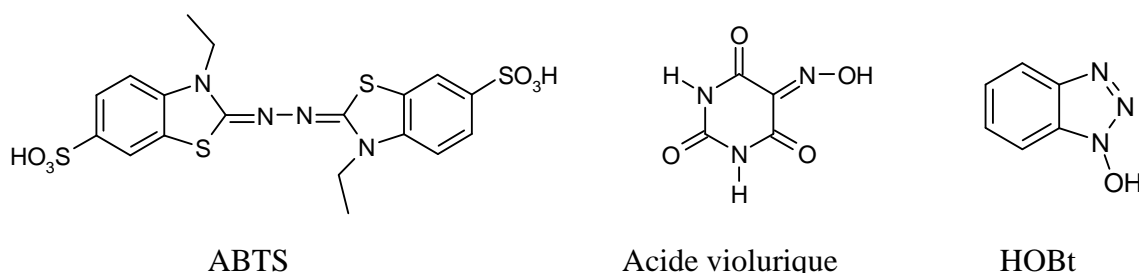


Figure 17 : Principaux médiateurs utilisés (d'après la littérature)

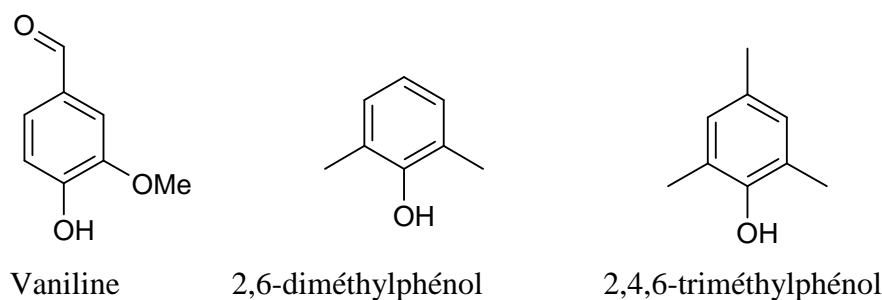


Figure 18 : Exemples de médiateurs naturels

En matière de délignification, la méthode enzymatique est séduisante dans la mesure où elle est à la fois simple à mettre en œuvre et qu'elle ne nécessite l'utilisation d'aucun produit chloré, polluant pour l'environnement. Néanmoins, le coût des médiateurs et de l'enzyme ainsi que la fragilité de cette dernière vis-à-vis des conditions drastiques sont deux des inconvénients majeurs de cette méthode pour une utilisation à l'échelle industrielle dans le cadre de la délignification de bois ou le blanchiment de la pâte à papier.

En plus des méthodes classiques citées ci-dessus, il existe d'autres systèmes de délignification moins connus qui tendent néanmoins à se développer. Ces derniers présentés ci-dessous sont des alternatives aux méthodes d'oxydation classiques.

➤ *Les phtalocyanines et les porphyrines*

En raison notamment de leur sensibilité vis-à-vis d'un excès d'oxydant, leur instabilité et leur coût de purification, les enzymes peuvent être aujourd'hui remplacées par des composés synthétiques de la famille des porphyrines et des phtalocyanines, des analogues des groupes prosthétiques des *peroxydases* qui sont capables de mimer leur action catalytique. En effet, des enzymes telles la lignine-*peroxydase* ou la manganèse-*peroxydase* possèdent un centre actif constitué d'un hème (Figure 19), c'est-à-dire un cofacteur contenant un atome de fer servant à accueillir un gaz diatomique (souvent le dioxygène).

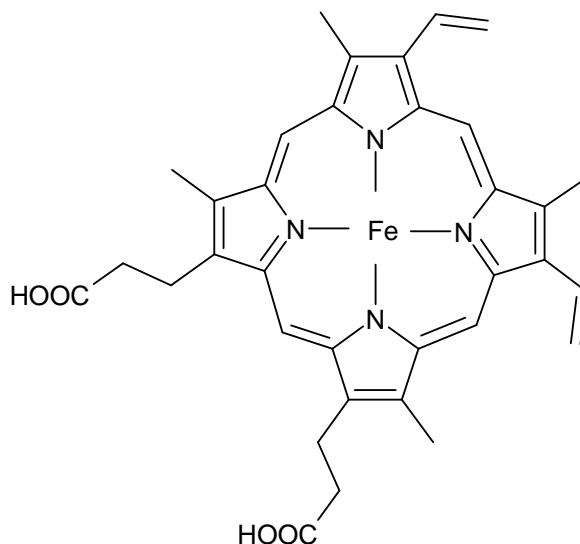


Figure 19 : Hème de type b

En présence de *peroxyde* d'hydrogène, ce noyau porphyrinique complexé à du Fe III réalise une oxydation à un électron sur les composés aromatiques de la lignine.⁶² Dans le cas des *peroxydases*, il s'agit d'une protoporphyrine IX de fer.

Rappelons que les porphyrines sont des macromolécules tétrapyrroliques qui peuvent être neutres (tétraphénylporphyrine, benzoporphyrine), cationiques (tétraalkylpyridinium porphyrine) ou anioniques (tétrasulfophénylporphyrine).^{62,72} En particulier dans ces deux derniers cas, le caractère ionique des structures induit une importante hydrosolubilité. Avec des groupements chlores ou fluors, elles miment de façon remarquable les lignine-*peroxydases* en rompant les mêmes liaisons (C_{α} - C_{β} (Figure 13), les liaisons β -O-4, hydroxylation des groupes méthyle benzène, la formation de glycol à partir d'une double liaison $C_{\alpha}=C_{\beta}$, l'oxydation des cycles aromatiques).⁷³ Elles peuvent être aussi supportées sur des argiles⁷⁴ et métallées par tous les métaux (Figure 20).

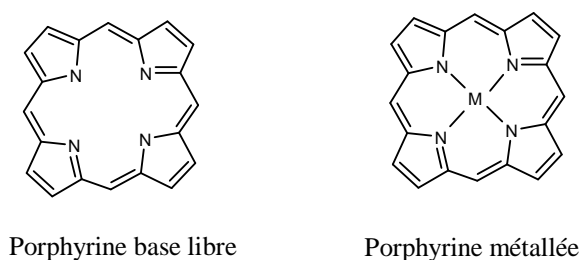


Figure 20 : Structure générale des porphyrines

Les métallophthalocyanines (MPcS) (Figure 21) sont des molécules très proches des métalloporphyrines d'un point de vue structural mais qui ont l'avantage d'être faciles à préparer et plus stables.⁷⁵ Leurs dérivés sulfonés, hydrosolubles, sont donc tout particulièrement étudiés comme modèle possible de *peroxydase*⁷⁶ mais également pour l'oxydation de polluants aromatiques chlorés⁷⁷ ou encore la dégradation de composés modèles de la lignine comme le catéchol.⁷⁸ L'influence du métal de la phthalocyanine est également étudiée et comme pour les porphyrines, le fer et le manganèse semblent plus efficaces même si le nickel, le cuivre ou le cobalt ont montré une certaine activité pour une oxydation par le *peroxyde* d'hydrogène.⁷⁶ Lors de la réaction, les MPcS sont oxydées par l'eau oxygénée pour ensuite oxyder à leur tour la lignine.⁷⁵

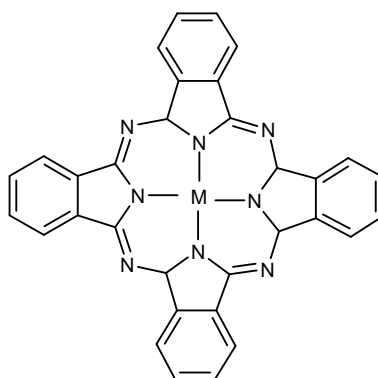


Figure 21 : Structure générale des phthalocyanines

Les protocoles de délignification par les phtalocyanines et les porphyrines décrits dans la littérature sont assez similaires, la réaction a lieu dans des solutions tampons en présence de la matière à délignifier et de H_2O_2 avec des temps et températures variables.

Enfin, l'action des *peroxydases* peut aussi être mimée par le réactif de Fenton, qui reprend le même mode d'action ; il s'agit d'une solution contenant du *peroxyde* d'hydrogène et des ions ferreux (Fe^{2+}) souvent introduits par l'intermédiaire de $FeSO_4$. L'ion ferreux est oxydé par le *peroxyde* d'hydrogène et donne un ion et un radical hydroxyde. L'ion ferrique (Fe^{3+}) est alors oxydé en retour pour donner un ion ferreux, un proton et un radical peroxyde (HOO^*).

➤ *L'ozonolyse*

L'ozone est un gaz à la fois considéré comme un agent protecteur naturel très présent dans la stratosphère mais aussi comme un polluant toxique pour les organismes vivant présents dans la troposphère.⁷⁹ Cette molécule est une substance hautement oxydante qui est produite par décharge électrique dans du dioxygène. C'est un puissant agent de délignification notamment utilisé dans l'industrie pour le blanchiment des pâtes papetières.⁸⁰ Il réagit avec la lignine provoquant une diminution de la viscosité des fibres qui s'accompagne également d'une dépolymérisation et de la dégradation des polysaccharides et parfois de la cellulose. Cela est dû à sa faible sélectivité en comparaison avec les produits chlorés. En effet, durant le processus de blanchiment on constate l'apparition de radicaux hydroxyles hautement réactifs et non sélectifs. Pour minimiser cette réaction, l'ozone peut être utilisé en milieu acide. L'ozonolyse a également été utilisée comme technique d'analyse par Demin *et al.*,⁸¹ afin de prouver la nature aromatique de la lignine, déterminer les substituants des cycles aromatiques et étudier la structure tri-dimensionnelle des chaînes latérales des unités phénylpropanes. Cependant le mécanisme de dégradation de la lignine par l'ozone n'est pas totalement élucidé. Il inclut des réactions de l'ozone avec les chaînes latérales de la lignine. Ces réactions de type radicalaires conduisent à la formation de produits condensés de la lignine et de fonctions *hydroperoxydes*.⁷⁹ C'est ce qu'illustre la Figure 22 où les noyaux aromatiques des lignines sont convertis en un analogue de la quinone.⁸²

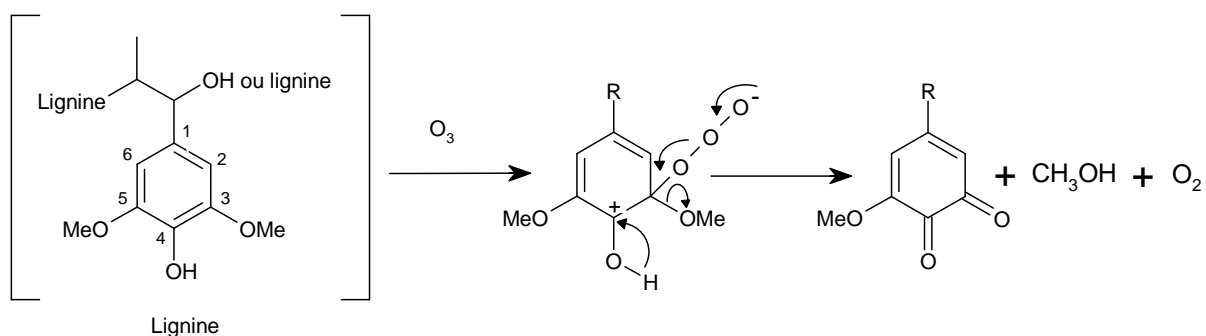


Figure 22 : Proposition de mécanisme de la conversion de la lignine par l’ozone (selon Lyse⁸²)

Dans le cas de lignine comprenant une unité phénylpropène ou des alcènes, l’ozonolyse se fait sur la double liaison via une cycloaddition 1,3 dipolaire comme indiquée sur la Figure 23.

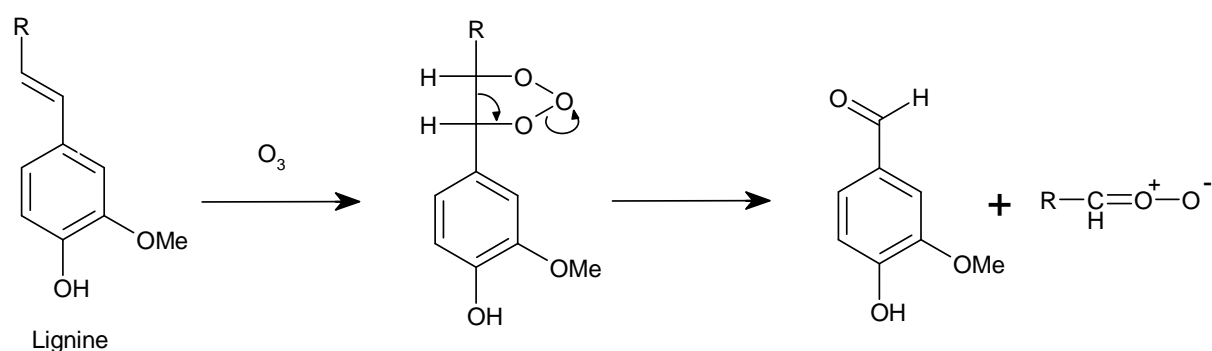


Figure 23 : Proposition de mécanisme lors de la réaction d’une double liaison et de l’ozone dans la lignine (selon Lyse⁸²)

La réaction de l’ozone via une addition 1,3 dipolaire sur une double liaison du cycle aromatique d’une unité C₉ (Figure 13) de la lignine conduit plus rarement à son ouverture (1 cas sur 20).⁸²

➤ *La délignification photochimique*

La lignine est un chromophore qui peut subir des réactions de photooxydation. Elle absorbe dans la région 280-300 nm et la présence de groupes fonctionnels absorbant entre 300 et 400 nm expliquent la couleur jaune que peut revêtir le papier. La dégradation photochimique de la lignine peut se faire selon plusieurs processus : l’irradiation photochimique directe ou l’utilisation d’une radiation (UV par exemple) pour produire des radicaux et/ou de l’oxygène singulet. Dans le cas de l’irradiation directe, plusieurs types d’appareillages sont utilisés comme les lampes à mercure haute pression (dont la longueur d’onde est coupée à 300 nm),⁸³ les lampes halogènes à tungstène (l’irradiation étant coupée à 400 nm),⁸⁴ des lampes UV-visible à plus large spectre (λ : 350-700 nm, $\lambda_{\text{max}}=575$ nm),

l'irradiation se faisant le plus souvent à entre 280 et 350 nm. Il est également possible de recourir à des semiconducteurs comme catalyseurs de la dégradation chimique des lignines^{85,86} comme c'est couramment le cas avec TiO₂ ou ZnO, le dernier étant le plus efficace.⁸⁷ En milieu aqueux et en présence du catalyseur, la lignine est dégradée plus facilement, ce qui induit la nette diminution de l'intensité de l'absorption à des longueurs d'onde comprises entre 200 et 350 nm. Les radiations UV peuvent également servir à la production d'oxygène singulet ¹O₂ ou des radicaux hydroxyles HO[•]. Ces derniers sont formés notamment lors du clivage homolytique du peroxyde d'hydrogène par action de la lumière UV. Le radical formé, une espèce fortement oxydante (E = 2.32 V à pH = 7) peut alors directement réagir avec la lignine par addition sur les cycles aromatiques de façon à former des radicaux hydroxycyclohexadiényles⁹ (Figure 24).

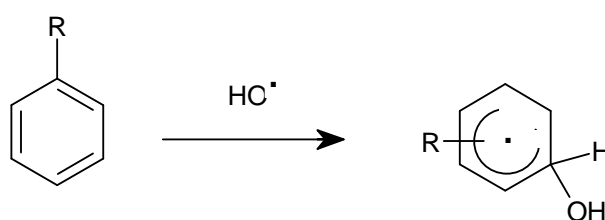


Figure 24 : Formation de radicaux hydroxycyclohexadiényles

L'oxygène singulet ¹O₂ est à l'instar des radicaux hydroxyles une puissante espèce oxydante qui peut être induite par transfert d'énergie de groupes carbonyles excités ou de doubles liaisons conjugués avec des cycles aromatiques vers de l'oxygène triplet ³O₂. Sous l'effet d'une irradiation lumineuse (UV ou visible), en présence de dioxygène et d'un photosensibilisateur comme le Rose de Bengale (Figure 25) par exemple, il est aussi possible de produire de l'oxygène singulet.^{9,83,84} D'autres photosensibilisateurs comme les porphyrines base libre ou certaines phtalocyanines peuvent également former de l'oxygène singulet après irradiation.^{88,89}

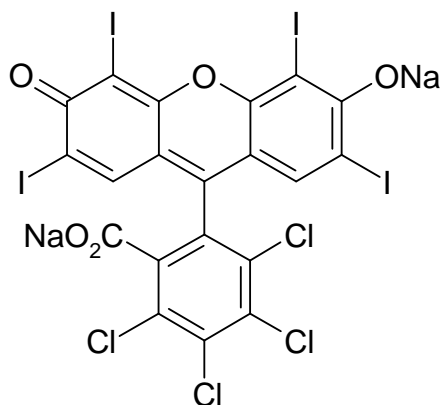


Figure 25 : Le photosensibilisateur Rose de Bengale

C'est aussi le cas lors de l'irradiation de *peroxydes* en milieu alcalin. L'oxygène singulet peut intervenir dans un très grand nombre de réactions notamment dans les réactions de cycloadditions avec les groupes électroniquement riches comme les alcènes et les dérivés aromatiques. Malgré sa sélectivité envers les noyaux aromatiques de la lignine, Hwang et *al.*,⁸³ ont observé la dégradation concomitante de la cellulose après que la lignine ait été dégradée à hauteur de 50%.

➤ *Autres processus de délignification*

Dans le cadre de chimie verte, de nombreux processus "totally chlorine free" (TCF) furent développés en utilisant comme nous l'avons déjà présenté du *peroxyde* d'hydrogène, de l'oxygène ou de l'ozone comme oxydants. Cependant, leur principal inconvénient est un manque de sélectivité dû aux radicaux formés, attaquant aussi bien la cellulose que la lignine. Un nouveau catalyseur, le méthyltrioxorhénium (MTO), (Figure 26) est proposé par Crestini et *al.*,^{90, 91} pour oxyder la lignine en combinaison avec le *peroxyde* d'hydrogène.

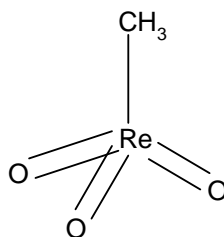


Figure 26 : Le méthyltrioxorhénium

Le MTO a suscité en quelques années un très grand intérêt en raison du nombre de réactions qu'il peut catalyser comme l'oxydation des alcènes, des alcynes, des phosphines, des composés soufrés... Associé en milieu acide faible (acide acétique) à H₂O₂, il est capable d'oxyder les composés aromatiques de la lignine qu'ils soient phénoliques ou non phénoliques. Les chaînes alkyles latérales sont oxydées et fragmentées tandis que les parties aromatiques sont hydroxylées, déméthylées et l'ouverture du noyau réalisée par des réactions d'oxydation. Le MTO peut également être immobilisé sur des polymères tels les polyvinylpyridines ou des polystyrènes de façon à pouvoir réutiliser ces catalyseurs.

I.2.2. Les solvants d'extraction des xylanes

I.2.2.a. *Les solvants organiques*

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF) ont été utilisés pour l'extraction des hémicelluloses. Par rapport aux solutions alcalines, ces solvants organiques

favorisent l'extraction des hexosanes. L'extraction par le DMSO présente l'avantage de préserver l'acétylation des xylanes⁹²⁻⁹⁴ qui sont saponifiés lors des extractions alcalines aqueuses. Ce mode d'extraction fournit donc des fractions très proches de l'hémicellulose *in situ*, mais le rendement d'extraction est relativement faible (<50%). Il a récemment été utilisé par Teleman et *al.*,⁹⁴ pour l'extraction de glucuronoxylanes de hêtre et de bouleau.

1.2.2.b. Les solutions alcalines

Les solvants d'extraction les plus utilisés sont les solutions alcalines (soude, potasse, chaux, ou encore carbonate de potassium, formiate de sodium et ammoniac). Cependant, si l'on excepte la potasse et la soude, les autres bases ne réagissent efficacement que lorsqu'elles sont utilisées en grande quantité pendant des temps relativement longs. L'utilisation de la chaux $\text{Ca}(\text{OH})_2$ permet en particulier le maintien d'un pH constant au cours de la réaction et conduit à l'extraction de fractions hémicellulosiques de couleur blanche par rapport à celles extraites avec les autres bases.⁹⁵

La soude est la base la plus fréquemment employée pour le traitement des produits ligno-cellulosiques. Elle augmente la capacité d'absorption d'eau, provoque le gonflement des fibres celluloses,⁹⁶ et augmente ainsi la surface spécifique par augmentation du volume du solide améliorant l'accessibilité des réactifs. Le mécanisme d'action de la soude reste mal connu ; plusieurs hypothèses ont été formulées : sous l'action de la soude, la proportion de liaisons hydrogène intermoléculaires serait réduite par solvataion⁹⁶ ainsi que celle des liaisons entre les hémicelluloses et la lignine. Par ailleurs, les alcalis hydrolysent notamment les liaisons esters entre les polysaccharides et les acides hydroxycinnamiques.⁹⁷ Le rendement d'extraction augmente avec la concentration en soude ; c'est pourquoi de nombreux protocoles d'extraction dits séquentiels utilisent des bases de concentrations croissantes.

Les solutions de potasse sont également utilisées pour extraire les hémicelluloses. La potasse apparaît plus sélective que la soude vis-à-vis de l'extraction des xylanes, qu'ils proviennent de feuillus ou de résineux.^{98,99} De plus, l'acétate de potassium formé au cours de la neutralisation avec l'acide acétique est plus soluble dans l'éthanol utilisé pour faire précipiter les hémicelluloses que l'acétate de sodium,¹⁰⁰ donc plus facilement éliminé.

L'utilisation de solutions alcalines présente cependant des inconvénients. Outre le fait qu'elle provoque la saponification des polysaccharides estérifiés, l'extraction par des bases peut entraîner l'élimination du groupement méthoxy en position 4 des acides uroniques pour

donner un intermédiaire acide 4-déoxyhex-4-ènuronique. Après β -éliminations successives, ce dérivé se décompose et est finalement éliminé (Figure 27). Il semble qu'une partie des acides uroniques des 4-*O*-méthylglucuronoxylanes soit éliminée et dégradée¹⁰¹ pour des extractions alcalines à des températures élevées. Il est également connu qu'en milieu alcalin, des réarrangements peuvent survenir sur l'extrémité réductrice des polysaccharides (Figure 28), s'accompagnant de phénomènes de « peeling » par des mécanismes de β -élimination.¹⁰² En effet, le résidu situé à l'extrémité terminale réductrice d'un polysaccharide peut, sous l'action d'une solution alcaline diluée, subir une isomérisation partielle sur le C-2 pour donner le cétose correspondant à l'aldose épimère : c'est la transformation de Lobry de Bruyn - Alberta van Ekenstein. Ces réactions peuvent être évitées en opérant en milieu réducteur.

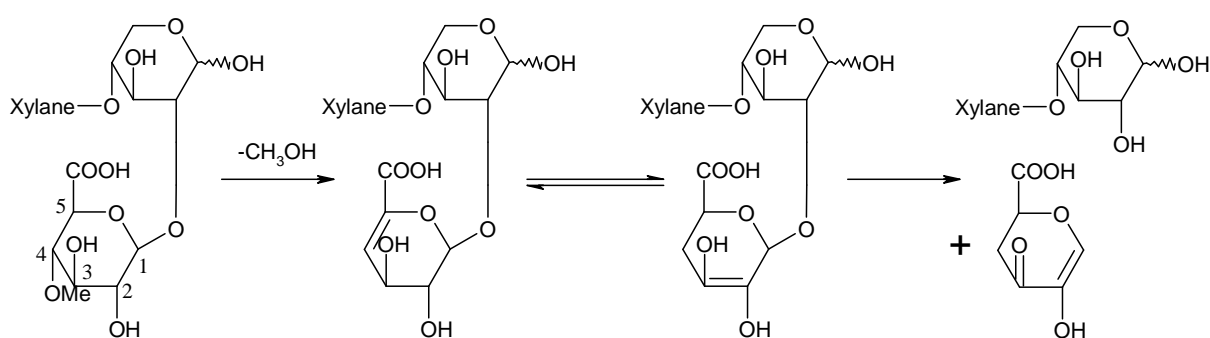


Figure 27 : Dégradation des unités d'acide uronique en milieu basique (Lai¹⁰³)

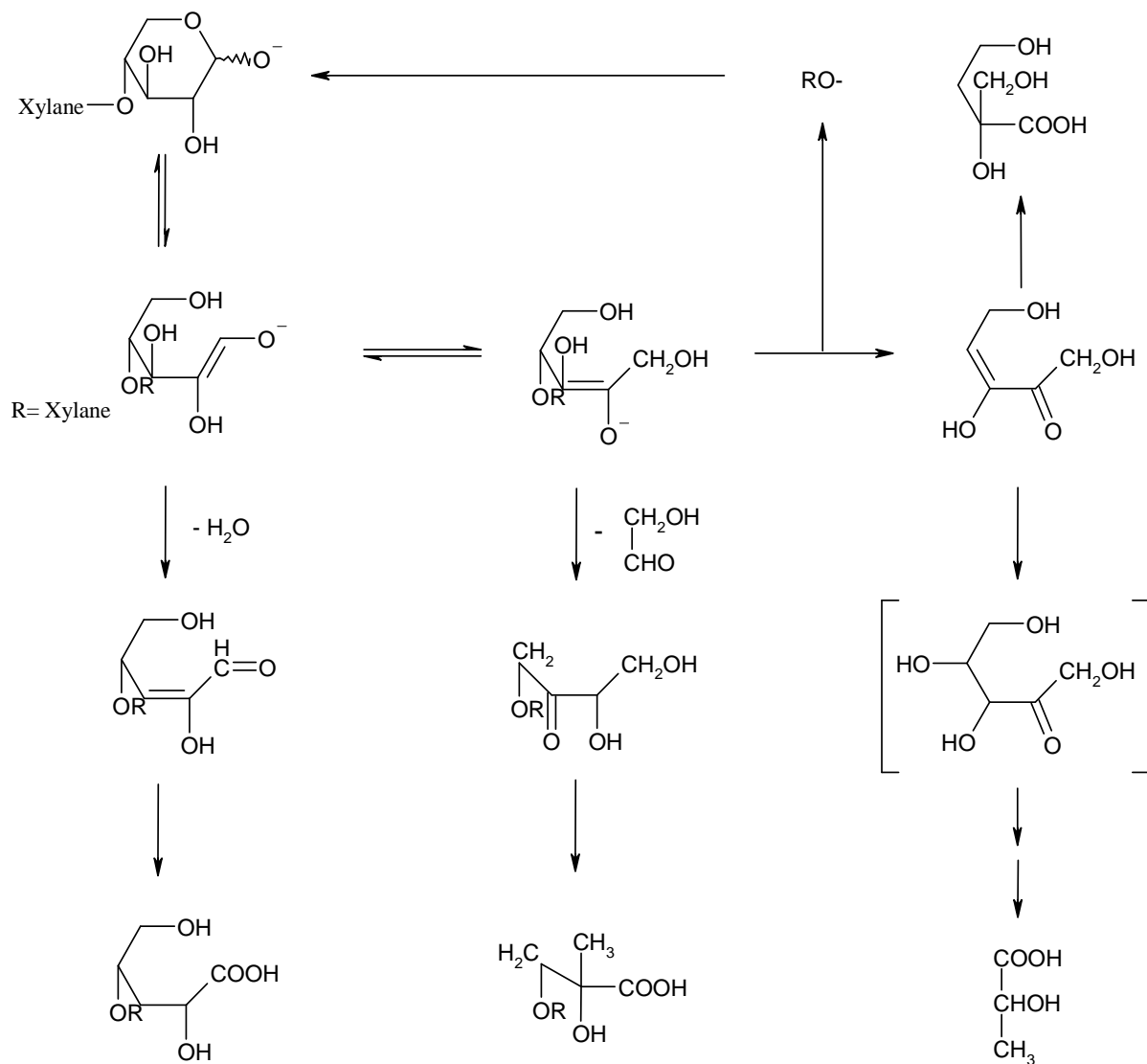


Figure 28 : Dépolymérisation (peeling) des xylanes en milieu alcalin (adapté de Lai¹⁰³)

1.2.2.c. L'eau

Les xylanes étant solubles dans l'eau, il apparaît donc naturel d'envisager l'eau comme solvant pour leur extraction d'autant qu'il préserve la structure native des xylanes et qu'il est non polluant. Pourtant, très peu de références ont recours à l'extraction aqueuse des xylanes car bien qu'hydrosolubles, ils n'en demeurent pas moins faiblement extractibles par l'eau.¹⁰⁴ Souvent, l'utilisation de l'eau est couplée à une méthode physique comme les micro-ondes¹⁰⁵ ou les ultrasons (US)^{51, 106} ou à un milieu acide.¹⁰⁷

I.2.3. Les conditions d'extraction

La richesse de la paroi végétale requiert la mise en œuvre de techniques d'extraction sélective des hémicelluloses qui devront être adaptées à chaque famille de substrats lignocellulosiques. Ces techniques sont thermiques ou physiques.

I.2.3.a. Le chauffage classique

Quel que soit le solvant, le rendement d'extraction en hémicelluloses augmente avec la température. Cependant, au-delà de 100°C dans les solvants organiques (DMSO par exemple), des dégradations, essentiellement des dépolymérisations, peuvent avoir lieu par rupture des liaisons glycosidiques. Ainsi, l'utilisation de solvants nécessite des conditions moins drastiques, à savoir des températures plus faibles et des temps de réactions plus longs.

I.2.3.b. L'extraction à la vapeur

L'extraction à la vapeur (steam explosion) est une méthode largement répandue pour séparer les différents constituants de la biomasse : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. L'action de la vapeur rompt les liaisons hydrogène et les liaisons chimiques entre la lignine et les autres constituants. Cette méthode présente l'avantage de ne pas dégrader totalement les acétyles des hémicelluloses contrairement à la méthode alcaline. Cependant, certains groupements sont hydrolysés sous l'action de la pression pour donner de l'acide acétique qui hydrolyse lui-même les hémicelluloses abaissant leur degré de polymérisation et pouvant ainsi donner des oligomères.¹⁰⁸ Les paramètres opératoires de durée, de température et de granulométrie du matériel végétal à extraire sont importants afin de ne pas totalement dégrader les hémicelluloses en dérivés du furfural dans le cas de conditions drastiques. Des xylanes de paille de blé,¹⁰⁹ d'orge¹¹⁰ et d'épicéa ont déjà été extraits par cette technique qui présente l'avantage d'être non polluante pour l'environnement.

I.2.3.c. Les ultrasons

Depuis une dizaine d'années, l'utilisation des ultrasons pour l'extraction des hémicelluloses connaît un développement important selon la littérature. L'effet ultrason trouve son origine dans la rupture de bulles de cavitation, formées par les vibrations mécaniques, à proximité de la paroi ce qui provoqueraient la lyse des cellules végétales et permettrait ainsi une bonne pénétration du solvant.¹¹¹ Les extractions basées sur la sonication sont employées pour de nombreux composés notamment issus des plantes comme les

principes actifs¹¹² et sont au moins comparables à des méthodes plus classiques comme le Soxhlet.¹¹³ Ebringerová et Hromádková se sont beaucoup intéressées à la sonication en milieu alcalin pour l'extraction des hémicelluloses et en particulier celle des xylanes^{106, 114-116} de maïs, de sauge, de sarrasin ou de son de blé. Elle conduit non seulement à de meilleurs rendements d'extraction mais aussi une meilleure qualité des extraits obtenus à des températures plus faibles et pour des durées d'extraction plus courtes.

1.2.3.d. Les micro-ondes

Très couramment employée en synthèse organique, l'utilisation des micro-ondes est aujourd'hui élargie à l'extraction de polysaccharides. Le principe du chauffage micro-ondes est basé sur l'effet direct du rayonnement sur les molécules par conduction ionique et rotation dipolaire. Ces deux phénomènes ont lieu simultanément. La conduction ionique est la migration électrophorétique des ions quand un champ électromagnétique est appliqué ; la résistance de la solution au flux des ions résulte en une friction qui chauffe alors la solution. La rotation dipolaire est en fait le réalignement des dipôles avec le champ qui est appliqué.¹¹⁷ Des xylanes de peuplier,¹⁰⁵ bouleau, d'épicéa¹¹⁸ et de lin¹¹⁹ ont été extraits par les micro-ondes dans l'eau. Il en résulte une dépolymérisation partielle^{118, 119} mais il apparaît que peu de groupements acétyles et acides 4-*O*-méthylglucuroniques¹⁰⁵ disparaissent au cours du traitement par les micro-ondes.

I.3. Caractérisation des hémicelluloses du bois

L'étude d'un polysaccharide requiert l'obtention des informations suivantes :

- La composition osidique à la fois qualitative et quantitative
- La nature des liaisons glycosidiques (position de l'anomérie)
- La quantification et la localisation des groupes acétyles
- Le degré de polymérisation
- La structure tridimensionnelle du polysaccharide

I.3.1. Détermination de la composition chimique

1.3.1.a. Composition centésimale

Les méthodes colorimétriques sont des techniques de dosage simples à mettre en œuvre et rapides, qui s'appliquent aussi bien à des résidus solides qu'à des extraits et permettent de doser de manière globale les oses totaux et de manière spécifique les acides uroniques.

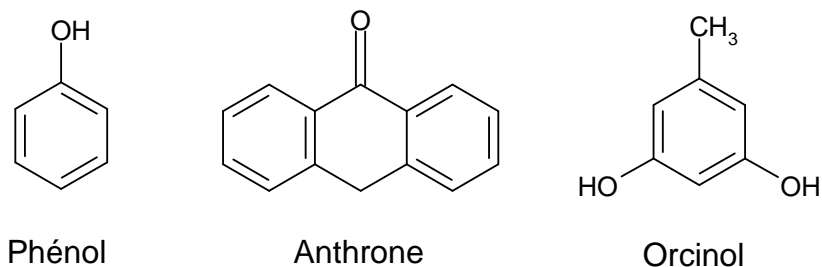


Figure 29 : Exemples de chromogènes utilisés pour les dosages colorimétriques

Le principe des dosages colorimétriques repose sur la condensation, par estérification, d'un chromogène (Figure 29) 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 30).

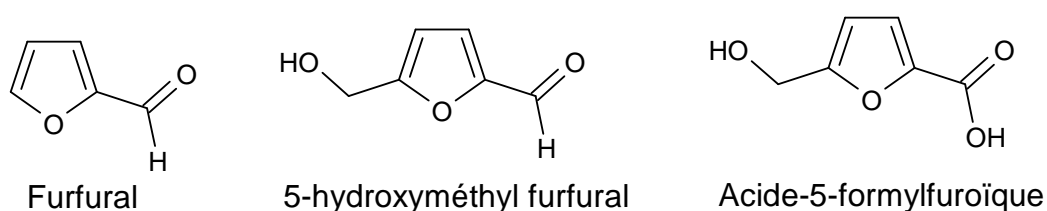


Figure 30 : Dérivés furfuriques obtenus par déshydratation des pentoses, des hexoses et des acides uroniques

Les chromophores ainsi formés absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité d'oses présents. Le développement de la coloration, la longueur d'onde à laquelle on observe l'absorption maximale, ainsi que l'intensité de l'absorbance dépendent des réactifs, de la nature et de la structure d'ose dosé (hexose, pentose, acide uronique ou sucre réducteur) et des conditions de réaction (température, temps de réaction et concentration de l'acide).

➤ *Dosage des oses totaux*

Le dosage de la quantité de oses totaux, mesurée selon la méthode de Dubois *et al.*,¹²⁰ utilise le phénol plus sensible à la détermination quantitative des oses que des chromogènes tels que le naphтол ou l'anthrone.

➤ *Dosage des acides uroniques*

Le *méta*-hydroxydiphényle en présence de tétraborate de sodium a été utilisé comme chromophore sélectif lors du dosage des acides uroniques.¹²¹ 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.¹²² Il est alors possible de

corriger les interférences des acides uroniques dans le dosage des oses totaux et réciproquement.

➤ *Dosage des oses réducteurs*

Le pouvoir réducteur des glucides peut être déterminé par la méthode de Somogyi¹²³ ou par celle à l'acide parahydroxybenzoïque hydrazide (PAHBAH) de Lever¹²⁴ décrite dans la partie expérimentale. Le principe des dosages y est également détaillé. Le rapport des quantités des oses totaux et des oses réducteurs donne la valeur du degré de polymérisation (DP).

1.3.1.b. Composition monosaccharidique

Pour déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on opère le plus souvent par séparation et détection des monomères constitutifs après leur hydrolyse. La méthode utilisée pour rompre les liaisons glycosidiques doit permettre l'hydrolyse complète des liaisons tout en préservant les monomères obtenus de toute dégradation secondaire. Les monosaccharides libérés sont ensuite analysés avec ou sans dérivation préalable aussi bien en HPLC (chromatographie liquide haute pression) que par CPG (chromatographie en phase gazeuse) ou CLG (chromatographie liquide gaz).

➤ *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'. Les liaisons glycosidiques entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique ou amine seront plus difficiles à rompre que des liaisons entre un ose et un autre sous la forme furanose, anhydro ou déoxy. 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.

Le rendement d'hydrolyse est très dépendant des conditions opératoires et de la nature des polysaccharides. Certaines hémicelluloses contenant des acides uroniques sont plus difficiles à hydrolyser que des polysaccharides neutres. Ceci est dû à la résistance particulière de la liaison xylose-acide uronique à l'hydrolyse acide. Dans ces conditions, une telle résistance à l'hydrolyse conduit à l'obtention d'un mélange de monosaccharides et d'acides aldobiuroniques (dimères constitués d'un ose neutre et d'un acide uronique). La stabilité relative du disaccharide à l'hydrolyse acide s'explique par les effets du groupement carboxyle en C-5 (Figure 31).

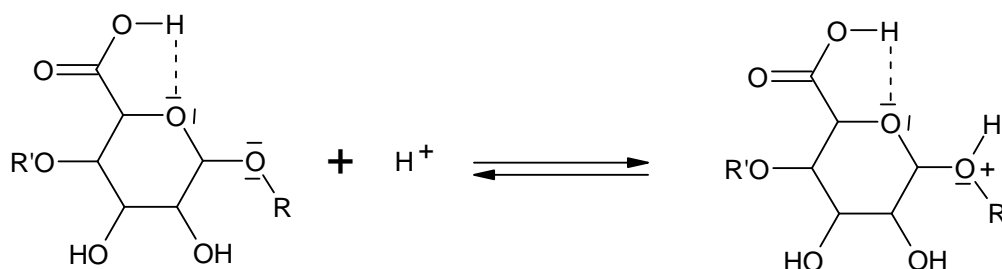
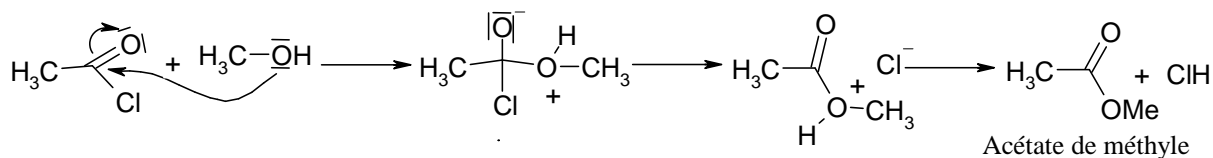


Figure 31 : Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide d'après Timell et coll.,⁹²

Le doublet de l'oxygène, déjà engagé dans une liaison hydrogène avec le carboxyle en C-5, est moins disponible pour stabiliser, par délocalisation, le carbocation qui se formerait lors d'un mécanisme d'hydrolyse acide.

Une température trop élevée du milieu réactionnel provoque la dégradation de certains oses, notamment le xylose.¹²⁵ 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 les difficultés d'une hydrolyse acide non quantitative, la méthanolyse a été choisie comme méthode de clivage efficace des liaisons glycosidiques entraînant peu de dégradation.¹²⁶ 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 32). Les méthylglycosides présentent en outre une très forte stabilité en solution. Les liaisons uronosidyles sont alors rompues probablement du fait de l'estérification des unités d'acides uroniques. De plus ces acides uroniques libérés sont mieux préservés dans le cas de la méthanolyse étant donné qu'ils sont convertis en méthylglucuronosides très stables.¹²⁷

a: formation du réactif



b: Libération des O-méthylglycosides

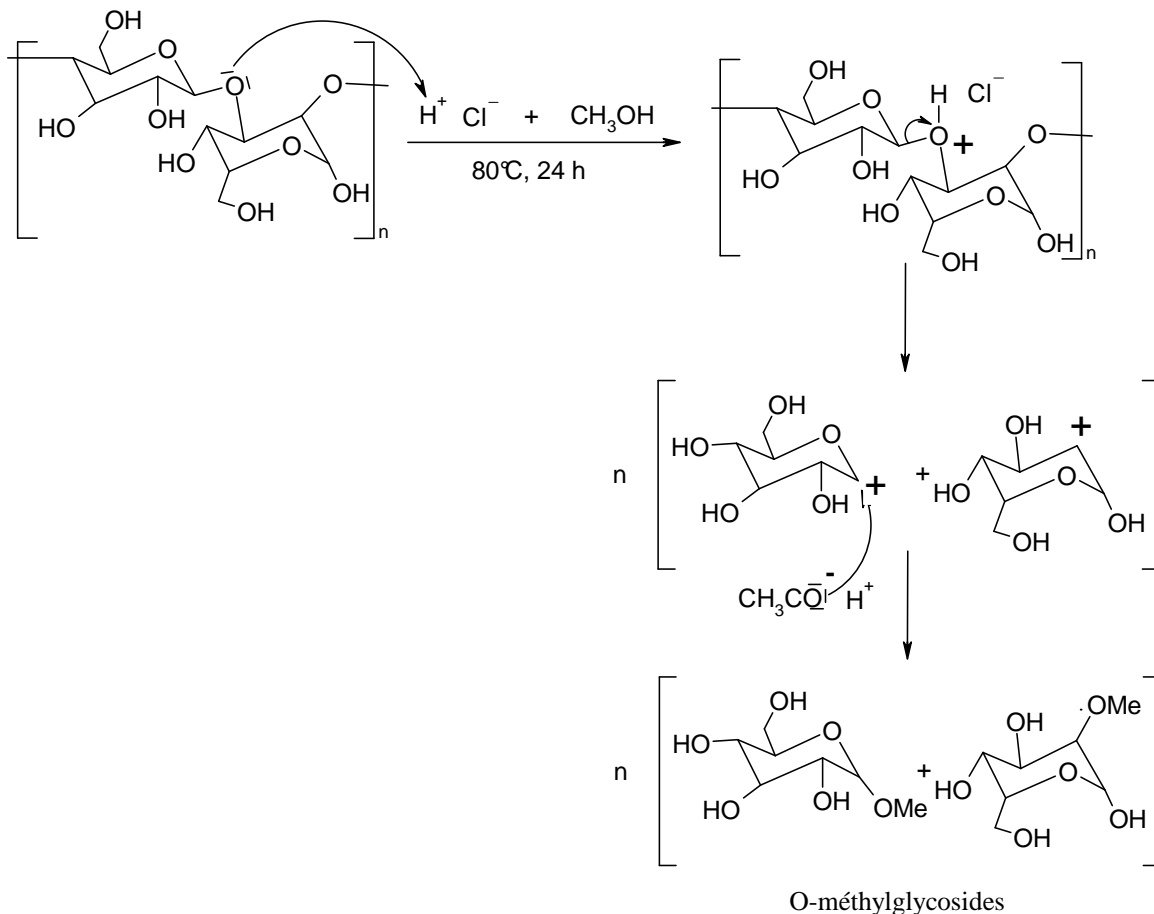


Figure 32 : Préparation des méthylglycosides selon la méthode proposée par Kamerling *et al.*,¹²⁸

➤ *Méthodes de dérivation des oses pour l'analyse par CPG*

L'analyse des méthylglycosides libérés après hydrolyse peut être réalisée par les techniques de chromatographie gazeuse ou liquide.

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

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 se révèle être la technique la plus adaptée à l'analyse qualitative et quantitative des méthylglycosides triméthylsilylés des résidus et extraits végétaux. L'analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse nécessite au préalable la dérivation des méthylglycosides en composés plus volatils. 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 méthyloximes 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 : Méthode de dérivation des monosaccharides

Méthodes de dérivation	Dérivé	Références
<i>Per</i> triméthylsilylation	<i>TMS</i>	Bleton et <i>coll.</i> , ¹²⁹
Acétylation	<i>acétates</i>	Biermann ¹³⁰
Trifluoroacétylation	<i>trifluoroacétates</i>	Englmaier ¹³¹
Réduction/acétylation	<i>alditols acétates</i>	Black and Fox ¹³²
Oximation/acétylation	<i>aldonitriles acétates</i>	McGinnis ¹³³
<i>O</i> -méthyloximation/acétylation ou triméthylsilylation	<i>O</i> -méthyloxime acétates ou <i>O</i> -méthyloxime <i>TMS</i>	Neeser and Schweizer ¹³⁴

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 α et β peuvent être formés pour chacune des formes furanose et pyranose (Figure 33). Ainsi, jusqu'à quatre isomères peuvent être observés par monosaccharide.

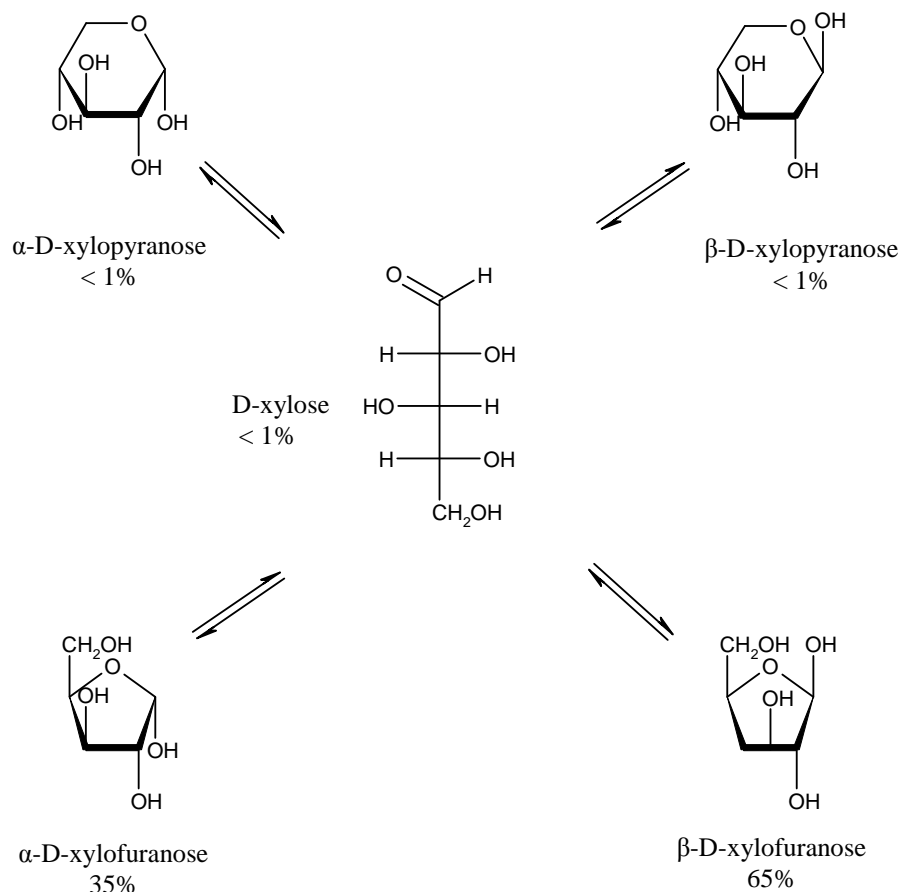


Figure 33 : Equilibre mutarotationnel du xylose

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 la pyridine.¹³⁵ 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 seul pic.

Une seconde méthode consiste à partir du mélange isomérique brut qui est dans un premier temps glycosylé par un groupement méthyle puis silylé. 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.*,¹²⁸ modifiée par Montreuil et *al.*,¹³⁶ 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 34).

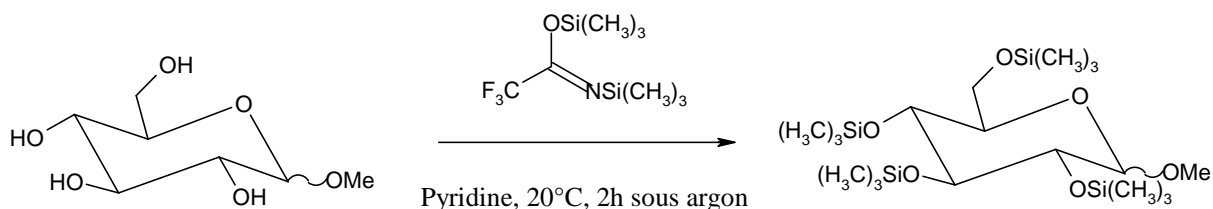


Figure 34 : Méthode de triméthylsilylation des O-méthylglycosides, d'après Kamerling *et al.*,¹²⁸

I.3.1.c. Détermination du taux et de la localisation de l'acétylation

A l'état natif, les xylanes sont naturellement acétylés et l'analyse par IR du polymère confirme cette acétylation par la présence d'une bande carbonyle intense à 1745 cm^{-1} . Plusieurs méthodes mises en œuvre pour la détermination du taux d'acétylation sont décrites dans la littérature. La technique la plus largement utilisée est la RMN du proton. Les signaux à 2,0 ppm indiquent que les polysaccharides sont acétylés.^{94, 105} Pour Grondalh *et al.*,¹³⁷ le degré d'acétylation DS_{Ac} est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{DS}_{\text{Ac}} = \frac{\Sigma (\text{intégrations des protons des acétyles à 2.0 ppm}) \times 6}{\Sigma (\text{intégrations des protons du glucide entre 3.2 et 5.6 ppm}) \times 3}$$

La RMN ^1H et ^{13}C permet aussi de préciser la position de l'acétyle et d'établir le pourcentage de xylane non acétylé, de 2-*O*-acétylé, 3-*O*-acétylé et de 2,3-di-*O*-acétylés.^{105, 138, 139} Le recours à des techniques en deux dimensions homonucléaire et hétéronucléaire permet de confirmer et d'affiner les structures acétylés.

Le taux d'acétylation peut également être déterminé par HPLC après une saponification par de la soude à 0,4 M à température ambiante pendant 3h30¹⁴⁰ ou une hydrolyse des groupes acétyles par de l'acide oxalique à 0,5 M.¹³⁹ C'est alors l'acide acétique libéré qui est dosé.

Une autre méthode repose sur le dosage enzymatique qui permet de doser des quantités d'acide acétique de l'ordre de quelques μmoles contre quelques mmoles dans le cas du dosage par HPLC. Cette méthode est basée sur le suivi de la réduction du NAD^+ en NADH par spectrophotométrie à 340 nm (Figure 35). Après saponification des MGX, l'acide acétique libéré est converti en acétyl-CoA en présence de l'enzyme acétyl-CoA synthétase (ACS), d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) et de coenzyme A (CoA) (1). L'acétyl-CoA réagit ensuite avec de l'oxaloacétate pour former de l'acide citrique en présence de citrate synthase (CS) (2). L'oxaloacétate utilisé pour la réaction (2) est formé à partir de L-malate et de nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD^+) en présence de L-malate déshydrogénase (L-MDH) (3). Au cours de cette réaction, NAD^+ est réduit en NADH.

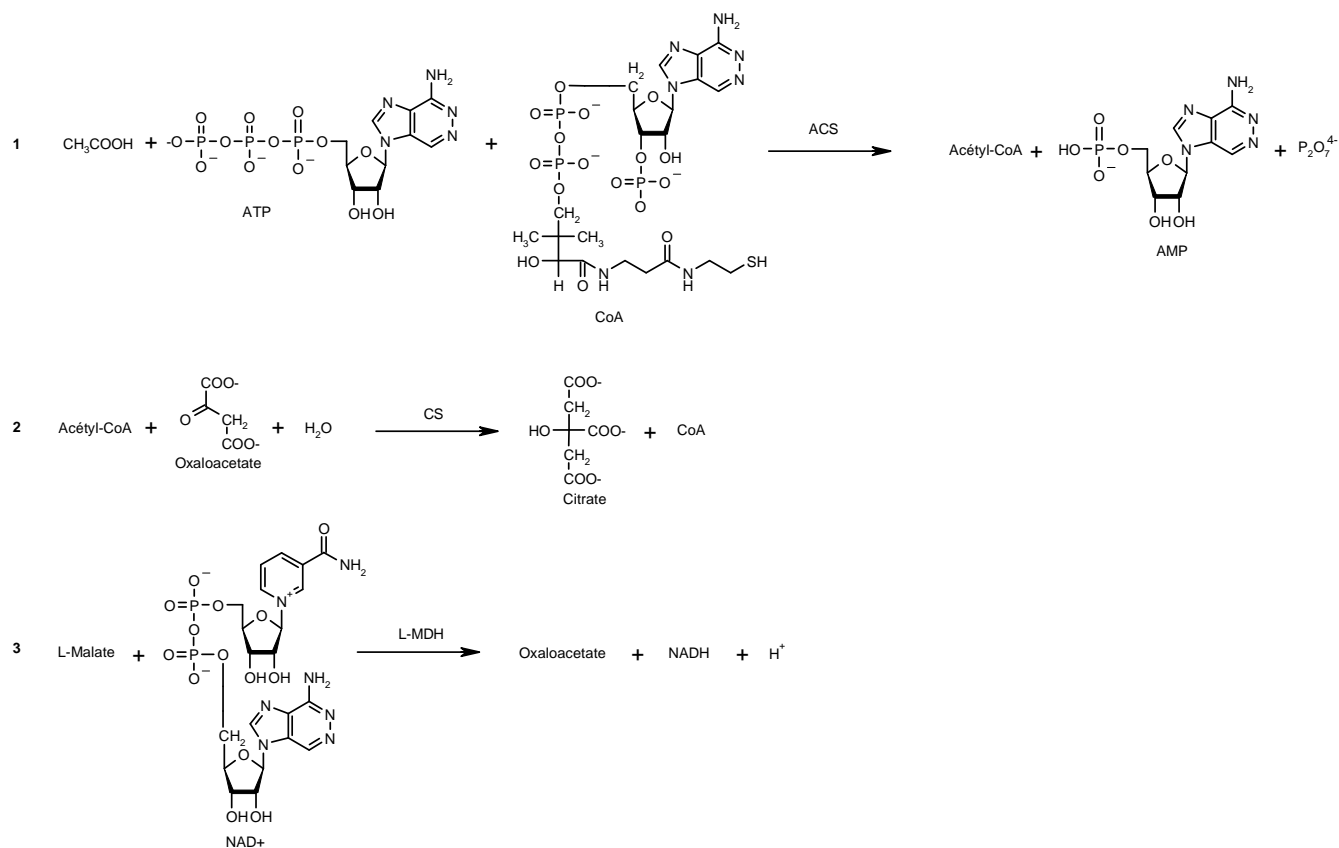


Figure 35 : Principe du dosage enzymatique des acétyles

Le nombre de moles d'acide acétique est enfin calculé selon les indications proposées par la société Boehringer (Annexe 2).

Enfin, la spectrométrie de masse MALDI-MS est un bon outil pour estimer la distribution des acétyles le long de la chaîne principale.¹¹⁸ Gonçalves et *al.*,¹⁴¹ ont ainsi pu démontrer que la distribution des acétyles sur les résidus xylose était très aléatoire. De plus dans les régions où il n'y a pas de groupes acide 4-*O*-méthylglucuronique, le degré de substitution en acétyle est inférieur à la moyenne.

I.3.2. Analyse structurale des oligosaccharides

L'analyse structurale d'un polysaccharide requiert 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 glycochimie. Les liaisons engageant un ou plusieurs acides hexuroniques peuvent en revanche 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.

1.3.2.a. Hydrolyse des liaisons glycosidiques

Le découpage partiel des polymères à des fins analytiques nécessite l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. Nous présentons ici différentes méthodes possibles.

➤ Hydrolyse enzymatique

Les méthodes les plus efficaces sont naturellement celles qui font appel aux enzymes spécifiques qui vont permettre l'obtention d'unités de répétition plus facilement analysables. Ce mode de préparation est particulièrement bien adapté à des polymères homogènes tels que les glucuronoxylanes (GX) qui sont composés d'enchaînements homogènes de résidus D-Xylp. La dégradation complète des GX en monomères nécessite l'action combinée d'endo- ou d'exoenzymes qui non seulement hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale, mais également libèrent les constituants des chaînes latérales. L'ensemble des activités nécessaires à la rupture des liaisons de la chaîne principale est regroupé sous le terme général de xylanases alors que celles qui éliminent les chaînes latérales sont parfois appelées enzymes accessoires¹⁴² (Figure 36). Les xylanases sont très largement répandues dans tous les compartiments du monde vivant, notamment des microorganismes (bactéries, levures et champignons). Les endoxylanases (1,4-β-D-xylane-4-xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8) rompent la liaison β-(1→4) à l'intérieur de la chaîne principale de xylane. Elles libèrent des oligomères linéaires ou substitués de fort, puis de faible DP. Les spécificités de reconnaissance des sites de coupure des endoxylanases sont multiples et variables selon les sources. La majorité des endoxylanases décrites dans la littérature sont capables d'hydrolyser une liaison dans un environnement non substitué. Cette règle générale a pourtant des exceptions. Citons, à titre d'exemple, une endoxylanase purifiée de *Bacillus subtilis* qui reconnaît un résidu acide glucuronique latéral et hydrolyse la liaison β-(1→4)-xylosyl du xylose non substitué adjacent. Elle est ainsi désignée sous le terme de glucuronoxylane xylanohydrolase.¹⁴³ Les xylosidases (1,4-β-D-xylane-4-xylohydrolase, E.C. 3.2.1.37) hydrolysent de petits oligomères libérés par les endoxylanases, en xylose monomère. Dans le cas des GX, les enzymes accessoires impliquées dans la libération des substituants sont de deux types. Les glucuronidases (xylane-α-D-1,2-glucuronohydrolase, E.C. 3.2.1.131) libèrent l'acide glucuronique ou son dérivé méthylé, l'acide 4-O-méthylglucuronique, fixés sur la chaîne de xylane par une liaison α-(1→2).¹⁴⁴ Leur action se conjugue à celle des endoxylanases strictes pour l'hydrolyse totale des xylanes. Les xylanes acétylestérases (E.C. 3.2.1.6) sont encore peu décrites dans la littérature. Elles sont capables de libérer de l'acide

acétique à partir d'un xylane dont des résidus xylose portent un groupement acétyle sur les carbones C-2 ou C-3. Elles sont importantes dans l'hydrolyse des xylanes car la présence de groupements acétyle sur le squelette principal est un obstacle à l'adsorption des endoxylanases sur leur substrat.¹⁴⁵ L'hydrolyse enzymatique va conduire à l'obtention de différents xylo-oligosaccharides neutres et acides.

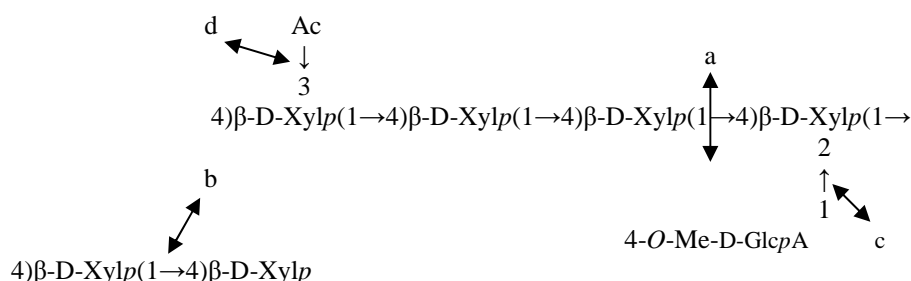


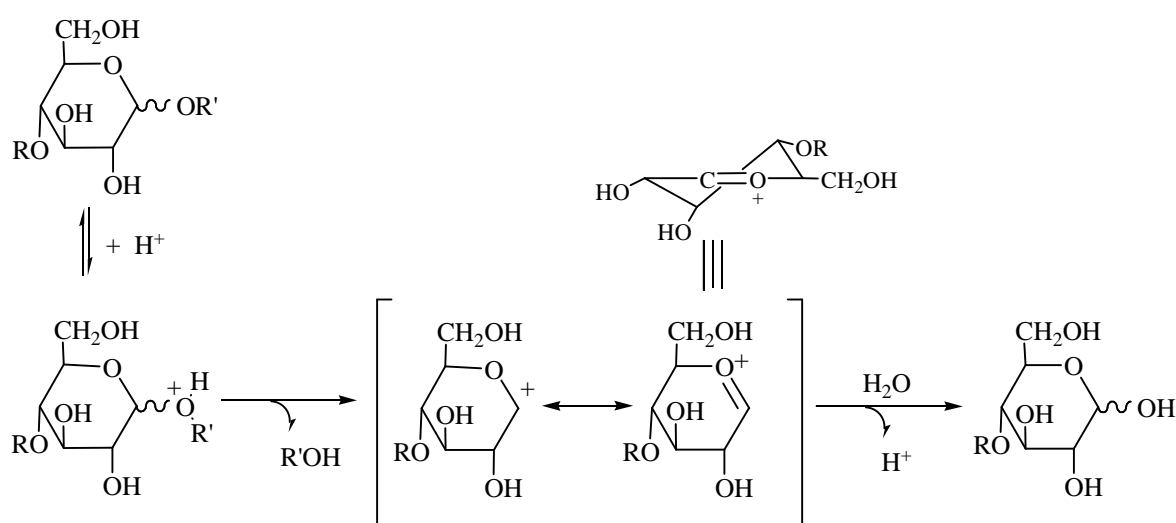
Figure 36 : Hydrolyse enzymatique de GX (d'après Bonnin et coll.,¹⁴²), a : 1,4 β D xylane-4-xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8 ; b : 1,4 β D xylane-4-xylohydrolase, E.C. 3.2.1.37 ; c : xylane β D 1,2 glucuronohydrolase, E.C. 3.2.1.31 ; d : acétyl-estérase (E.C. 3.2.1.6).

Une nouvelle glucuronylestérase a été récemment découverte par Špáníková et Biely.¹⁴⁶ Elle est capable d'hydrolyser les esters méthyliques de l'acide 4-O-méthylglucuronique, qui les lie par exemples à des alcools aromatiques de la lignine.

➤ *Hydrolyse acide ménagée*

L'hydrolyse acide ménagée non sélective constitue parfois une approche complémentaire à l'hydrolyse enzymatique. Grâce au caractère aléatoire de l'hydrolyse acide, certains motifs structuraux du polysaccharide peuvent être identifiés dans plusieurs oligosaccharides, ce qui peut permettre de reconstruire le polymère à partir des structures oligosaccharidiques. Quand les liaisons glycosidiques du polysaccharide sont comparables en termes de stabilité, l'hydrolyse acide fournit un mélange statistique d'oligosaccharides et de monosaccharides ; c'est le cas des polysaccharides neutres. Dans le cas des polysaccharides acides, comme les glucuronoxylanes, la stabilité chimique des liaisons impliquant des acides uroniques confère à ces dernières une résistance parfois importante aux acides forts tels que HCl ou TFA, y compris à une température élevée. C'est pourquoi on obtient généralement une grande proportion d'acides aldobiuroniques par hydrolyse acide de ces xylanes.⁹² L'hydrolyse partielle est alors toujours statistique mais tient compte des stabilités relatives des liaisons osidiques ; on parle alors d'hydrolyse sélective. Comme dans le cas de l'hydrolyse enzymatique, l'hydrolyse chimique va conduire à l'obtention de différents xylo-oligosaccharides neutres et acides.

La Figure 37 illustre le mécanisme général de l'hydrolyse acide des liaisons glycosidiques, incluant 3 étapes successives : la protonation de l'oxygène anomérique, suivie de la décomposition de l'acide conjugué pour former un ion oxonium, qui peut exister en conformation demi-chaise ; cette étape est déterminante. La dernière étape est une addition d'eau rapide pour régénérer une extrémité réductrice. Des travaux ont montré que la présence d'un groupement carboxylique en C-5 du méthylglucose (méthylglucuronoside) réduit la vitesse de l'hydrolyse de 50 à 70%. Entre les hydrolyses des liaisons glycosidiques du cellobiose et de l'acide cellobiuronique, la vitesse diminue de 97%. Cette diminution de réactivité s'explique par les effets inducteurs et conformationnels du groupement carboxyle en C-5, ce que nous avons déjà expliqué précédemment.



R, R' = Aglycone ou chaîne glucidique

Figure 37 : Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides, d'après Bemiller¹⁴⁷

➤ Autohydrolyse

L'autohydrolyse des polysaccharides est une méthode d'hydrolyse douce, suivant le même mécanisme que l'hydrolyse acide mais induite par les fonctions essentiellement carboxyliques et/ou sulfates portées par les acides uroniques qui entrent dans la composition du polysaccharide. L'autohydrolyse des polysaccharides consiste donc en leur hydrolyse par leurs propres groupements acides. Cette méthode a été développée pour l'étude des polysaccharides sulfatés et de phycocolloïdes anioniques.¹⁴⁸

La sélectivité de cette réaction d'autohydrolyse est basée sur la différence de stabilité des liaisons glycosidiques mises en jeu ; elle dépend également de la distribution des groupements acides autour de ces liaisons glycosidiques. Ainsi comme le montre la Figure 38,

la liaison glycosidique la plus labile d'un polysaccharide acide est la liaison précédant l'unité d'acide uronique dans la chaîne polysaccharidique.

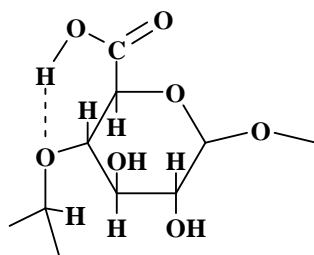


Figure 38 : Catalyse intramoléculaire par un groupement carboxyle d'une liaison 1→4 précédant un acide uronique (d'après Ciancia et Cerezo)¹⁴⁸

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

➤ *Autres méthodes d'hydrolyse*

D'autres méthodologies sont employées pour obtenir une hydrolyse spécifique. Plus délicates à mettre en œuvre, ces méthodes de ruptures chimiques sélectives, notamment des acides uroniques, existent parmi lesquelles la dégradation alcaline en milieu réducteur qui conduisent respectivement à la libération d'oligosaccharides natifs et modifiés.

β -élimination ou dégradation alcaline

La dégradation alcaline est une méthode antérieure aux méthodes d'analyses liées à la méthylation et a été développée au début du 20^{ème} 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 β -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 39 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).¹⁰³ L'intermédiaire (b) subit alors le processus de β-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.

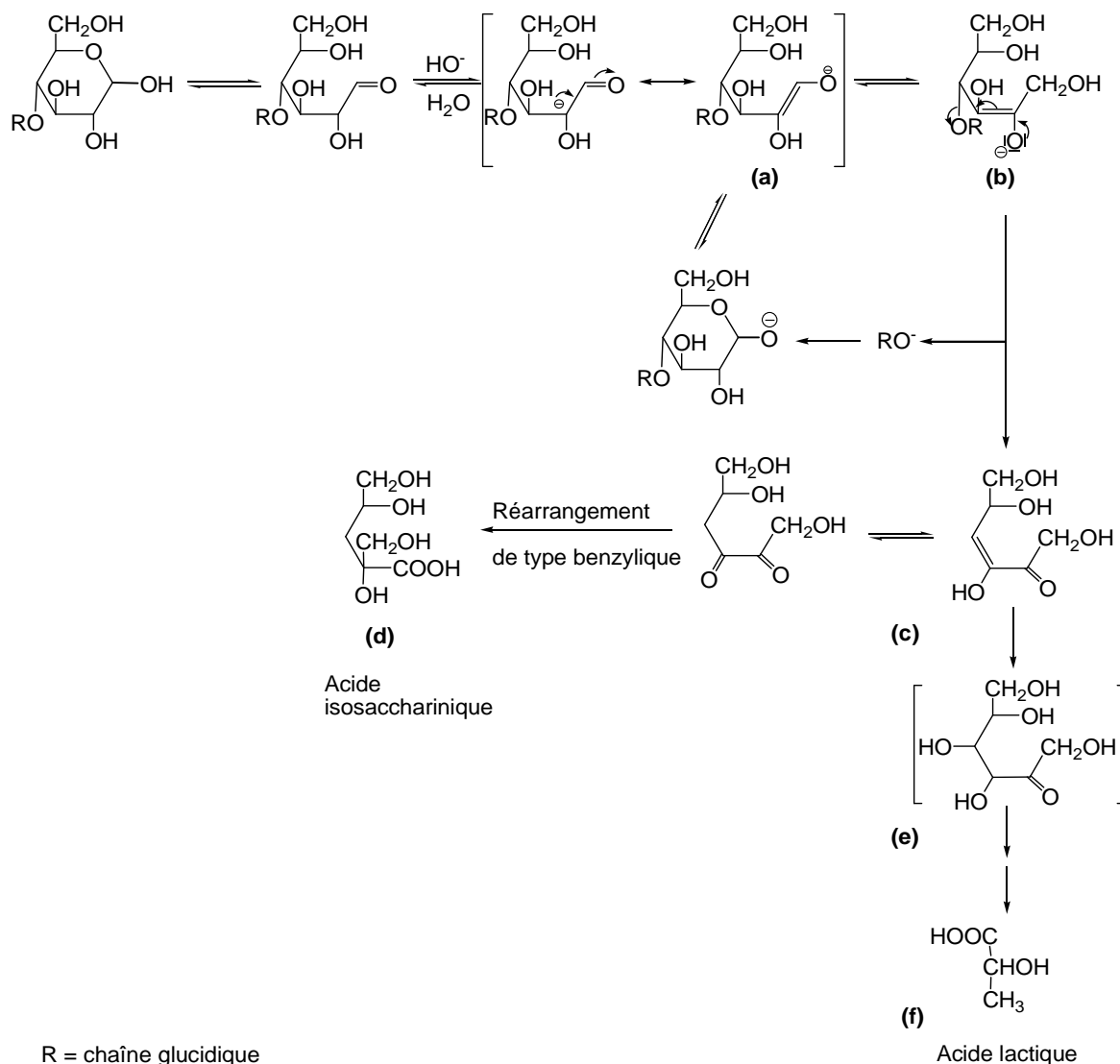


Figure 39 : Dépolymérisation en milieu basique ou peeling d'un glycane lié en 1→4 (d'après Lai¹⁰³)

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 β -élimination conduisant à la libération du substituant en C-4. 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.*,¹⁴⁹ en 1967 puis par Lawson et *al.*,¹⁵⁰ en 1969. Le mécanisme décrit Figure 40 a été détaillée par l'équipe de Lindberg.¹⁵¹

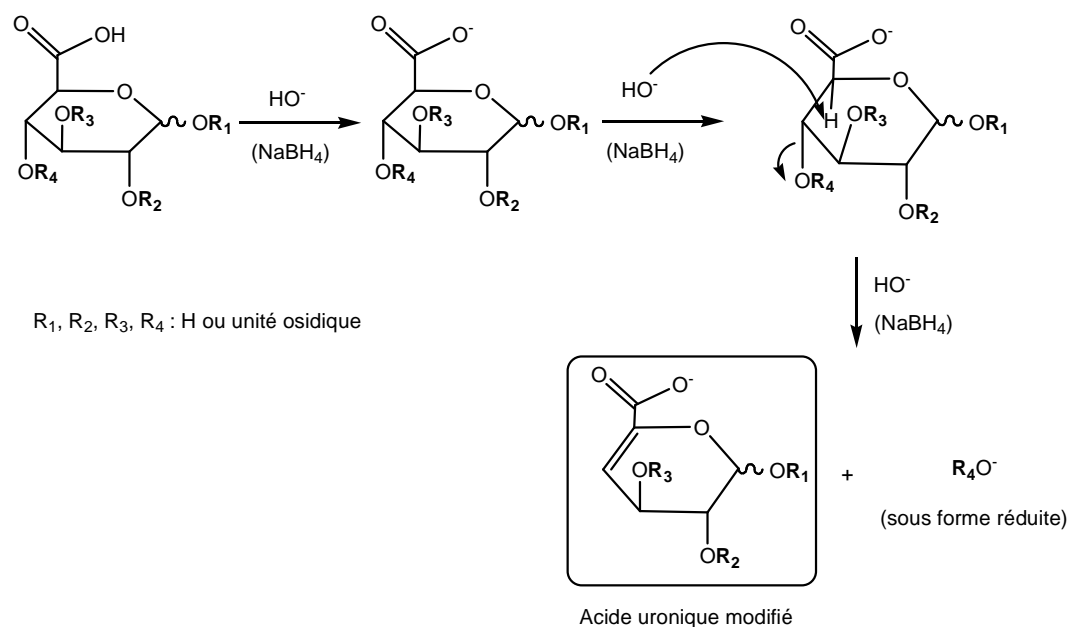


Figure 40 : Dégradation alcaline en milieu réducteur d'un polysaccharide acide (d'après Lindberg et al.,)¹⁵¹

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 41).

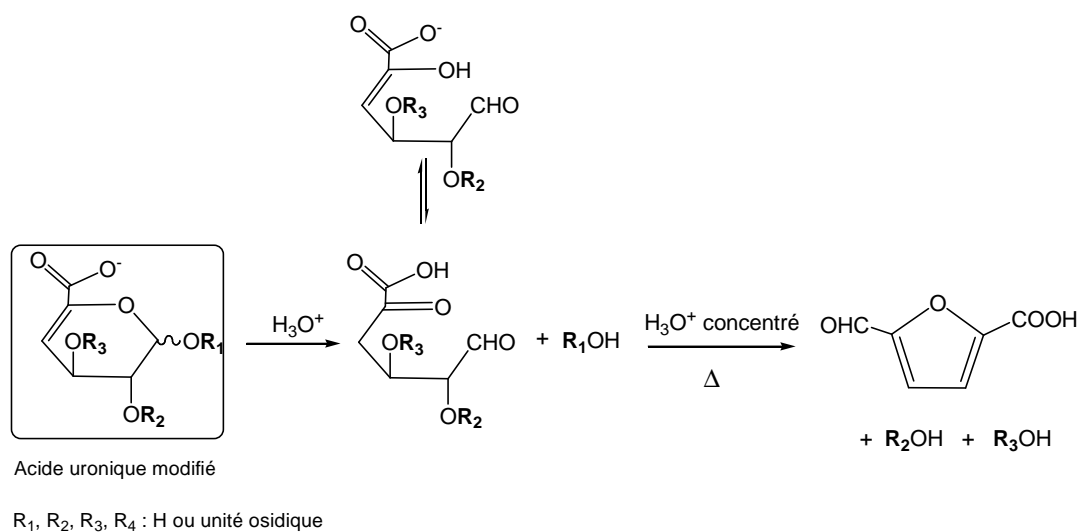


Figure 41 : Libération des substituants R₁, R₂, R₃ en milieu acide après la β -élimination (d'après Lindberg et al.,¹⁵¹)

1.3.2.b. Séparation des oligosaccharides

La séparation des mélanges d'oligosaccharides après hydrolyse est certainement l'étape la plus fastidieuse de l'étude structurale d'un polysaccharide. Les fractions oligosaccharidiques peuvent être séparées par chromatographie d'exclusion stérique en fonction de leur masse moléculaire ou plus exactement en fonction de leur volume hydrodynamique ; d'autres méthodes de séparation sont liées à la charge des molécules (chromatographie d'échange d'ions), à leur polarité (chromatographie en phase inverse), et plus rarement à leur structure (chromatographie d'affinité).

1.3.2.c. Méthodes spectroscopiques et détermination structurale des oligosaccharides

Les méthodes précédemment décrites permettent l'obtention d'oligosaccharides plus faciles à analyser par spectroscopie.

➤ *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 (fonction C=O des acides uroniques, liaisons C=C aromatiques), peuvent révéler la présence de catégories de polysaccharides (hémicelluloses, pectines, lignines). A titre d'exemple, des bandes vers 1510 et 1595 cm^{-1} sont caractéristiques des cycles aromatiques de la lignine et les bandes $\delta(\text{CH}_2)$ à 1250 et 1465 cm^{-1} sont caractéristiques des xylanes.

➤ *Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)*

La spectroscopie RMN permet de déterminer la structure primaire complète d'une chaîne oligosaccharidique. Elle mène en outre à l'identification de chacun des monosaccharides et précise l'enchaînement des monomères, les points de branchement et les anoméries.

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 α ou β 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 spectres COSY (Correlation SpectroscopY) homonucléaire (corrélation ^1H - ^1H) permettent de mesurer toutes les constantes de couplage (J) et les déplacements chimiques des protons qui résonnent dans la « bulk region », entre 3,2 et 4 ppm, renfermant de nombreux protons avec des fréquences de résonance proches ce qui rend leur distinction très difficile. 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 ^3J des protons anomériques. La distinction entre un α -pyranose et un β -pyranose sera fonction de la valeur de la constante de couplage entre le proton anomérique et le H-2. Une constante de couplage comprise entre 2 et 4 Hz, dans le cas d'un H-2 axial est spécifique d'un α -pyranose alors que la constante de couplage d'un β -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}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 oses 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 a proposé en 1989 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 corrélérer 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 corrélations ^1H - ^{13}C et les constantes ^3J associées. Il est alors possible de corrélérer 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 42). Ainsi, on peut préciser l'enchaînement des monosaccharides et donc, la séquence de l'oligosaccharide.

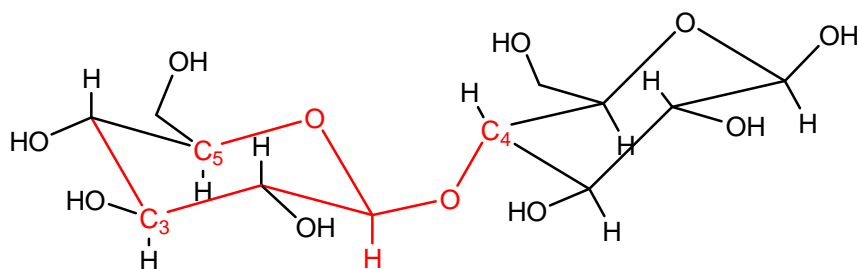


Figure 42 : Schéma représentant les corrélations $^3\text{J}_{\text{H,C}}$ carbone/proton observées à partir du proton H-1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique la liaison glycosidique.

➤ Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse complémentaire à la RMN, aux applications variées et qui n'a vu son champ d'utilisation s'étendre aux macromolécules que depuis peu de temps. Cette technique était employée à l'origine pour caractériser les éthers méthyliques résultant des expériences de perméthylation, la position des groupements méthyle de chaque monosaccharide issu d'une hydrolyse acide étant caractéristique des liaisons entre monomères. Mais ce résultat ne permet pas d'accéder à la séquence oligosaccharidique.

Même si la méthode est destructive pour l'échantillon, la spectrométrie de masse présente l'avantage de ne nécessiter que de très faibles quantités de matériel (10 à 1000 fois moins que pour la RMN). La clé de l'analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse réside dans le choix de la technique d'ionisation.

Ionisation par MALDI

Le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation) est une méthode d'ionisation introduite par Karas et Hillenkamp en 1988.¹⁵² Permettant d'analyser des molécules de masse moléculaire supérieures à 300 kDa, elle est particulièrement adaptée à l'étude des *N*- ou *O*-glycanes. Actuellement, le mécanisme exact du MALDI n'est pas décrit avec précision. Un échantillon solide est cocrystallisé 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.

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 43). 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.

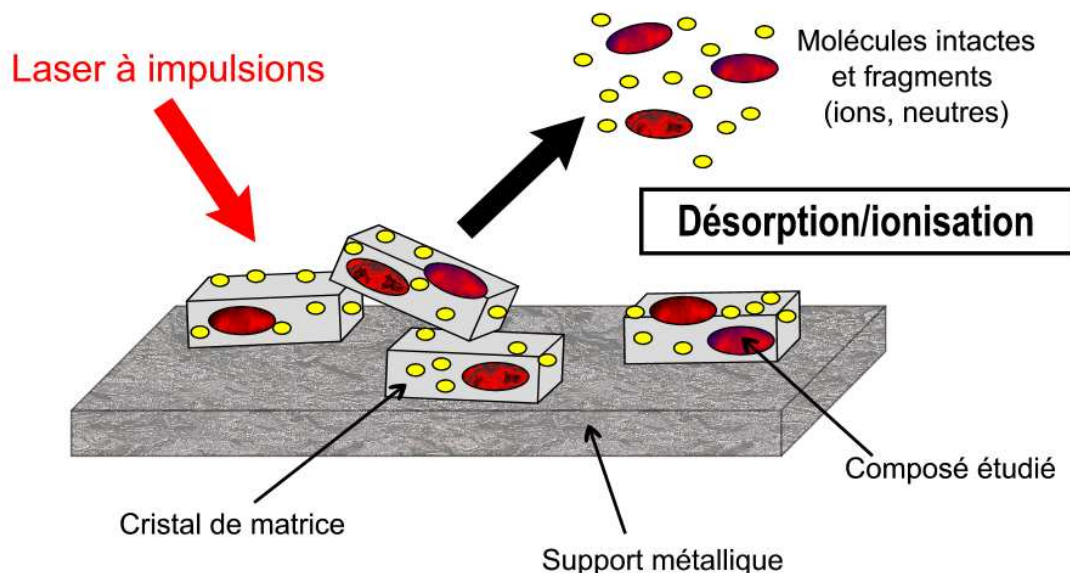


Figure 43 : Principe du MALDI (d'après Karas et *al.*,¹⁵²)

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.

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.

➤ *Couplage spectrométrie de masse à d'autres techniques*

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

La spectrométrie de masse en tandem (SM-SM), qui consiste à coupler deux spectromètres de masse, est également utilisée pour l'élucidation de mélanges d'oligosaccharides. Dans cette technique, le premier spectromètre de masse sert à produire et à séparer les ions moléculaires des différents composants du mélange et le second, à fragmenter successivement ceux-ci et à enregistrer les spectres des ions parents correspondants. La détermination complète de séquences oligosaccharidiques est alors possible en combinant une technique d'ionisation FAB avec la spectrométrie de masse en tandem.¹⁵³

1.3.2.d. Analyse et détermination structurale des polysaccharides

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

La spectrométrie de masse MALDI peut également être appliquée aux macromolécules de haut poids moléculaire si leur polydispersité n'est pas trop importante (inférieure à 1.1). L'utilisation de cette technique pour l'analyse des polysaccharides polydisperses requiert le couplage avec une séparation préalable par chromatographie d'exclusion stérique. Ainsi on diminue la polydispersité des échantillons jusqu'à des valeurs compatibles avec l'analyse MALDI.¹⁵⁴

1.3.2.e. Profil de masse et poids moléculaire

Le poids moléculaire est une propriété clé d'un polymère car il influence directement les propriétés physiques comme la solubilité, la viscosité... Une estimation du degré de polymérisation et donc *a fortiori* du poids moléculaire peut être faite par le dosage des oses réducteurs.¹²⁴ Globalement les xylanes ont un degré de polymérisation relativement faible (en général inférieur ou égal à 200). Même si la connaissance du poids moléculaire moyen est une donnée intéressante, c'est surtout la distribution en masse qui caractérise un polymère. En effet, les polysaccharides végétaux peuvent présenter une polydispersité importante. Une des techniques les plus répandues pour ce type d'analyse est la chromatographie d'exclusion stérique qui permet de séparer les macromolécules en fonction de leur poids moléculaire, ou plus exactement en fonction de leur volume hydrodynamique qui prend en compte la conformation des molécules. La calibration peut être effectuée avec des dextrans de poids moléculaire connu, s'ils présentent une forte similitude avec les polysaccharides étudiés à l'aide d'un réfractomètre comme détecteur. La spectrométrie de masse MALDI est une alternative dont le développement semble limité.

Depuis quelques années, une nouvelle technique est disponible pour déterminer la masse moléculaire de polysaccharides ; c'est le détecteur MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering) que l'on couple classiquement à une chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Le principe est simple ; un faisceau de lumières polarisées est envoyé sur l'échantillon et la dispersion de la lumière est détectée. Dans le cas du MALLS, la dispersion de la lumière est détectée à différents angles de façon simultanée et l'intensité de la lumière à chaque angle est proportionnelle à la masse molaire et à la concentration de la molécule. Pour les macromolécules plus petites sans dépendance angulaire de la lumière dispersée, la détection d'un seul angle est suffisante. Cependant quand les molécules sont de tailles plus importantes, davantage de lumière est diffusée dans toutes les directions et alors le MALLS devient indispensable. Dans ce système SEC-MALLS, les macromolécules polysaccharidiques sont d'abord fractionnées conformément à leur volume hydrodynamique, puis l'intensité de la

lumière dispersée et la concentration de la fraction éluée sont mesurées simultanément. La masse moléculaire absolue de la fraction est alors donnée directement. Ce système est capable de couvrir une très large fourchette de masses moléculaire et même descendre sous les 580 Daltons selon les affirmations des fabricants.¹⁵⁵

I.4. Applications, propriétés et valorisation des xylanes

La biomasse représente une importante source renouvelable de polymères pouvant être diversement valorisés. L'utilisation de ces ressources reste négligeable en comparaison avec les produits issus de l'industrie pétrolière. Les phycocolloïdes d'algues, la cellulose et l'amidon sont les principaux polysaccharides d'origine végétale à usage industriel exploités dans des secteurs variés tels que l'agroalimentaire, le textile ou l'industrie pharmaceutique. Cependant depuis quelques années, les hémicelluloses qui représentent près de 50% de la biomasse végétale,^{7, 156, 157} suscitent un intérêt croissant, c'est en particulier vrai pour les xylanes. De par leurs propriétés rhéologiques, physico-chimiques et biologiques, le domaine d'application des xylanes est très vaste. Ils sont utilisés à l'état natif mais les principales voies de valorisation de ces polysaccharides reposent soit sur leur hydrolyse pour former des précurseurs utilisés dans l'industrie chimique, soit sur leur fonctionnalisation qui permet d'envisager de nouvelles applications pharmaceutiques ou cosmétiques.

I.4.1. Xylanes natifs

I.4.1.a. Propriétés rhéologiques

Les propriétés physico-chimiques originales des xylanes les rapprochent des hydrocolloïdes. Ces derniers désignent des polysaccharides d'origine naturelle ou leurs dérivés, qui se dissolvent ou se dispersent dans l'eau pour former des solutions ou suspensions visqueuses. Les hydrocolloïdes ayant une grande affinité pour l'eau, affectent la texture du milieu auquel ils sont ajoutés et modifient la perception du consommateur vis-à-vis d'un produit, d'où leur utilisation notamment dans les secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique, en tant qu'épaississant, émulsifiant ou gélifiant. Ces polymères possèdent en solution une faible viscosité sous contrainte et une forte viscosité au repos à concentration élevée. Le xylane pur ne forme pas d'hydrogel en solution. L'ajout de chitosane est nécessaire à la formation de gel dont les propriétés de gonflement sont intimement liées à la part de chitosane dans le mélange.¹⁵⁸ La formation de l'hydrogel est attribuée au domaine cristallin du xylane lié aux chaînes de chitosane ainsi qu'aux interactions électrostatiques entre l'acide

glucuronique du xylane avec les groupes amines du chitosane.¹⁵⁹ Il existe différentes méthodes de formation des hydrogels. Une première consiste à chauffer un mélange de xylane et de chitosane en milieu acide avant évaporation après casting.¹⁵⁸ La polymérisation d'hémicellulose et de hydroxyléthylméthacrylate en présence de sels de sulfate et de sulfite comme système initiateur de la réaction en condition aqueuse conduit également à la formation d'hydrogels.¹⁶⁰ Ainsi les gels formés peuvent être employés en tant qu'agents de texture dans les produits désinfectants ou les pansements.¹⁶¹ Par ailleurs, leurs propriétés liantes ont été exploitées en tant qu'additifs dans la préparation des pâtes à papier. Ils apportent une meilleure flexibilité aux fibres et améliorent la résistance mécanique du papier.¹⁶²

1.4.1.b. Activités biologiques

Les parois cellulaires végétales sont des réservoirs potentiels de polysaccharides biologiquement actifs.¹⁶³ La littérature est abondante à ce propos et témoigne de l'intérêt des hémicelluloses et en particulier des xylanes dans ce domaine. De nombreux articles attestent des propriétés immunomodulantes ou immunostimulantes des xylanes. Ebringerová et coll.,⁷ ont utilisé le test mitogénique des lymphocytes T pour vérifier les propriétés du MGX extraits de graines de sarrasin. Ce test avait déjà été utilisé pour déterminer ces mêmes propriétés sur des xylanes d'épis de maïs¹⁶⁴ et de plantes médicinales (*Rudbeckia fulgida*, *Althea officinalis* et *Mahonia aquifolium*)^{165, 166} mais aussi sur des oligosaccharides de coquilles d'amandes.¹⁶⁷ Des hétéoxyanes de grand plantain (*Plantago major*) se sont révélés avoir de fortes activités anti-complémentaires.¹⁶⁸ Des propriétés antioxydantes de xylanes ont été rapportées sur des extraits de sauge,¹⁶⁹ de diverses plantes médicinales (guimauve officinale, rudbeckie et mahonia),¹⁷⁰ de coquilles d'amandes,¹⁷¹ de riz et d'éleusine (variété du millet).¹⁷² Dans ces deux derniers cas, il s'agissait d'arabinoxylanes féruloylés possédant de très fortes activités antioxydantes pouvant être 500 fois plus élevées que celles de polysaccharides sulfatés. Les auteurs expliquent qu'en plus de l'acide férulique, un acide phénolique répandu dans les céréales et possédant un fort pouvoir antioxydant, la présence des oses avec des groupes C=O ainsi que le degré et la nature de la polymérisation ont un impact important sur l'activité antioxydante de ces AX. D'autres glucuronoxylanes et des hétéoxyanes issus de plantes médicinales ont respectivement présenté des activités anti-toussives¹⁷³ et des effets anti-ulcéralents.¹⁷⁴ Les xylanes sulfatés, présentent, quant à eux, des propriétés anti-coagulantes et anti VIH.^{175, 176}

1.4.1.c. Propriétés nutritionnelles

Les xylanes sont employés en tant que fibres alimentaires. Ils ne sont pas dégradés par les enzymes digestives humaines et permettent ainsi d'accélérer le transit intestinal. En outre, leur ingestion diminuerait de manière significative l'accumulation des lipides dans le foie et le taux de cholestérol sanguin.¹⁷⁷

1.4.1.d. Micro et nanoparticules de xylanes

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les xylanes ne sont pas dégradés lors de la digestion et peuvent franchir la barrière intestinale. Cette particularité est un facteur intéressant dans le cadre de son utilisation potentielle dans l'industrie pharmaceutique. Ainsi, les xylanes notamment issus d'épis de maïs sont utilisés pour la synthèse de micro et nanoparticules. Les micro et nanoparticules peuvent être utilisées en tant qu'agent d'enrobage pour l'administration orale de médicaments. Elles sont réalisées par neutralisation avec du HCl d'une solution alcaline de xylanes en présence de tensioactif.¹⁷⁸ La taille des particules croît avec la concentration en polymères. Les particules magnétiques sont utilisées comme agents de contraste et marqueurs pour l'imagerie en résonance magnétique. Elles sont synthétisées par émulsion entre une solution alcaline de xylanes et une solution magnétique de fer dans un mélange chloroforme/cyclohexane (1/4, v/v)¹⁷⁹ de façon à former des particules dont le diamètre est estimé par diffraction laser à environ 25 µm. Les particules magnétiques de polymères sont nettement plus résistantes à la dissolution à des pH proches de celui de l'estomac que les particules magnétiques non enrobées de xylanes.

1.4.1.e. Les matériaux plastiques à partir de xylanes des céréales

Les polysaccharides, en particulier les xylanes peuvent également être valorisés en les utilisant comme substrats de base pour l'élaboration de films plastiques potentiellement biodégradables. Face à l'épuisement des ressources pétrolières, les scientifiques s'intéressent à la synthèse de ces nouveaux films d'origine végétale. De nombreuses études décrivent l'utilisation d'autres ressources naturelles ou de co-produits comme matière première pour la synthèse de plastiques. C'est le cas pour la paille de blé,¹⁸⁰ les polysaccharides d'algues rouges,¹⁸¹ la cellulose¹⁸² ou encore les hémicelluloses.¹⁸³ Les xylanes ont été très largement étudiés. Dans le cas d'arabinoxylanes d'orge, il est possible de former des films sans l'ajout de plastifiant.¹⁸⁴ Les films alors obtenus par casting, sont rigides, assez cassants, hygroscopiques et amorphes. Sternemalm et coll.,¹⁸⁵ ont par la suite étudié l'influence de la substitution en arabinose sur les propriétés des films formés en déramifiant l'arabinoxylane

avec de l'acide oxalique. Les matériaux préparés à partir d'arabinoxylanes débranchés (de ratio Ara/Xyl compris entre 0.3 et 0.52) sont transparents et aucune différence dans l'apparence, la structure et la fragilité n'est observée. Cependant, à un fort taux d'humidité, une relation existe entre le taux de substitution en arabinose et l'hygroscopicité du matériel. L'analyse des propriétés mécaniques indique que l'élévation de la teneur en arabinose induit un net effet plastifiant. Les xylanes peuvent également être additionnés au gluten de blé en présence de glycérol pour former des films biodégradables.¹⁸⁶ L'ajout de xylanes de bouleau dans des films de gluten de blé permet de réduire ses coûts de production sans pour autant en altérer ses qualités, ce qui en fait un excellent additif.

I.4.2. Xylooligosaccharides d'intérêt

Les xylanes natifs peuvent être hydrolysés pour obtenir des oses élémentaires qui fourniront après fermentation, déshydratation ou réduction par hydrogénation catalytique, toute une gamme de produits dont certains présentent une haute valeur ajoutée. Ces hydrolyses peuvent être de plusieurs ordres : enzymatiques, chimiques ou la combinaison des deux selon la finalité du produit et l'échelle à laquelle il est produit.

I.4.2.a. Le cas des xylo-oligosaccharides(XOs) d'intérêt biologique

Les xylo-oligosaccharides sont naturellement présents dans les fruits, les légumes, les végétaux, le lait et le miel.¹⁸⁷ Ils sont majoritairement produits à partir de matières lignocellulosiques contenant des xylanes comme c'est le cas pour le bois d'eucalyptus, des épis de maïs, des fibres de lin, des coquilles d'amandes, des cosses de riz ou de sarrasin ou de la paille de blé. Ils peuvent être obtenus par des méthodes chimiques (autohydrolyse dans l'eau par chauffage micro-ondes ou à la vapeur, hydrolyse par des acides, les alcalis), par hydrolyse enzymatique directe ou par une combinaison des deux.¹⁸⁸ Les xylo-oligosaccharides sont utilisés à de nombreuses fins qu'elles soient alimentaires ou non (Figure 44).

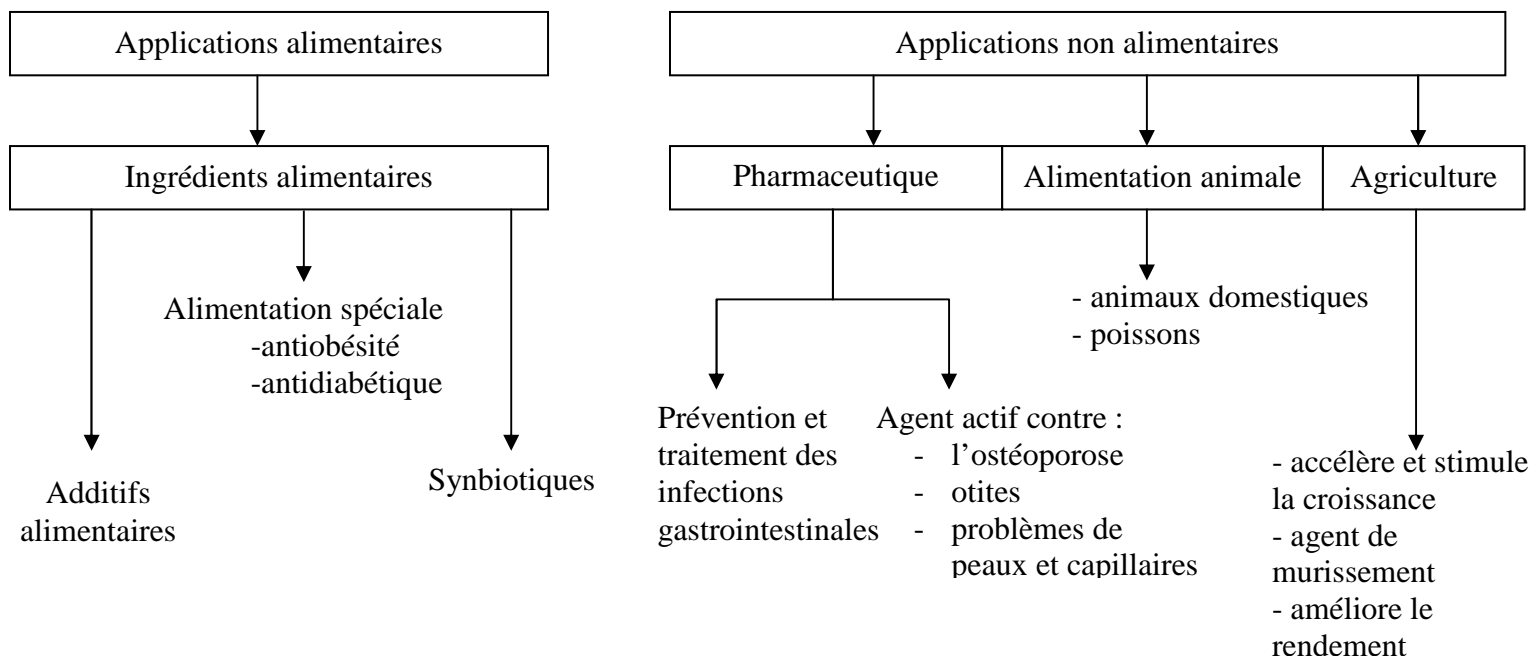


Figure 44 : Exemples d'application des xylo-oligosaccharides (d'après Vàquez et *coll.*,¹⁸⁷)

Cependant les applications présentées en Figure 44 ne sont pas exhaustives. Moure et *coll.*,¹⁸⁸ ont rapporté l'abondance de la littérature à propos des effets et des applications relatifs aux oligosaccharides de xylanes. Ces effets sont souvent d'ordre biologique et ces molécules se voient donc valorisées comme additifs alimentaires, nutraceutiques ou pharmaceutiques. Les propriétés de ces oligomères peuvent être en plus des exemples cités ci-dessus, antioxydantes, antimicrobiennes,¹⁸⁹ prébiotiques,¹⁹⁰ anti-inflammatoires ou encore cytotoxiques envers les cellules de leucémie aiguë lymphoblastique.¹⁹¹ Aujourd'hui encore, malgré les effets bénéfiques sur la santé, l'utilisation de xylo-oligosaccharides à l'échelle industrielle reste très limitée. Le marché japonais, en incorporant des xylo-oligosaccharides dans l'alimentation dès 1996,¹⁹² fait figure de pionnier dans le domaine. L'Europe commence à se positionner sur le marché. L'intérêt pour les XO dans l'industrie alimentaire et le développement de l'alimentation fonctionnelle ne se dément pas, ouvrant de nombreuses opportunités de valorisation des xylanes.

La dérivation des xyloxydes tout comme leur fonctionnalisation offre de nouvelles pistes de valorisation. Même si jusqu'à présent les applications des produits ainsi obtenus restent très limitées, l'intérêt porté à ces polymères est grandissant. Les principaux dérivés chimiques des xyloxydes¹⁹³ sont présentés Figure 45.

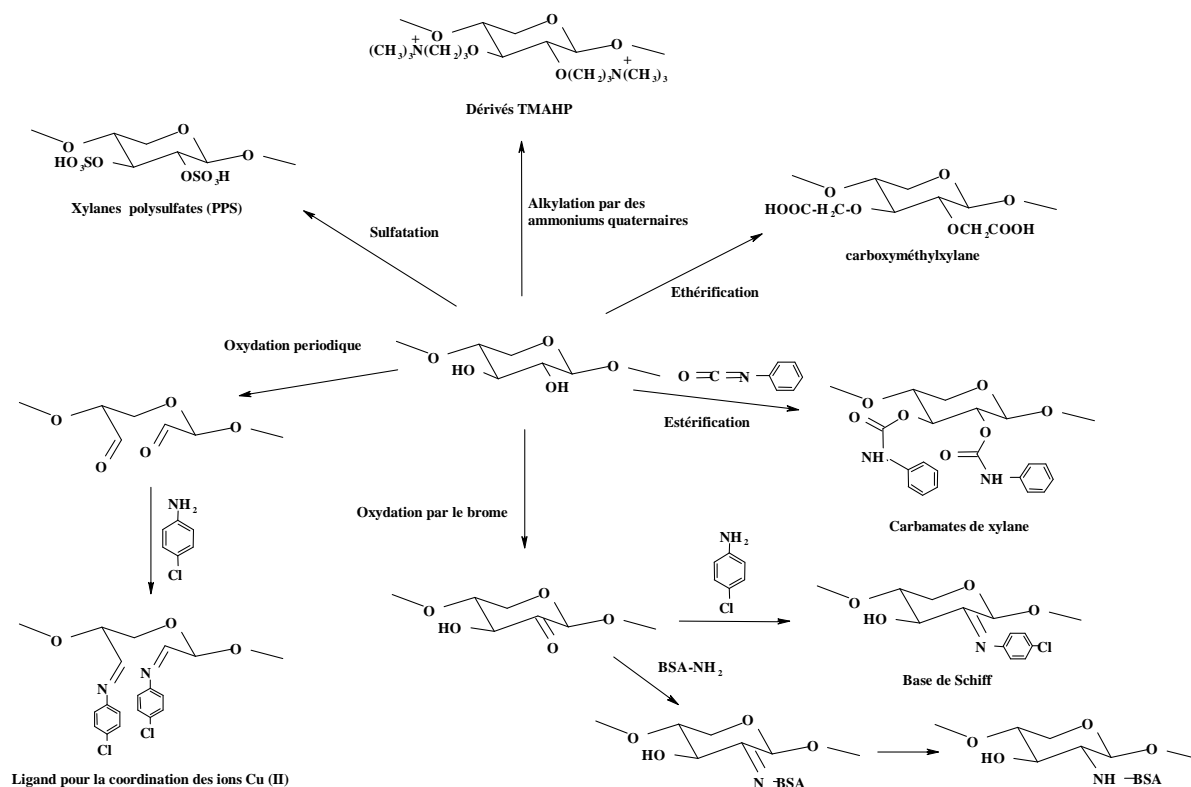


Figure 45 : Xyloxydes fonctionnalisés (d'après Ebringerová *et al.*,¹⁹³)

La préparation de ces dérivés met en jeu des réactions d'oxydation, de sulfatation, d'alkylation, d'éthérisation et d'estérisation. Comme nous l'avons dit au paragraphe I.4.1.b, les xyloxydes sulfatés, de par leur activité anticoagulante, présentent des propriétés comparables à celles de l'héparine,¹⁹⁴ ce qui laisse entrevoir des débouchés dans le domaine médical et pharmaceutique. Ils diminueraient aussi le taux de cholestérol et de triglycérides dans le sang ainsi que la formation de calculs rénaux. Parmi les produits d'éthérisation, le carboxyméthylxyloxyde est employé en tant que drogue antitumorale, adhésif, détergent¹⁹⁵ ou additif dans la pâte à papier.¹⁹⁶ Des dérivés carboxyéthylés et carbamoyléthylés bifonctionnels (éthérisation avec de l'acrylamide en milieu alcalin) ont également été synthétisés récemment par Ren *et al.*,¹⁹⁷ en vue d'une valorisation dans l'industrie papetière. L'alkylation par des groupements ammonium quaternaires comme le hydroxypropyltriméthylammonium

(TMAHP) ou l'époxypropyltriméthylammonium (ETA) conduit à des dérivés utilisés comme additifs dans la fabrication de la pâte à papier. Schwikal et Heinze¹⁹⁸ ont préparé des xylanes dialkyloaminés (diméthylaminoéthyl, diéthylaminoéthyl et diisopropanylaminoéthyl) sensibles au pH et amphotériques grâce à la présence simultanée d'acides uroniques et de groupes amines. L'introduction de longues chaînes sur un glucuronoxylane via une réaction de *O*-alkylation mène à des composés amphiphiliques trouvant leurs applications comme émulsifiant ou tensio-actifs.¹⁵⁶ L'oxydation périodique des xylanes, suivie d'une amination réductrice, peut donner des molécules ayant également des propriétés tensio-actives. Enfin l'estérification des xylanes par des groupements carbamates conduit à des matériaux thermoplastiques.¹⁹⁹

I.4.3. Etude de valorisation des xylanes de bois

Nous venons de détailler les applications des xylanes en général, nous allons plus particulièrement nous intéresser à la valorisation de glucuronoxylanes de bois. Les applications sont sensiblement identiques mais l'avantage de l'utilisation de co-produits de bois est qu'il n'y a pas de conflit d'intérêt avec une autre industrie, comme cela peut l'être pour les produits céréaliers.

I.4.3.a. Activités antitumorales

Si des propriétés immunomodulantes ont été remarquées sur des xylanes de hêtre,¹⁶⁵ par contre peu de données ont été publiées sur l'activité antitumorale de xylanes contrairement aux β -D-glucanes.²⁰⁰⁻²⁰³ Hashi et Takeshita^{204, 205} ont rapporté l'inhibition du sarcome-180 par un 4-*O*-méthylglucuronoxylane de hêtre japonais. Les auteurs expliquent ce phénomène par la stimulation indirecte du système immunitaire non-spécifique. Plus récemment le LCSN a présenté la caractérisation structurale d'un MGX de châtaignier ainsi que ses propriétés cytotoxiques envers la lignée cancéreuse A 431.^{206, 207} Dans ce cas, le MGX inhibe la prolifération et la migration des cellules A 431 ce qui peut s'expliquer par la diminution de l'expression de métalloprotéases (MMP2 et MMP9), enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. L'étude des mécanismes cellulaires semble indiquer que l'inhibition de la prolifération des cellules A 431 est relative à l'induction de l'apoptose plutôt que l'inhibition du cycle cellulaire.

1.4.3.b. Transformations des xylanes de bois après hydrolyse et applications industrielles

La Figure 46 résume schématiquement des exemples de valorisation des xylanes de bois dans le domaine de l'industrie chimique après une hydrolyse.

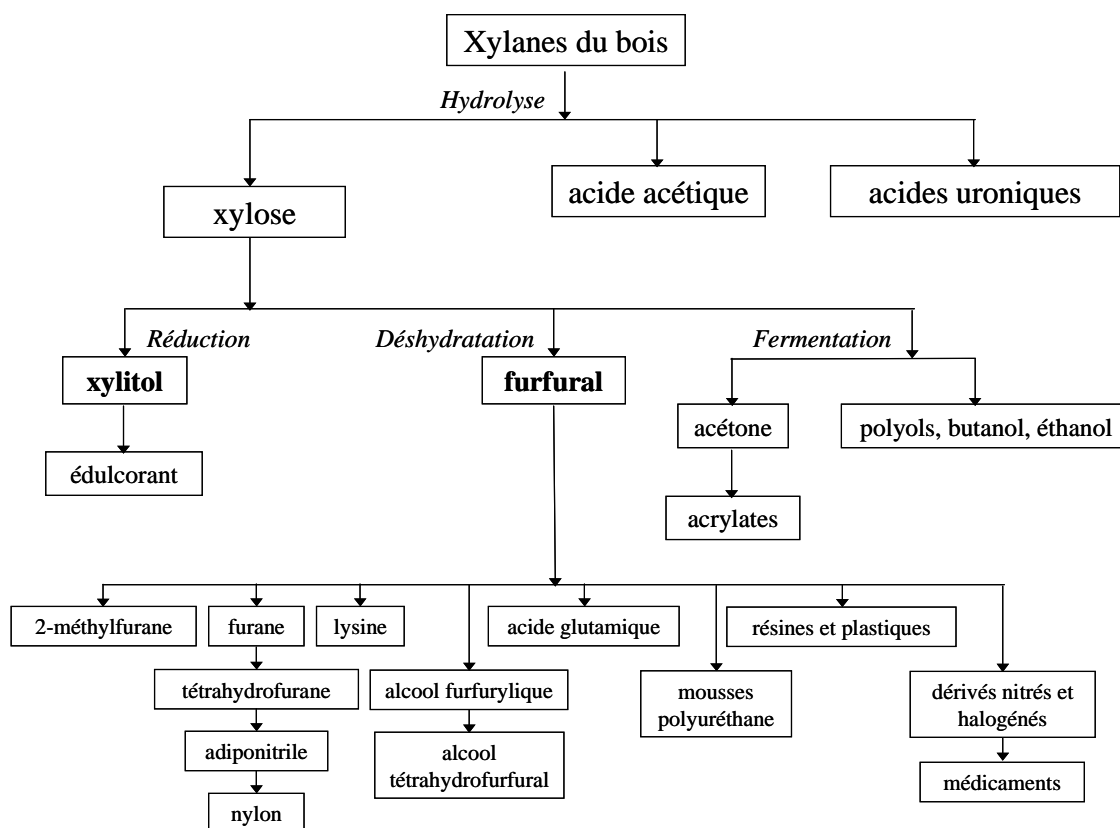


Figure 46: Hydrolyse des xylanes et exemples d'applications industrielles (d'après Popa²⁰⁸)

Les dérivés furaniques et le xylitol sont les produits d'hydrolyse les plus importants obtenus à partir des xylanes. Les dérivés furaniques sont les précurseurs pour la synthèse de nombreuses molécules et le xylitol est obtenu par réduction de la fonction aldéhyde du xylose. Il peut être produit industriellement à partir de matières riches en xylanes comme certains bois (écorces) après hydrolyse des xylanes. Le xylitol (ou E967) est un édulcorant équivalent semblable au saccharose (même pouvoir sucrant), mais présentant un faible apport calorique car il est absorbé plus lentement et partiellement métabolisé par l'organisme. Il peut se trouver à l'état naturel dans de nombreux fruits (fruits rouges, prunes) et légumes (chou-fleur). Il possède par ailleurs un caractère inhibiteur vis-à-vis du développement des caries car les bactéries sont incapables de le métaboliser contrairement aux sucres en C6. Il est actuellement utilisé comme additif dans de nombreux produits de l'industrie alimentaire (chewing-gums, chocolats, confiserie, biscuits, aliments diététiques), pharmaceutiques (pastilles à sucer, sirops), dans les cosmétiques (savons, crèmes) et dans les dentifrices et

bains de bouches.²⁰⁹ Le furfural, obtenu par déshydratation des pentoses, est un produit de base de l'industrie chimique. Il est le précurseur d'une large gamme de monomères, tel que l'alcool furfurylique, des dérivés vinyliques, acryliques et métacryliques ou époxydes, capables de polymériser.^{210, 211} Entre autres, l'alcool furfurylique, obtenu par réduction du furfural, est largement exploité pour l'obtention de résines furaniques caractérisées par une très grande résistance à la température et aux agents chimiques agressifs (solvants, acides et bases).

Plus récemment une autre molécule issue de produits d'hydrolyse des xylandes a fait son apparition sur le marché. Il s'agit du Pro-XylaneTM un glycoside développé selon des process de chimie verte à partir de hêtre et lancé sur le marché en septembre 2006. Il est synthétisé en deux étapes à partir du xylose.²¹² La première étape (Figure 47) est la condensation du xylose avec une dicétone en milieu basique. Les bases utilisées peuvent être de la soude, du bicarbonate de sodium ou de l'hydroxyde de lithium.

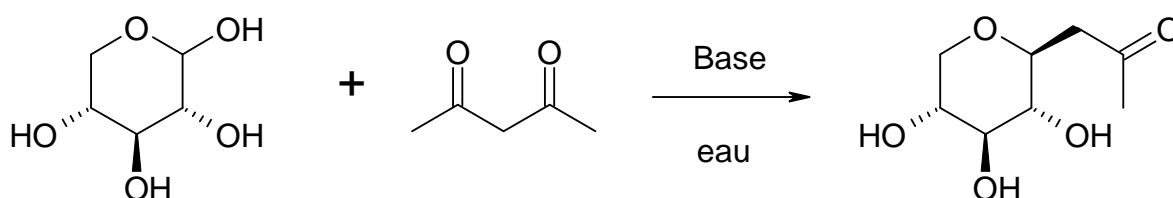


Figure 47 : Formation d'une cétone C-xylosidée.

La deuxième étape (Figure 48) est la simple réduction du composé précédemment obtenu dans l'isopropanol ou en milieux aqueux.

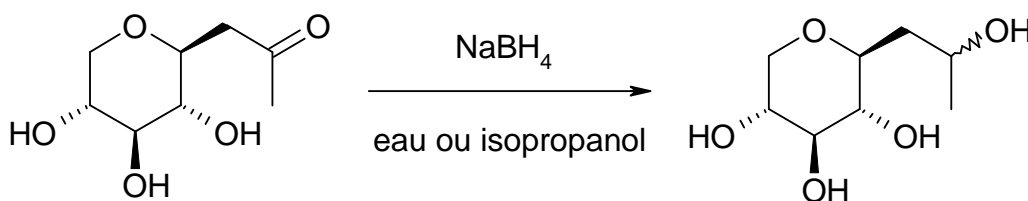


Figure 48 : Réduction de la cétone C-xylosidée.

Le Pro-XylaneTM rencontre un franc succès dans l'industrie cosmétique de par ses propriétés biologiques anti-âge sur les fibroblastes, des cellules présentes dans le tissu conjonctif. En effet il stimule la synthèse des glycoaminoglycanes sulfatés (GAGs) très impliquées dans l'état d'hydratation de la peau. Biodégradable et produit à partir de ressources renouvelables, il est enfin non écotoxique.

1.4.3.c. Les bioplastiques

Comme nous l'avons vu précédemment au paragraphe I.4.1.e, un intérêt grandissant est porté à cette nouvelle catégorie de matériaux. Dans le cas de notre laboratoire, la valorisation de xylanes de bois par l'obtention de matériaux plastiques par estérification a fait l'objet de deux thèses,^{2, 213} d'une publication²¹⁴ et d'un brevet.²¹⁵ Les matériaux plastiques ont été obtenus par acylation de xylane de hêtre commercial ou d'hétéroxylane de maïs dans le système DMA/LiCl en présence ou non de DMAP par chauffage classique ou activation micro-ondes.² Les films plastiques de xylanes esterifiés par de l'acide laurique présentent une meilleure rigidité que ceux obtenus avec de la cellulose à degré de substitution (DS) équivalent. Gröndahl *et al.*,²¹⁶ ont préparé des films uniquement à partir de glucuronoxylanes de peuplier tremble. Ces matériaux étaient très cassants et se fragmentaient pendant le séchage. L'ajout de sorbitol ou de xylitol permet d'obtenir des films transparents avec de bonnes propriétés mécaniques en abaissant la température de transition vitreuse. De plus la faible perméabilité à l'oxygène de ces films en fait de bons candidats pour l'emballage alimentaire.

Concernant notre travail proprement dit, l'objectif de cette étude est de proposer de nouvelles méthodes de délignification de sciures de châtaignier et d'extraction de xylanes à partir de ces mêmes sciures et dans la mesure du possible selon des conditions de chimie verte, plus respectueuse de l'environnement. Dans un second temps, il s'agira d'évaluer les propriétés biologiques de ces xylanes.

**Deuxième partie : Nouvelles stratégies de délignification et
d'extraction des xylanes de châtaignier (*Castanea sativa* Mill.)**

Les travaux initiés au laboratoire par Moine² dans le domaine de l'extraction et de l'analyse structurale des xylanes de bois ont montré que les bois issus de feuillus sont particulièrement riches en hémicelluloses. Les extraits alcalins issus de sciures de châtaignier et de chêne notamment, sont composés presque exclusivement de xylanes homogènes d'une très grande pureté. En raison de son importance économique en Région Limousin, nous avons sélectionné le bois de châtaignier comme modèle pour notre étude dont l'objectif principal est rappelons-le de développer de nouvelles méthodologies de délignification permettant l'extraction par l'eau des xylanes d'intérêt. La qualité des extraits ainsi que les rendements d'extraction ont été évalués et comparés à ceux obtenus selon des approches plus conventionnelles (délignification par le chlorite de sodium et extraction par la potasse). Les sciures de châtaignier ont subi au préalable une extraction par l'éthanol à chaud puis par de l'oxalate d'ammonium afin d'éliminer successivement les sels minéraux, les petites molécules organiques ainsi que les pectines.^{217, 218} Plusieurs méthodes ont ensuite été prospectées :

- la délignification classique par l'hypochlorite de sodium suivie d'une extraction alcaline en tant que procédé de référence ;
- des prétraitements physiques préalables par les ultrasons ;
- une extraction des xylanes par les micro-ondes ;
- la délignification enzymatique par les laccases ;
- la délignification chimique en présence de composés tétrapyrroliques (porphyrine, phtalocyanine) ;
- la délignification photochimique

Chapitre I. Délignification en milieu oxydant – Extraction des hémicelluloses par des méthodes classiques et non conventionnelles

Classiquement, la délignification utilise une solution tamponnée de chlorite de sodium dans l'acide acétique à 75°C pendant 3 heures.⁵⁵ Le renouvellement de l'opération permet de diminuer de façon conséquente le taux de lignine. Comme nous l'avons indiqué précédemment dans la partie bibliographique, cette méthode de délignification permet d'oxyder les cycles phénoliques par le chlore et l'acide hypochloreux, libérés *in situ* dans le milieu réactionnel, qui sont des espèces moléculaires beaucoup plus réactives que le chlorite lui-même. Cette étape de délignification est précédée par une élimination des sucres circulants et tannins à l'éthanol à chaud et d'une dépectinisation par de l'oxalate d'ammonium.

I.1. Délignification standard par le chlorite de sodium

Le protocole de Adams⁵⁵ (Figure 49) a été adapté pour les sciures de châtaignier.

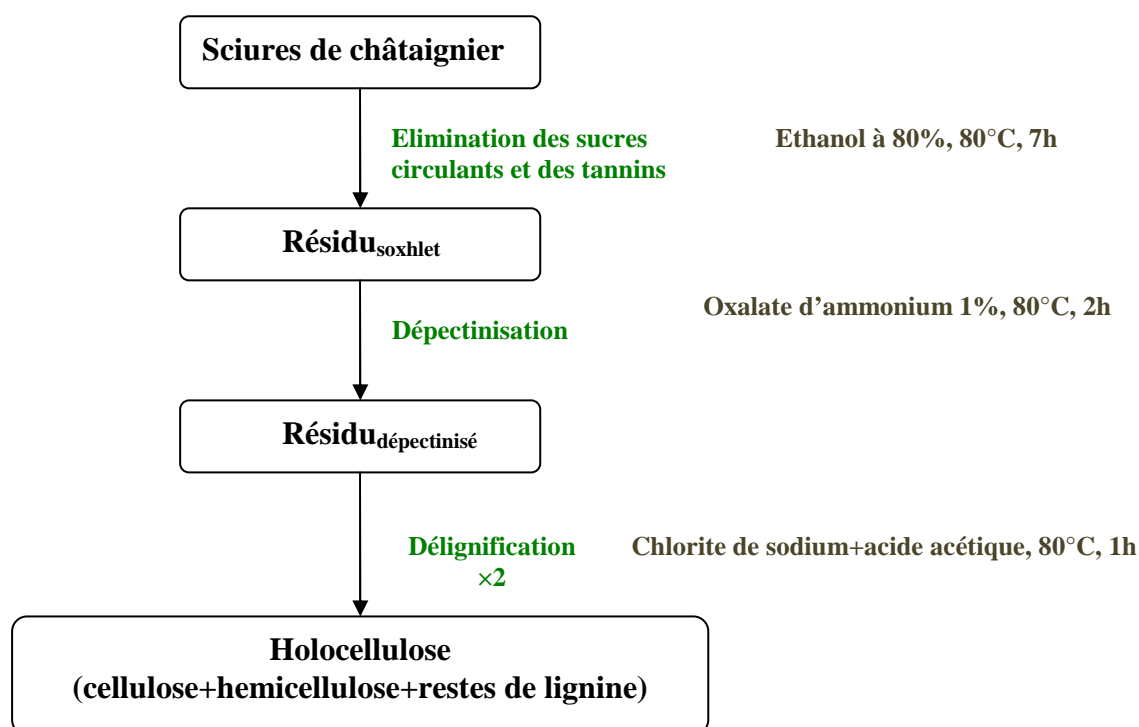


Figure 49: Protocole d'extraction de polysaccharides pariétaux adapté de Bailey²¹⁷ et Carpita²¹⁸

La délignification est réalisée dans une solution de chlorite de sodium à 0,6 g par gramme de matière sèche initiale tamponnée par de l'acide acétique glacial à hauteur de 0,2 mL par gramme de matière sèche. La solution est portée à 80°C pendant 1 h et l'opération de

délicnification est réitérée une seconde fois. Le résidu final obtenu composé essentiellement de cellulose et d'hémicelluloses est appelé holocellulose.

I.2. Extraction alcaline des xylanes

I.2.1. Conditions opératoires

Comme nous l'avons mentionné dans la première partie, les hémicelluloses en général et les xylanes en particulier, sont extraits facilement, à partir d'holocellulose, par des alcalis. En effet ceux-ci sont capables de rompre des liaisons hydrogène, les liaisons covalentes du type ester par saponification ainsi que les interactions ioniques également présentes au sein de la paroi végétale. Les protocoles classiques d'extraction présentés dans la littérature sont dits séquentiels car ils ont recours à l'utilisation de bases de concentrations variées (KOH 0,43 M, KOH 4,3 M, NaOH 4,3 M) pour permettre d'obtenir des fractions plus homogènes. Les bases KOH et NaOH sont additionnées d'un agent réducteur le NaBH_4 à 3 mg.mL^{-1} et sont employées sous atmosphère d'azote afin de prévenir tout risque de dégradation (notamment dépolymérisation ou peeling).

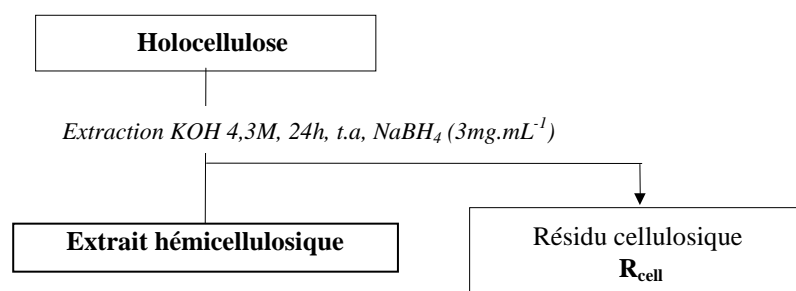


Figure 50 : Extraction alcaline de xylanes

Les conditions opératoires optimales ont été définies au laboratoire par Moine² et reposent sur l'extraction alcaline par de la potasse 4,3M sans imprégnation préalable (c'est-à-dire sans extraction par KOH 0,43 M) pendant 24 h à température ambiante (Figure 50).

I.2.2. Etude qualitative et quantitative du résidu et de la fraction extraite

Le Tableau 4 présente la composition de l'holocellulose, du résidu d'extraction et du filtrat. Avec des teneurs en xylose de plus de 70% et d'acide 4-O-méthylglucuronique de près de 10%, cette analyse confirme que l'holocellulose de châtaignier est naturellement très riche en xylanes. Avec près de 90% de xylane (Xylose + 4-O-MeGlcA), l'extrait hémicellulosique apparaît comme très homogène et représentatif des MGX du bois de châtaignier. Cette

dernière remarque souligne la bonne sélectivité de l'extraction alcaline qui est par ailleurs confirmée par la teneur très faible en xylose dans le résidu R_{cell} (8% molaire). Dans ce cas, les MGX sont extraits de façon quantitative puisque seule une infime partie subsiste dans le résidu final.

Tableau 4 : Compositions monosaccharidiques des résidus et du filtrat après extraction alcaline

	Composition molaire (%) monosaccharidique										
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-O-Me GlcA	Xylane
Holocellulose	2,0	0,1	1,5	72,4	2,8	2,8	4,6	4,2	0,6	9,0	81,3
R _{cell} ^(a)	0,7	0,1	0,4	8,0	10,1	72,8	2,3	3,0	0,3	2,2	10,2
Extrait hémicellulosique	1,2	0,7	0,5	76,8	1,3	0,8	2,5	3,1	0,5	12,6	89,4

(a) Résidu cellulosique

Le rendement d'extraction en hémicelluloses ainsi que le degré de polymérisation (DP) des molécules sont déterminés par dosage colorimétriques spécifiques des oses neutres de Dubois,¹²⁰ des acides uroniques de Blumenkrantz¹²¹ et des oses réducteurs de Lever.¹²⁴ Avec un rendement massique d'extraction de 19% et un degré de polymérisation (DP) moyen de 200, cet extrait présente toutes les caractéristiques attendues pour un 4-*O*-méthylglucuronoxylane (MGX) de bois.⁷ Ce résultat est conforme avec les données de la littérature, il confirme également la bonne sélectivité de cette extraction alcaline que nous nous proposons d'utiliser comme référence. Cependant ce protocole qui impose l'utilisation de fortes concentrations en alcalis ne préserve pas l'acétylation des molécules. C'est pourquoi nous avons souhaité développer et mettre en œuvre de nouvelles méthodologies préparatives reposant sur de prétraitement physique, biologique ou chimique des sciures de châtaignier.

I.3. Prétraitements par les ultrasons

Nous nous intéressons ici à des méthodes non conventionnelles d'extraction des xylanes par les ultrasons.

Rappelons que le prétraitement par ultrasons a pour but de perturber la structure de la paroi cellulaire (paragraphe I.2.3.c) afin de favoriser l'imprégnation par le solvant et ainsi augmenter l'extractabilité des polysaccharides qui la composent. Le DMSO, en raison d'une part, de sa capacité à extraire sélectivement les xylanes⁹² et, d'autre part, à en préserver l'acétylation est utilisé comme solvant de référence.

L'énergie ultrasonique haute fréquence à 20 kHz est obtenue à partir de l'énergie électrique par un convertisseur. Les vibrations mécaniques sont amplifiées par la sonde et provoquent à une extrémité la formation de microbulles de vide qui libèrent une énergie considérable lorsqu'elles explosent.

I.3.1. Conditions opératoires

Des essais préliminaires ont été réalisés dans le DMSO sur l'holocellulose en faisant varier les conditions opératoires du traitement ultrasons tant en puissance qu'en durée.

Tableau 5 : Essais préliminaires des prétraitements ultrasons

Essais	1	2	3	4	5	6	7	8
Temps	2,5 min	2,5 min	5 min	5min	10min	10 min	20 min	20 min
Puissance	50 W	150 W	100 W	200 W	50 W	200 W	100 W	150 W

Ainsi 4 modalités de durée (2,5, 5, 10 et 20 minutes) et 4 modalités de puissance (50, 100, 150 et 200 Watts) ont été testés (Tableau 5).

I.3.2. Analyses qualitative et quantitative des extraits

I.3.2.a. Analyse quantitative des extraits

Les fractions recueillies présentent des compositions centésimales homogènes avec en moyenne 13% molaire en acides uroniques (Tableau 6). Les rendements d'extraction compris entre 1 et 3% ainsi que les DP sont cependant très faibles suggérant que dans notre cas, les ultrasons employés seuls ne sont pas à même de permettre l'extraction des xylanes dans le DMSO. Les conditions opératoires de référence retenues pour la suite sont 20 minutes pour 150 Watts de puissance de sonication puisqu'elles conduisent au meilleur rendement d'extraction (3%).

Tableau 6 : Résultats des essais de traitements par sonication dans le DMSO

Essai ^(a)	Acides uroniques (% molaire)	DP	Rendement massique (%)
1	13,2	21	1,0
2	12,3	30	1,0
3	12,9	18	1,6
4	12,9	14	1,1
5	13,3	33	1,4
6	10,8	39	1,3
7	17,8	28	2,4
8	13,0	32	3,0

(a) voir Tableau 5

Les données de la littérature indiquent que l'efficacité de l'extraction est dépendante des agents et des conditions d'extraction.¹¹⁶ Les alcalis comme la soude et la potasse sont dans la plupart des cas utilisés pour l'extraction d'hémicelluloses. Ils permettent à de faibles concentrations (1-5%) d'abaisser le temps d'extraction (de 60 à 5 minutes),¹¹⁶ la température et parfois d'obtenir de meilleurs rendements²¹⁹ qu'avec la méthode classique mais ne conservent pas l'acétylation native des molécules extraites comme c'est le cas avec le DMSO. De plus, des conditions trop drastiques conduisent à la dépolymérisation des polysaccharides.²²⁰

1.3.2.b. Composition saccharidique molaire des extraits

L'analyse par CPG des extraits est réalisée après hydrolyse et dérivation par silylation (Tableau 7). Nous nous sommes particulièrement intéressés aux pourcentages molaires en xylose et en acide 4-*O*-méthylglucuronique, marqueurs des xylanes. Les résultats indiquent que le DMSO est un solvant adapté à l'extraction des xylanes puisque le xylose et l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, représentent un peu plus de 80% de la composition molaire. La présence d'autres oses (rhamnose, fucose...) peut être considérée comme contaminante.

Tableau 7 : Compositions monosaccharidiques molaires des extraits après prétraitements aux ultrasons

Essai ^(a)	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-<i>O</i>-Me GlcA
1	1,6	0,2	2,3	79,5	2,8	3,2	3,5	3,2	0,4	3,3
2	1,5	0,2	2,2	81,7	3,4	3,2	2,9	2,1	0,5	2,2
3	1,6	0,3	2,3	75,9	5,0	4,6	3,9	3,0	0,3	3,1
4	1,6	0,2	2,1	82,5	2,4	3,0	3,0	2,2	0,7	2,3
5	1,5	0,3	2,0	79,7	5,7	3,1	2,6	3,8	0,1	1,2
6	1,4	0,0	2,1	78,3	5,2	3,7	2,8	2,9	1,3	2,4
7	1,9	0,0	2,4	77,8	3,2	2,2	3,3	5,7	0,3	3,1
8	1,9	0,0	2,5	75,2	4,4	2,6	3,7	6,0	0,2	3,4

(a) voir Tableau 5

Par ailleurs, la modification des paramètres au cours des différents essais n'a pas d'influence significative sur la composition monosaccharidique des extraits recueillis, globalement homogènes.

I.4. Extraction par micro-ondes

Le rayonnement micro-ondes est une méthode d'activation des réactions chimiques que le faible niveau de consommation d'énergie rend très attractif par rapport au chauffage

classique (paragraphe I.2.3.d). C'est pour cette raison que le rayonnement micro-ondes est souvent cité dans le domaine de la chimie durable.

I.4.1. Conditions opératoires

Dans notre cas, les extractions ont été réalisées dans un micro-ondes (Milestone) avec des consignes de puissance et de temps classiquement utilisées au laboratoire : une puissance de 200W et une durée de 10 minutes. Les extractions ont été réalisées aux températures d'ébullition des solvants (189°C pour le DMSO, 165°C pour le DMA et 100°C pour l'eau).

I.4.2. Etude qualitative et quantitative des résidus et des fractions extraites

I.4.2.a. Etude quantitative des extraits

Les résultats présentés Tableau 8 portent sur la partie quantitative de l'analyse. Ils montrent que les teneurs en acides uroniques sont nettement plus élevées dans les extraits eau (30,5%) et DMA (29,1%) que dans les extraits DMSO (20% maximum). L'analyse de ces résultats montre que contrairement au DMA et à l'eau, le DMSO est plus spécifique des xylanes.

Tableau 8 : Suivi quantitatif des teneurs en acides uroniques et des rendements massiques d'extraction

Conditions d'extraction	Acides uroniques (% molaire)	DP	Rendement massique (%)
H ₂ O (pH 5.5) 100°C	30,5	14	0,9
DMA 165°C	29,1	9	1,3
DMSO 189°C	10,6	20	9,2
DMSO 145°C	12,7	24	3,4
DMSO 110°C	20,4	21	1,8
DMSO 80°C	19,9	15	1,1

Tandis que des rendements modestes sont observés lors de l'utilisation du DMA (0,9%) et de l'eau (1,3%) comme solvants, dans le cas du DMSO, l'élévation du rendement va de pair avec celle de la température, atteignant près de 10% à 189°C. Les fractions extraites sont homogènes en taille mais très nettement inférieures à celles observées lors de l'extraction alcaline (DP de l'ordre de 200).

1.4.2.b. Etude de la composition saccharidique des extraits

Les compositions monosaccharidiques (Tableau 9) indiquent que les extraits sont riches en xylanes avec des teneurs d'au minimum 60%, mais la sélectivité du DMSO est néanmoins supérieure par rapport aux deux autres solvants que sont l'eau (57%) et le DMA (66%). On remarque également que l'élévation de la température d'extraction pour le DMSO conduit à une légère baisse de la teneur en xylanes qui passe de 71% à 189°C à 77% à 80°C.

Tableau 9 : Compositions monosaccharidiques molaires des extraits après traitement micro-ondes

Conditions opératoires	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalAU	GlcA	4-O-Me GlcA
H ₂ O 100°C	2,7	0,6	4,0	53,6	11,1	5,3	9,0	9,4	0,9	3,4
DMA 165°C	3,7	0,6	5,5	61,5	1,9	2,3	7,9	11,2	0,4	4,9
DMSO 189°C	2,1	0,2	2,1	68,6	5,7	8,8	7,4	1,3	0,4	3,4
DMSO 145°C	2,3	0,2	2,6	69,8	4,8	3,7	7,0	4,0	0,5	5,1
DMSO 110°C	1,4	0,6	1,7	73,1	7,6	5,0	4,0	2,4	0,4	3,9
DMSO 80°C	1,3	0,2	1,5	77,0	6,8	5,6	3,5	1,3	0,4	2,4

Si l'on compare cette méthode d'extraction par les micro-ondes à celle par les ultrasons précédemment utilisée, les rendements obtenus en hémicelluloses sont très nettement supérieurs avec les micro-ondes (9,2% contre 3% au maximum pour les ultrasons).

I.5. Extraction par les micro-ondes avec prétraitement aux ultrasons

En couplant les deux méthodes précédemment présentées, nous espérons ainsi augmenter le rendement d'extraction en xylanes.

I.5.1. Etude qualitative et quantitative des résidus et des fractions extraits

1.5.1.a. Etude quantitative des extraits

La mise en œuvre de cette approche d'extraction par les micro-ondes précédée d'un traitement aux ultrasons conduit, lorsque le DMSO est utilisé comme solvant, à un rendement massique d'extraction de près de 8%, légèrement inférieur à celui obtenu sans prétraitement ultrasons (9,2%). Le remplacement du DMSO par le DMA ou l'eau induit une baisse significative des rendements qui tombent respectivement à 1,3% et 0,9% soulignant un effet de solvant. Enfin, il est possible de constater un effet de température qui lorsqu'elle est

abaissée de 145 à 80°C induit une diminution des rendements d'extraction qui passent de 3,8 à 1,2% (Tableau 10).

Tableau 10 : Suivi quantitatif des teneurs en acides uroniques et des rendements massiques d'extraction

Conditions d'extraction	Acides uroniques (% molaire)	DP	Rendement massique (%)
H ₂ O (pH 5,5) 100°C	22,3	30	0,9
DMA 165°C	28,7	9	1,3
DMSO 189°C	11,6	28	7,8
DMSO 145°C	13,3	30	3,8
DMSO 110°C	12,4	46	2,4
DMSO 80°C	17,3	31	1,2

Excepté pour l'extrait DMA qui possède une plus faible valeur de DP, la taille des molécules recueillies est homogène avec une valeur moyenne de 30. Il s'agit donc de petits polymères qui ont été extraits

1.5.1.b. Etude de la composition saccharidique des extraits

Comme le montre le Tableau 11, quel que soit le solvant d'extraction utilisé, les fractions recueillies présentent des compositions monosaccharidiques caractéristiques des MGX et sont semblables à celles obtenues après extraction par les micro-ondes seuls. En effet, les extraits DMSO ont toujours une composition molaire en xylanes de 80% en moyenne, tandis qu'elle n'est que de 60% pour les extraits H₂O et de 65% pour les extraits DMA. Le traitement au préalable de la solution par les ultrasons n'a donc pas d'influence sur la quantité et la qualité des extraits recueillis.

Tableau 11 : Composition monosaccharidique molaire des extraits après traitements ultrasons et micro-ondes

Conditions opératoires	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-O-Me GlcA
H ₂ O 100°C	3,6	0,9	4,2	56,9	6,7	4,4	9,1	9,1	0,9	4,3
DMA 165°C	4,2	0,3	5,6	59,2	1,5	1,8	9,0	9,5	2,4	6,6
DMSO 189°C	1,8	0,2	2,4	75,4	3,8	2,5	6,7	1,6	0,6	5,1
DMSO 145°C	2,1	0,3	2,6	67,7	6,6	4,1	6,4	4,7	0,6	4,8
DMSO 110°C	1,4	0,6	2,2	74,8	5,7	4,4	4,1	2,7	0,3	3,9
DMSO 80°C	1,5	0,2	2,3	79,9	5,6	4,6	3,5	0,6	1,0	1,0

L'analyse par RMN ¹H, présentant des signaux à 2 ppm⁹⁴ (Figure 51) confirme le maintien de l'acétylation des xylanes extraits selon cette approche. Par ailleurs, l'analyse de ce spectre en comparant l'intégration des bandes correspondant aux protons glucidiques (entre

3 et 5,5 ppm) et l'intégration des protons de l'acétyle (à 2 ppm) nous donne un degré de substitution (DS) en acétyle de l'ordre de 0,35. Ce résultat est conforme avec les DS classiquement présentés (0,4-0,45) dans la littérature pour les xylanes de feuillus.^{44, 94}

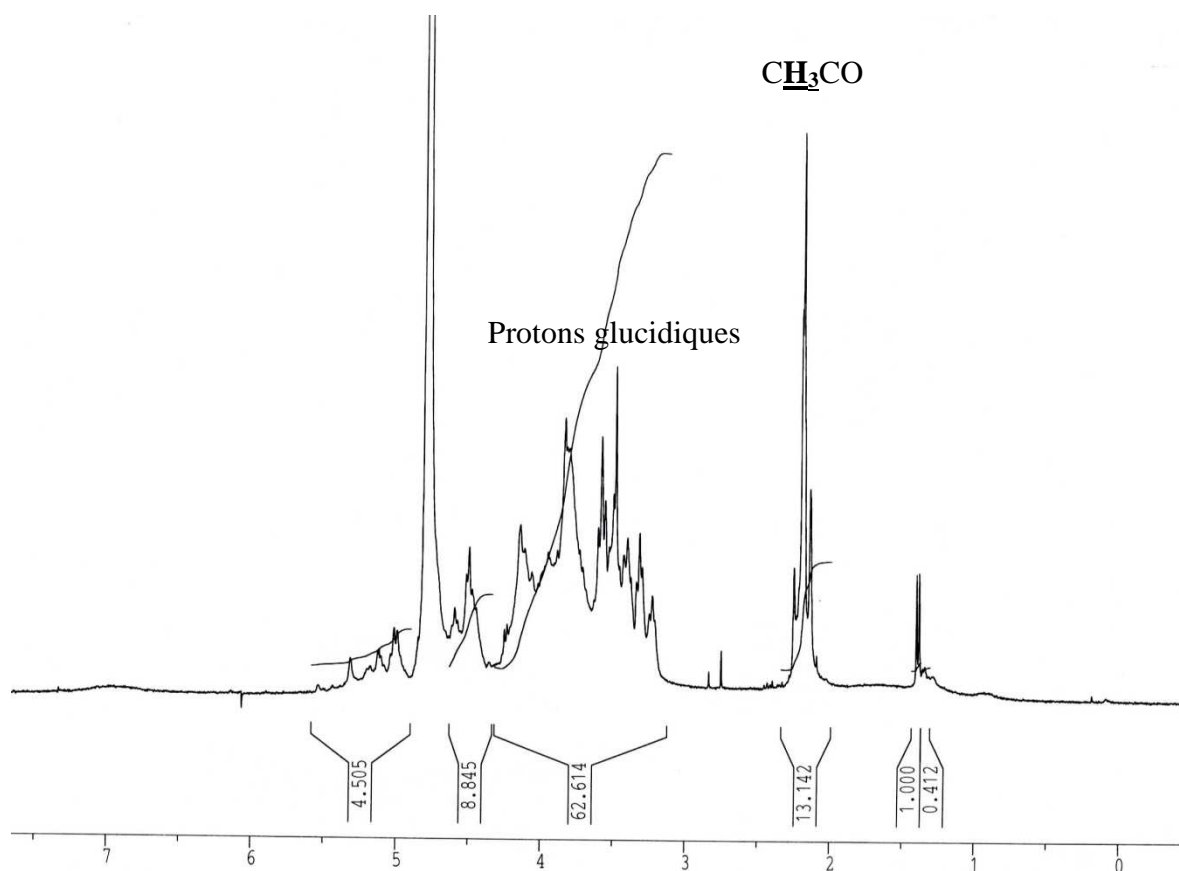


Figure 51 : Spectre RMN ^1H (D_2O) du xylane extrait dans le DMSO aux micro-ondes après prétraitement aux ultrasons.

I.6. Bilan sur l'extraction par les micro-ondes et les ultrasons dans le DMSO

Le DMSO comme solvant d'extraction pour les micro-ondes, en comparaison à l'eau ou au DMA apparaît comme un bon compromis tant sur la quantité que sur la qualité des extraits recueillis. En effet, un rendement de l'ordre de 8-9% et une teneur en xylanes de 80% sont observés. Si l'on compare cette méthode à l'extraction alcaline, les rendements sont modestes mais la composition monosaccharidique des extraits est semblable, avec en plus la conservation de l'acétylation. Malheureusement une baisse des DP est constatée, qui passent de 200 (paragraphe I.2.2) pour l'extraction alcaline à 28 dans le cas de l'utilisation du DMSO à 189°C au micro-ondes (Tableau 11). La mise en œuvre préalable d'un traitement physique par les ultrasons avant l'extraction aux micro-ondes ne semble guère améliorer l'extractabilité

des MGX tant d'un point quantitatif que du point de vue de la composition glucidique molaire. Dans ce cas, la teneur en AU (environ 11% pour le DMSO à 189°C) et la valeur du rendement massique (de l'ordre de 9% à 189°C) restent similaires ou inférieures aux valeurs recueillies par extraction aux micro-ondes sans prétraitement ultrasons. Ce constat est également vrai pour les autres solvants employés (eau et DMA). L'utilisation seule des ultrasons est le système le moins intéressant pour l'extraction des xylanes, ne conduisant qu'à des rendements d'au maximum 3%.

Les résultats pour l'extraction micro-ondes sont encourageants mais il semble que l'obtention des xylanes dans ces conditions soit limitée par la présence de lignines persistantes y compris à partir du résidu holocellulosique ayant subi une délignification. Nous avons donc choisi d'orienter nos méthodologies vers des stratégies de délignification des sciures selon une approche biochimique reposant sur une délignification enzymatique par le système laccase/HOBt/H₂O₂.

Chapitre II. Délignification enzymatique par le système laccase/HOBt/H₂O₂

Comme nous l'avons mentionné dans la première partie, de nombreuses études ont montré que les laccases et les *peroxydases* sécrétées par des champignons étaient capables de dégrader la lignine dans le bois. C'est à partir des années 80 que des progrès significatifs ont été réalisés sur la compréhension des mécanismes moléculaires de cette biodégradation des lignines.²²¹ Plus récemment, elles ont connu un regain d'intérêt car elles constituent une alternative écologique aux produits chlorés habituellement utilisés dans l'industrie papetière. Cependant, à notre connaissance, peu d'études sur la délignification enzymatique de sciures sont reportées. Pour cela, nous nous proposons, en nous appuyant sur la littérature se rapportant aux pâtes à papier de délignifier par voie enzymatique des sciures de châtaignier selon le schéma proposé Figure 53. Les deux premières étapes (élimination des oses circulants et dépectinisation) sont identiques à celles décrites au chapitre I. La réaction de délignification se fait selon le principe présenté Figure 52 dans un milieu tamponné d'acétate de sodium 50 mM et sous atmosphère oxygénée en présence de la laccase et du médiateur, le HOBt (hydroxybenzotriazole) à 2% (m/m). Ce dernier joue le rôle de navettes d'électrons, la laccase ne pouvant pénétrer les fibres de bois. La méthodologie des plans d'expériences a été adoptée pour optimiser la délignification. Par la suite, les xylanes ont été extraits à l'eau.

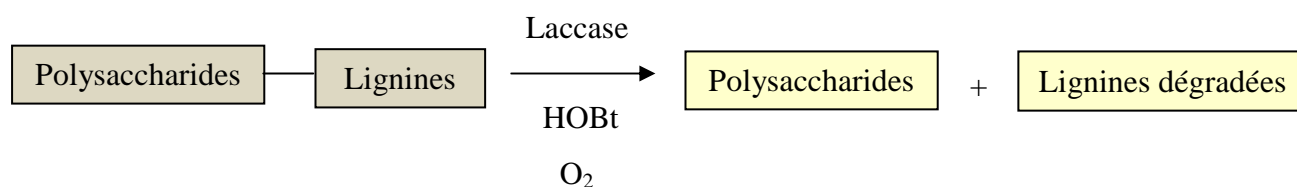


Figure 52 : Principe de la délignification enzymatique

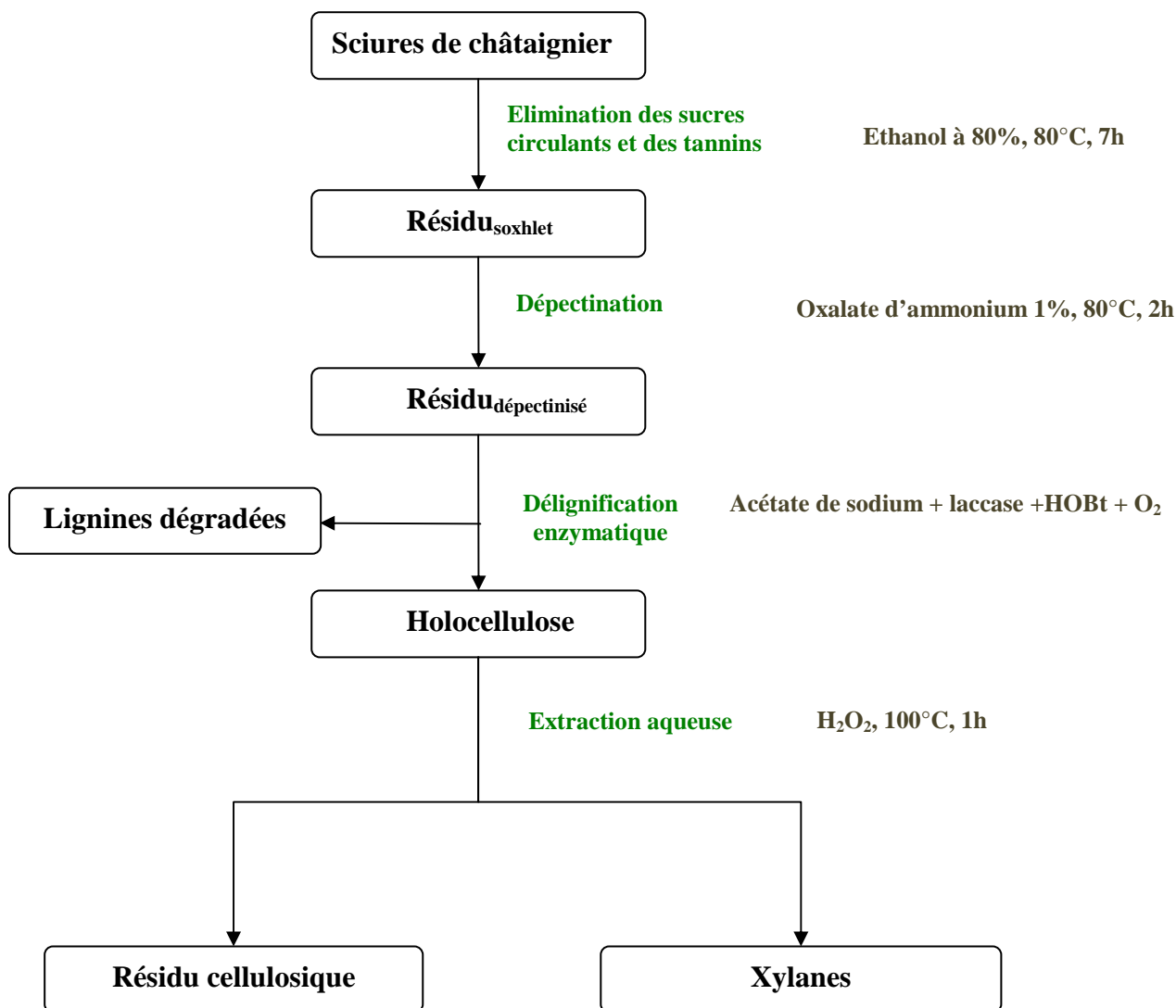


Figure 53 : Protocole d'obtention de xylanes après délignification enzymatique

II.1. Plan d'expériences

II.1.1. Principe du plan en carré gréco-latin

La réalisation d'un plan d'expériences apparaît nécessaire lorsque l'on souhaite réaliser une étude qui met en jeu un grand nombre de facteurs qui ne nous permettent pas d'établir un classement objectif de ces effets. Le plan d'expériences a pour but d'apporter des réponses d'une part sur le rôle des facteurs (température, temps de réaction, nombre d'équivalents de réactif) et d'autre part sur l'optimisation d'un ou plusieurs critères.

L'un de ces plans assez utilisé est le plan d'expériences en carré gréco-latin ayant pour but de chercher à quantifier ou hiérarchiser la contribution de chacun des facteurs de la réaction sur les grandeurs quantité de phénols dosés et rendement massique d'extraction après

extraction aqueuse. On aboutit alors à une grille de dépouillement qui permet de tracer les effets moyens des facteurs sur les différentes grandeurs mesurées.

II.1.2. Mise au point du domaine expérimental

Pour optimiser la réaction de délignification enzymatique, nous avons fait varier la température (entre 25 et 45°C), le temps de réaction (entre 1 h et 4 h) ainsi que la quantité d'enzyme de 5 à 40 U.g⁻¹.

Tableau 12 : Définition des facteurs et des modalités

Facteurs	Modalités		
	1	2	3
Température	25°C	35°C	45°C
Temps	60 min	150 min	240 min
Qté en enzyme	5 U.g ⁻¹	20 U.g ⁻¹	40 U.g ⁻¹

Nous avons ainsi défini 3 facteurs ayant chacun 3 modalités (Tableau 12). Le domaine expérimental est défini par l'ensemble des combinaisons réalisables soit 27 (3³) combinaisons.

II.1.3. Construction du plan d'expériences

Le nombre total de combinaisons étant trop important, 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 13). L'application d'un plan en carré-latin pour cette étude nécessite donc la réalisation de 9 expériences.

Tableau 13 : Plan d'expériences utilisé pour la délignification enzymatique des sciures de châtaignier

Essai	Température	Temps	Quantité de laccase (U.g ⁻¹ de sciures)
1	25°C	60 min	5
2		150 min	20
3		240 min	40
4	35°C	60 min	20
5		150 min	40
6		240 min	5
7	45°C	60 min	40
8		150 min	5
9		240 min	20

Cet arrangement particulier est appelé arrangement orthogonal. Il consiste à faire intervenir chacun des facteurs un même nombre de fois suivant l'ensemble de ses modalités. Aucune modalité particulière n'est privilégiée : les effets moyens des facteurs sont donc estimés avec la même incertitude, et cette incertitude est minimale. Il est alors possible de matérialiser ces différentes combinaisons sur une représentation graphique simple du domaine expérimental, comme le montre la Figure 54.

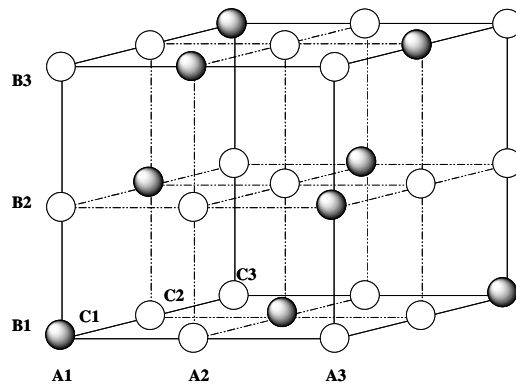


Figure 54 : Disposition des essais (symbolisés sur la figure par ces points ●) définis à partir d'un carré latin dans le domaine expérimental. Les points ○ désignent les essais qui n'ont pas été réalisés.

On construit alors un cube dont chacun des axes correspond à un des trois facteurs. Il est donc possible d'obtenir une représentation des 27 combinaisons réalisables à partir de trois facteurs à 3 modalités, dans laquelle les combinaisons repérées en noir représentent les essais définis par le plan d'expériences. Comme on peut le constater, ces essais sont répartis

uniformément dans le domaine expérimental contrairement à la méthodologie classique consistant à faire varier une à une les modalités des facteurs (Figure 55).

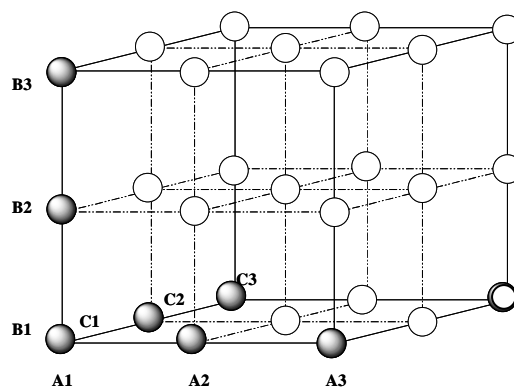


Figure 55 : Disposition des essais (symbolisés sur la figure par ces points ●) lorsque l'on ne fait varier qu'un seul facteur à la fois. Les points ○ désignent les essais qui n'ont pas été réalisés.

II.2. Analyses des résultats

II.2.1. Tableau de résultats

Les valeurs pour la quantité en phénols et le rendement massique après extraction aqueuse sont regroupées dans le Tableau 14. Ce dosage permet de connaître la quantité de phénols -sans distinction- rélarguée en solution pendant la réaction d'oxydation ; c'est donc une estimation directe de la qualité de l'oxydation mise en œuvre. Ce dosage proposé par Pereira²²² repose sur une réaction d'oxydo-réduction du réactif de Folin-Ciocalteu constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Ces derniers qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols donnent un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène possédant une absorption maximale aux environs de 750 nm avec pour référence une gamme étalon d'acide gallique.

Tableau 14 : Résultats d'essais de délignification enzymatique

Essai	Température (°C)	Temps (min)	Quantité en laccase (U/g)	Quantité estimée en phénols (mg)	Rendement massique en xylanes (%)
1	25	60	5	3,3	0,9
2	25	150	20	3,5	1,0
3	25	240	40	3,6	0,7
4	35	60	20	5,3	0,8
5	35	150	40	4,7	0,8
6	35	240	5	6,6	0,5
7	45	60	40	4,5	0,8
8	45	150	5	6,3	0,7
9	45	240	20	3,1	0,6

Globalement la quantité en phénols (en moyenne de 4,5 mg) ainsi que le rendement d'extraction en xylanes (0,8%) n'évoluent pas de façon significative. L'analyse des grilles de dépouillement permettant le tracé des effets moyens devrait nous en dire plus sur les résultats obtenus.

II.2.2. Construction d'une grille de dépouillement

Les résultats sont ensuite analysés à l'aide d'une grille de dépouillement qui permet une analyse rapide des résultats et qui est adaptée aux arrangements orthogonaux comme c'est le cas dans notre étude. Nous détaillerons ici seulement l'exemple de la grille de dépouillement associée aux phénols dosés après délignification enzymatique (Tableau 15). L'autre grille de dépouillement concernant le rendement massique d'extraction des xylanes est obtenue de la même façon.

Tableau 15 : Grille de dépouillement pour les phénols dosés

Essai	Qté dosée (mg)	Température (°C)			Temps (min)			Qté laccase (U/g de sciures)		
		25	35	45	60	150	240	5	20	40
1	3,32	3,32			3,32			3,32		
2	3,55	3,55				3,55			3,55	
3	3,63	3,63					3,63			3,63
4	5,33		5,33		5,33				5,33	
5	4,71		4,71			4,71				4,71
6	6,63		6,63				6,63	6,30		
7	4,51			4,51	4,51					4,51
8	6,30			6,30		6,30		6,30		
9	3,09			3,09			3,09		3,09	
Total	41,07	10,50	16,67	13,90	13,16	14,56	13,35	15,92	11,97	12,85
Nombre	9	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Moyenne	4,56	3,50	5,56	4,63	4,39	4,85	4,45	5,31	3,99	4,28

L'analyse des données pour toutes les autres réponses observées permet de dégager les facteurs les plus influents et 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 56 et Figure 57).

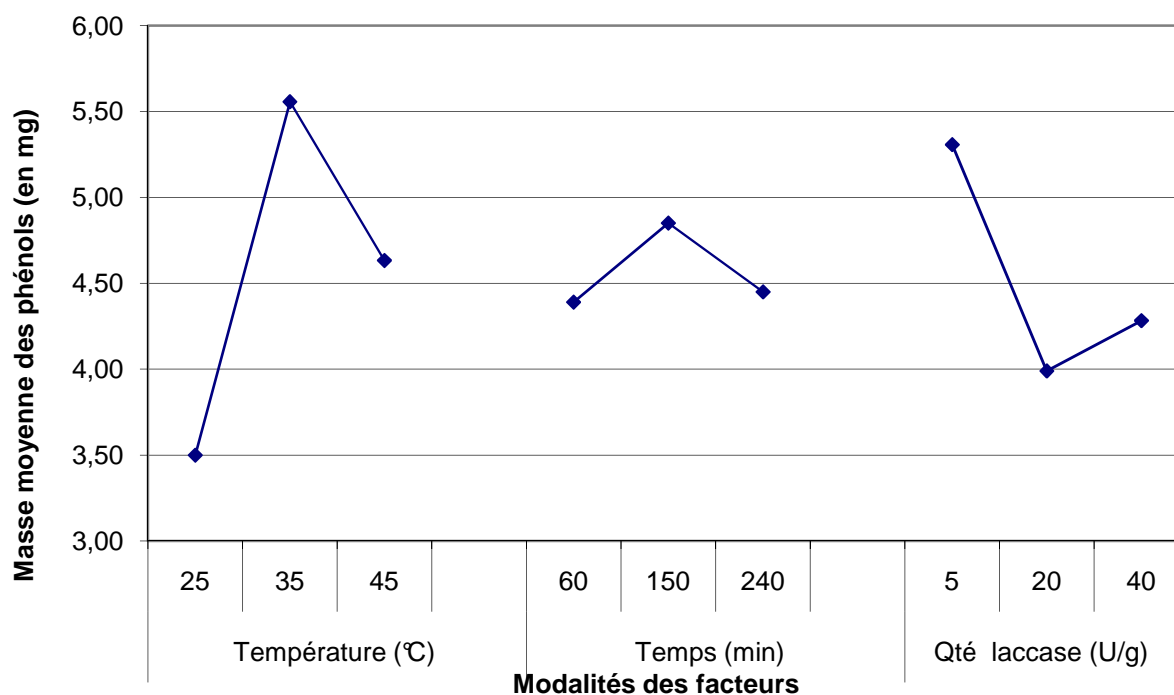


Figure 56 : Tracé des effets moyens sur la quantité en phénols

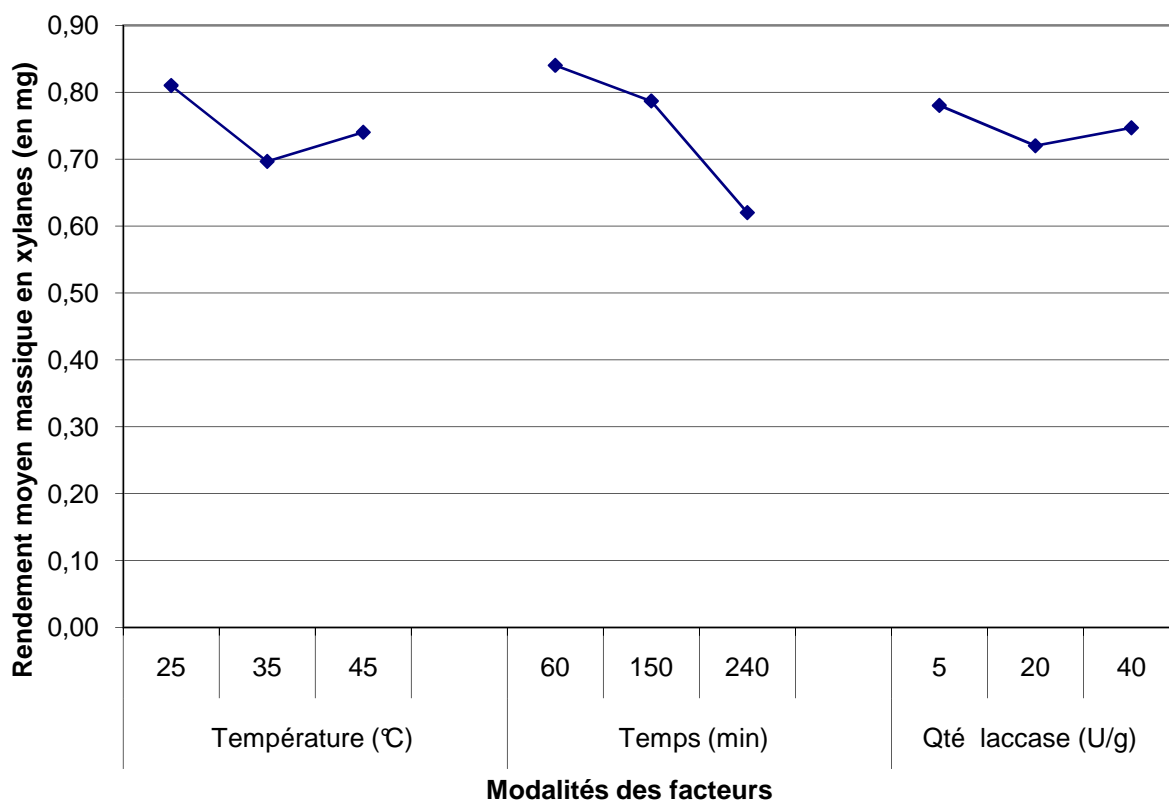


Figure 57 : Tracé des effets moyens des facteurs pour le rendement massique en xylenes

Une analyse rapide des graphiques montre que les trois facteurs qui gouvernent la réaction ont, dans le domaine choisi, une influence significative sur les réponses surtout sur la masse moyenne des phénols dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu.

II.2.3. Influence de la durée du procédé

Même si à ces faibles rendements d'extraction en xylenes (inférieurs à 1%) et degrés de dégradation de la lignine, les résultats sont relativement peu significatifs, il semble apparaître qu'un contact prolongé (240 minutes) diminue ces rendements (0.6% pour le rendement d'extraction). Ce phénomène est probablement lié soit à une inactivation de l'enzyme, soit à une réaction concomitante apparaissant dans ce processus complexe.

II.2.4. Influence de la température

Au risque d'avancer un lieu commun, rappelons que les enzymes en général, les laccases en particulier sont extrêmement sensibles à la température. Une analyse comparative des résultats de la littérature^{56, 66, 68-70} montre que la laccase, en présence de HOBt comme

médiateur a un fonctionnement optimal entre 25°C et 45°C. Dans notre système, le rendement d'extraction, très modeste, est optimisé (0,8%) à 25°C.

II.2.5. Influence de la quantité en enzyme

La quantité d'enzyme utilisée ne semble pas avoir d'influence significative sur le rendement d'extraction en xylanes, mais modifie fortement la quantité de phénols dosés après délignification. Dans ce dernier cas, quand la quantité d'enzyme passe de 5 U.g⁻¹ à 20 U.g⁻¹, la quantité de phénols extraits elle, décroît de 5,3 à 4 mg.g⁻¹.

II.3. Etude qualitative des résidus et des fractions extraites

II.3.1. Compositions monosaccharidiques des extraits et résidus et degré de polymérisation des xylanes extraits

Les filtrats et les résidus issus de l'extraction aqueuse après délignification enzymatique ont été caractérisés par chromatographie en phase gaz après hydrolyse et dérivation (Tableau 16).

Tableau 16 : Compositions monosaccharidiques molaires des extraits et résidus

	Conditions	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-O-Me GlcA	XYLANE
F	1	4,0	0,4	11,0	34,1	9,3	9,6	17,2	9,8	0,9	3,7	37,8
	2	3,8	0,8	9,5	29,8	10,4	22,0	12,4	5,6	1,0	4,6	34,4
	3	4,5	0,3	11,3	27,8	13,4	16,3	14,7	7,3	1,1	3,2	31,0
	4	4,1	0,5	10,8	33,8	12,1	11,7	14,8	6,8	0,9	4,7	38,5
	5	3,5	1,0	9,4	43,1	8,8	7,7	12,0	6,2	0,9	7,5	50,6
	6	4,2	0,6	12,2	34,7	13,2	10,5	13,4	5,9	0,6	4,8	39,5
	7	4,1	0,6	10,9	33,4	13,6	11,8	12,9	6,6	1,0	5,1	38,5
	8	4,8	0,5	11,7	31,2	11,7	10,8	16,3	7,5	1,0	4,7	35,9
	9	5,0	0,7	13,7	25,0	15,1	11,1	16,3	7,4	0,9	4,9	29,9
R	1	2,2	0,1	1,9	71,3	2,5	2,3	45,0	4,9	0,5	9,3	80,6
	2	2,0	0,1	1,9	70,5	2,4	2,8	4,9	4,5	0,4	10,5	81,0
	3	2,1	0,1	1,8	72,3	2,5	2,1	4,6	4,0	0,5	10,2	82,5
	4	2,4	0,1	2,1	70,5	2,5	2,9	5,8	6,0	0,6	7,1	77,6
	5	2,1	0,1	1,8	68,7	2,7	6,5	4,4	4,7	0,7	8,3	77,0
	6	2,2	0,2	2,1	74,3	2,3	2,1	5,4	4,6	0,5	6,3	80,6
	7	2,3	0,1	2,2	73,8	2,3	2,2	5,8	4,3	0,6	6,4	80,2
	8	2,3	0,1	2,0	71,1	2,5	2,6	5,7	4,4	0,8	8,6	79,7
	9	4,0	0,3	3,8	63,3	4,6	3,7	0,6	7,6	0,4	11,7	75,0

Avec en moyenne 35% molaire en xylanes, la composition des filtrats indiquent une faible sélectivité du protocole d'extraction. Cette dernière remarque est confirmée par la composition molaire des résidus qui contiennent encore des quantités significatives de xylanes (de 75 à 82%). Ceci peut s'expliquer d'une part par le fait que de nombreux xylanes restent retenus par les lignines toujours présentes. La délignification enzymatique ne semble pas être adaptée à des matériaux lignifiés tels que les sciures de bois comme nous l'avait précédemment laissé supposer les faibles rendements d'extraction en xylanes. Par ailleurs, le solvant utilisé, l'eau, est certes non polluant et peu agressif, mais il ne semble pas être le plus approprié pour extraire sélectivement les xylanes contrairement au DMSO ou au KOH qui permettent l'extraction plus spécifique de ces mêmes xylanes à hauteur de plus de 70% molaire.¹⁴⁰ L'extraction par l'eau des xylanes d'intérêt après délignification enzymatique des sciures de bois ne conduit donc pas à leur extraction quantitative et qualitative.

II.3.2. Caractérisation des résidus par spectroscopie infrarouge

L'analyse qualitative de la délignification a été effectuée par spectroscopie infrarouge par comparaison entre le spectre obtenu avec un traitement classique (chlorite de sodium) et notre système (Figure 58).

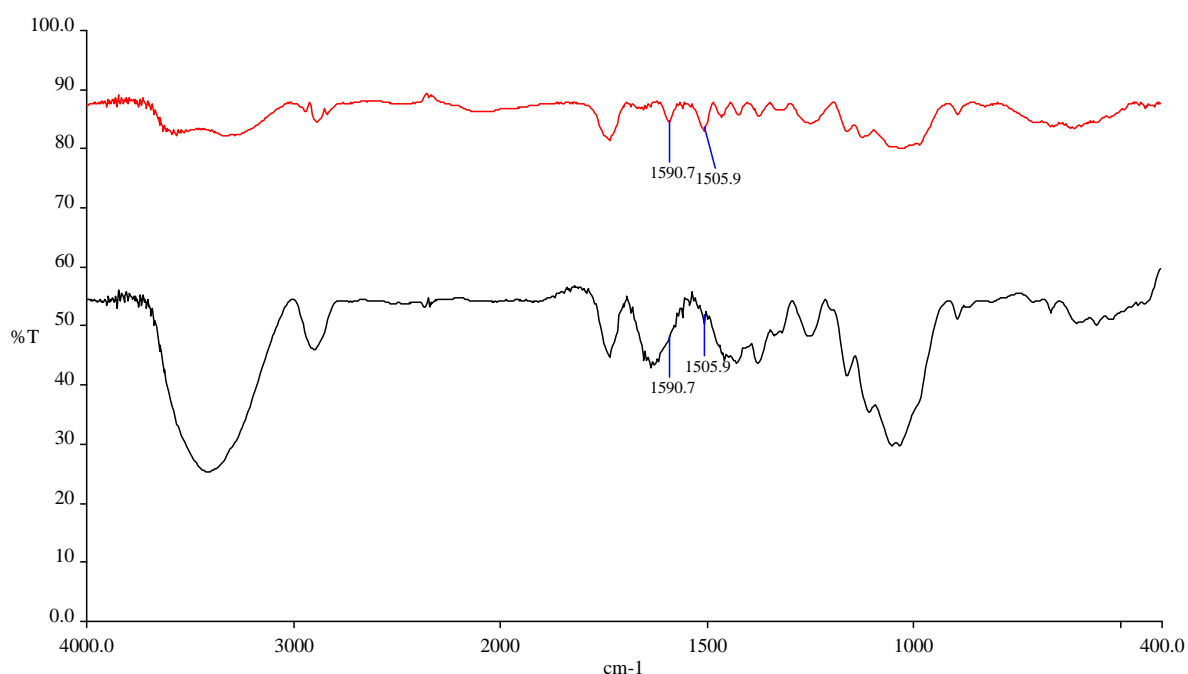


Figure 58 : Spectre IR des résidus après délignification par le système laccase/oxygène/HOBT (en haut) et par le chlorite de sodium (en bas)

La délignification par le chlorite de sodium de sciures de bois conduit à la disparition des bandes aromatiques (1590 cm^{-1} et 1505 cm^{-1}), caractéristiques des cycles phénoliques. Ces dernières sont présentes après traitement avec notre système, confirmant sa faible efficacité.

II.4. Bilan sur la délignification enzymatique

Dans une optique de chimie verte, nous nous étions limités à l'eau comme choix du solvant à utiliser pour obtenir des xylanes. Une telle extraction s'avère d'autant plus difficile que les lignines, de par leur complexité structurale et leur interaction étroite avec les xylanes, en limitent l'extractibilité. Toutefois, même si les rendements sont faibles (au plus 1%), cette méthode d'extraction à l'eau constitue une première approche qui présente l'intérêt de préserver l'intégrité des structures. Cependant elle ne semble pas convenir aux sciures de bois, matrice probablement trop complexe car peu de lignines ont été oxydées (au maximum 7 mg de phénols ont été dosés après délignification). Les lignines persistant encore dans les sciures ont ainsi constitué un frein à l'extraction ultérieure des xylanes, d'où les rendements d'extraction et les degrés de polymérisation faibles.

D'autres essais d'optimisation ont été réalisés. Ils concernaient la granulométrie des sciures et des temps de réaction plus long. Les résultats obtenus, similaires à ceux déjà recueillis, n'ont pas justifié qu'ils soient présentés dans ce paragraphe.

Si l'on s'en réfère à la littérature, de nombreuses études utilisent ces systèmes avec succès mais sur des modèles simplifiés^{67, 223} de la lignine comme le catéchol, ou pour le blanchiment de la pâte à papier, ce qui contribue à expliquer les différences de résultats observées avec nos travaux.

Si la délignification enzymatique des sciures de bois ne permet pas l'extraction sélective et quantitative des MGX, elle nous a permis d'envisager une nouvelle stratégie de délignification chimique du bois à partir de molécules photosensibles telles les sulfophtalocyanines et les porphyrines métallées comme nous allons le voir dans la partie suivante.

Chapitre III. Délignification induite thermiquement par des macromolécules tétrapyrroliques – Analogues de peroxydases

Devant l'échec relatif de la délignification enzymatique, nous nous sommes proposés d'utiliser l'expérience du laboratoire dans le domaine de la chimie des macrocycles tétrapyrroliques. Il est maintenant établi que ces derniers peuvent induire thermiquement ou photochimiquement des réactions d'oxydations. Nous nous sommes alors demandés dans un premier temps si des porphyrines ou des phtalocyanines métallées par le fer ou le manganèse en présence de peroxyde d'hydrogène ne pouvaient pas mener à une telle finalité, ces molécules étant connues comme analogues des peroxydases (voir première partie). Pour cela, deux tétrasulfophtalocyanines et deux tétrasulfoporphyrines métallées ont été synthétisées (Figure 59). Le fer et le manganèse sont les deux métaux choisis car selon la littérature^{62, 72, 76, 78} en présence de peroxyde d'hydrogène, ils sont capables d'oxyder des composés phénoliques comme les lignines et sont utilisés comme composés mimant l'activité oxydative d'enzymes.

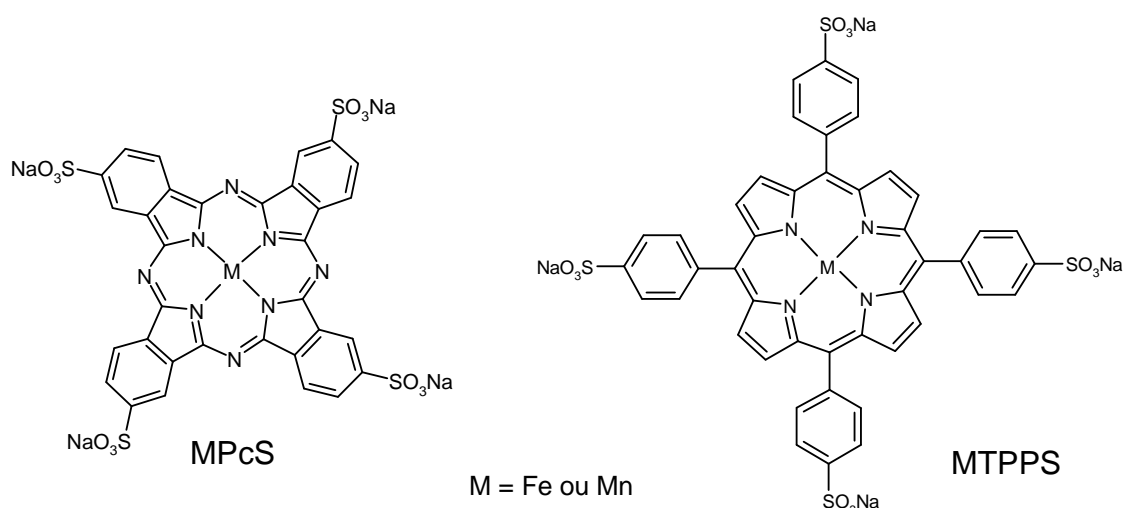


Figure 59 : Catalyseurs utilisés pour l'oxydation

Lors de l'étape de délignification, le système utilisé est une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène dans laquelle est introduit le matériel à délignifier ainsi que les phtalocyanines ou les porphyrines (Figure 60).

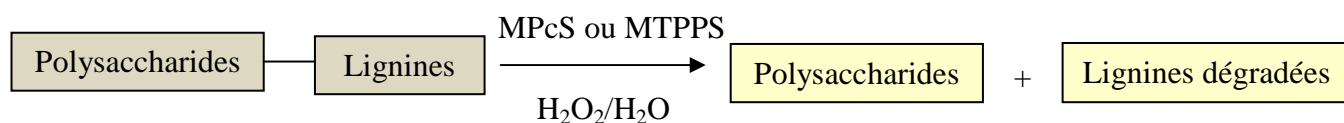


Figure 60 : Principe du système utilisé

III.1. Synthèse des phtalocyanines

Nous avons tout d'abord synthétisé les phtalocyanines sulfonées de fer (FePcS) et de manganèse (MnPcS) (Figure 59). Bien que ces produits soient commerciaux, dans le cadre de notre stratégie de synthèse sans solvant il nous a semblé intéressant d'utiliser cette méthode propre. A cet effet, nous avons utilisé le système mono sel de l'acide sulfophtalique/urée/molybdate d'ammonium/sulfate de fer ou de manganèse pendant deux heures à 200°C (Figure 61).²²⁴ Par rapport aux méthodes classiques en milieu homogène²²⁵, et dans le cas de FePcS, cette stratégie augmente sensiblement le rendement (qui passe de 14 à 76%) tout en diminuant le temps de réaction (2 h au lieu de 6 h).

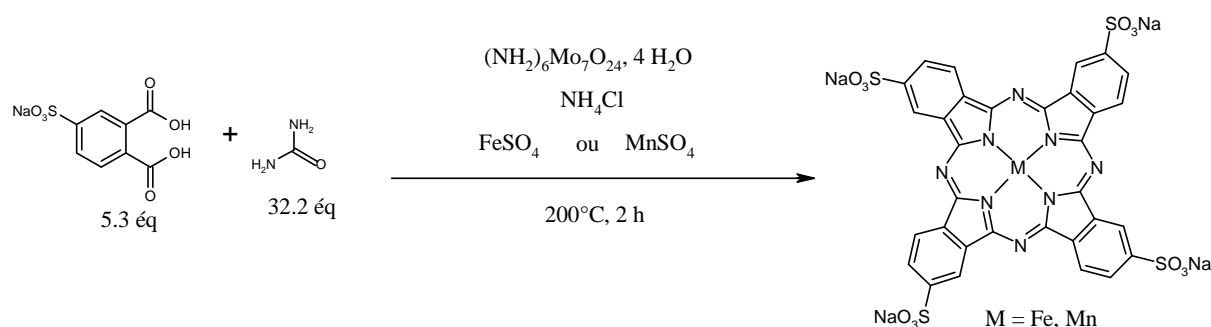


Figure 61 : Synthèse de phtalocyanines sans solvant

Les rendements bruts obtenus sont respectivement de 76% et 15% pour la formation des phtalocyanines de fer et de manganèse. Les spectres UV-Visible de ces deux composés sont conformes à ceux présentés dans la littérature.^{226,227}

III.2. Synthèse des porphyrines

Les tétraphénylporphyrines sulfonées de fer (FeTPPS) et de manganèse (MnTPPS) ont été synthétisées à partir de la tétraphénylporphyrine (H_2TPP) qui a été sulfonée par du H_2SO_4 concentré. L'introduction du métal se fait classiquement à partir d'un sel (Figure 62).

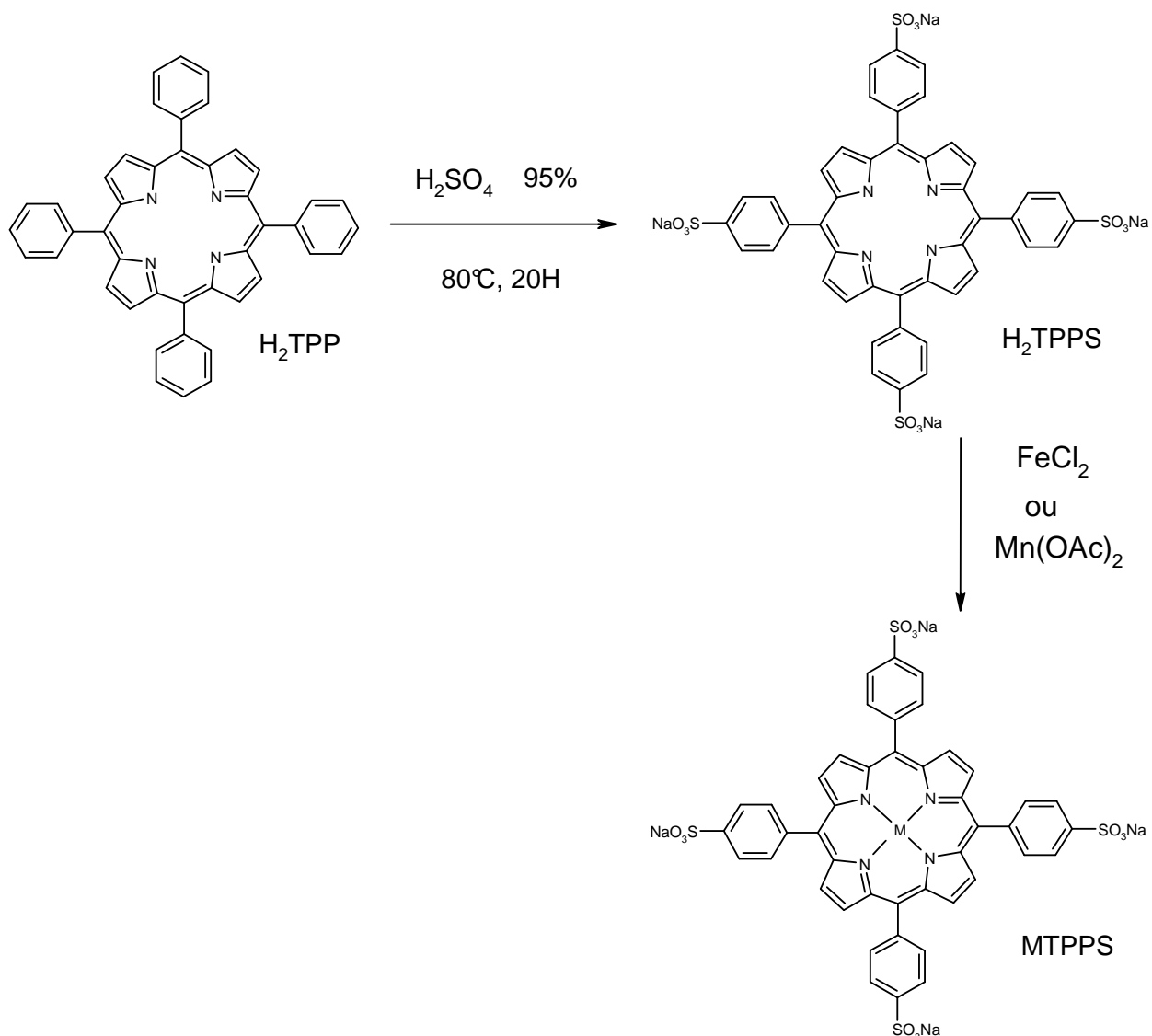


Figure 62: Synthèses des porphyrines

La disparition de deux bandes Q sur le spectre UV-visible de $FeTPPS$ et de $MnTPPS$ par rapport au spectre de la tétraphénylporphyrine sulfonée (H_2TPPS), témoigne de la métallation.

III.3. Protocole de dégradation des lignines et d'extraction des xylanes

Les lignines sont dégradées par oxydation de la matrice végétale (1% m/V) de granulométrie $500\ \mu m$ induite par les porphyrines ou les phtalocyanines (0.056% m/V) comme catalyseur et le H_2O_2 (4%, V/V au début de la réaction) comme oxydant. Le temps de référence pour la réaction de délignification des sciures dépectinées est fixé à 100 h contre 24 h pour l'holocellulose. Ce temps est donc plus long pour les sciures dans la mesure où elles n'ont pas subi de délignification préalable par le chlorite de sodium (comme c'est le cas de

l'holocellulose), elles sont plus riches en lignines. L'ajout du *peroxyde d'hydrogène* est de 1 mL lors de la délignification de l'holocellulose et de 4 mL pour celle des sciures dépectinées. Les MGX sont ensuite isolés par simple extraction à l'eau chaude (Figure 63) à partir du résidu délignifié obtenu précédemment (rapport solide/liquide : 1/50). L'influence de la température, du temps, de la granulométrie de la matière végétale à oxyder ainsi que la nature du métal de la porphyrine ou de la phthalocyanine sont étudiés sur le rendement d'extraction, la composition et la caractérisation des xylanes extraits.

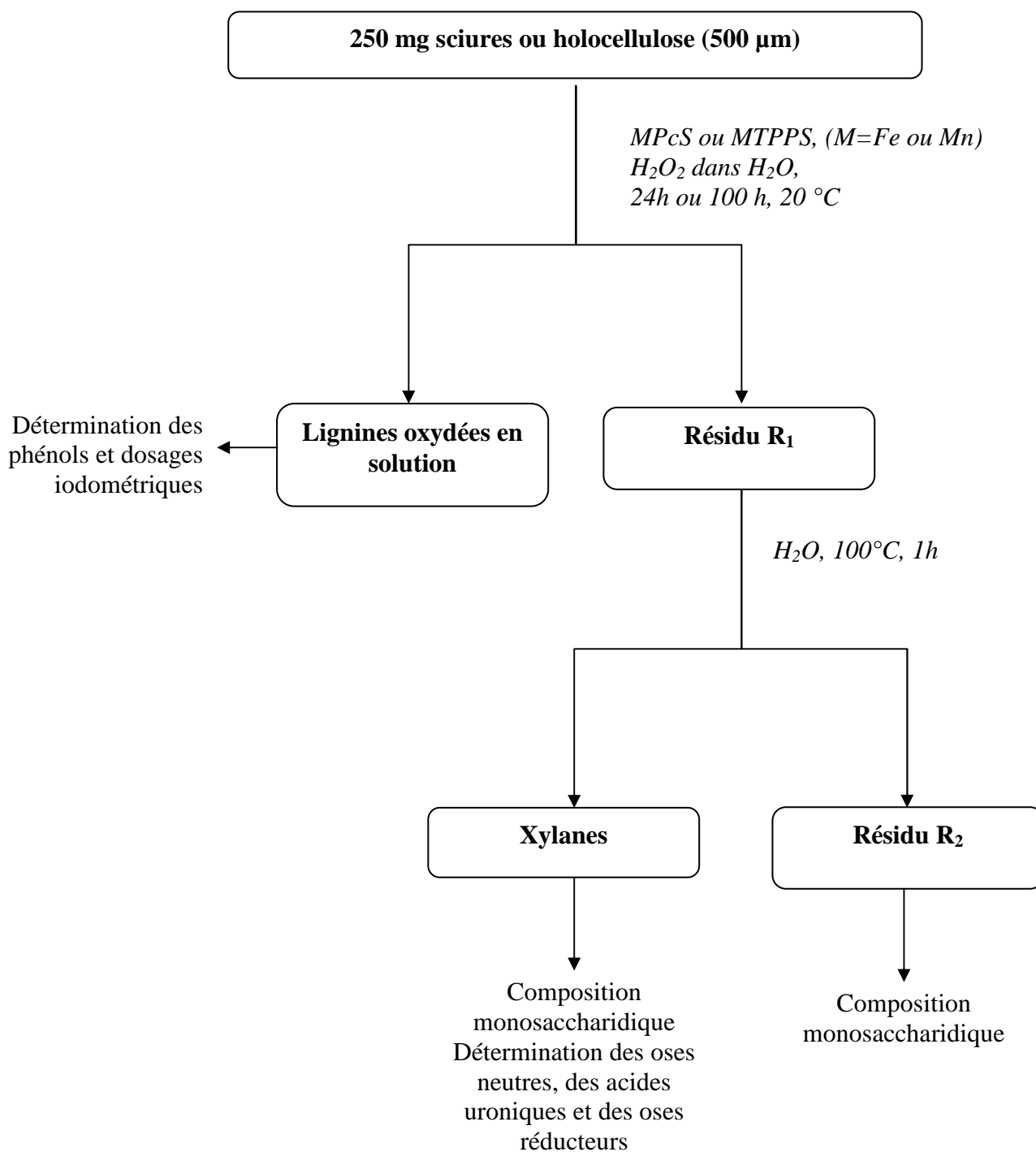


Figure 63 : Protocole d'extraction et de caractérisation des xylanes de châtaignier

Le principe de la délignification pour les phtalocynines ou porphyrines est décrit par la Figure 64.

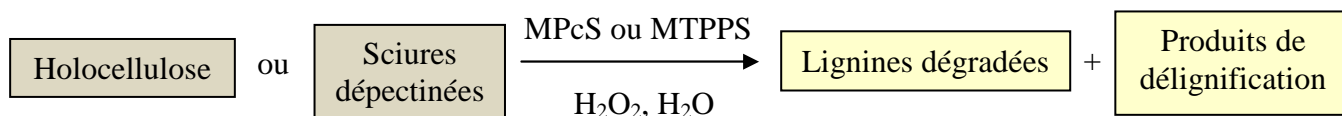


Figure 64: Principe de la délignification par les phtalocyanines et les porphyrines. (M=Fe, Mn)

III.3.1. Etude quantitative de fractions extraites après la délignification

Après l'étape de délignification, nous procédons à la caractérisation de filtrats ainsi obtenus par différents dosages colorimétriques et iodométriques.

III.3.1.a. Dosage des phénols

Les résultats concernant la quantité de phénols dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Pereira²²² sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Quantification des phénols dosés et de peroxyde consommé après l'étape de délignification

Catalyseur	Substrat	Temps	T (°C)	Qté estimée en phénols (mg)	% H ₂ O ₂ consommé
FePcS	Holocellulose	24 h	20°C	1,5	68,9
FePcS	Sciures dépectinées	100 h	20°C	2,0	93,9
MnPcS	Holocellulose	24 h	20°C	1,1	77,3
MnPcS	Sciures dépectinées	100 h	20°C	2,5	59,7
Fe TPPS	Holocellulose	24 h	20°C	2,1	99,9
Fe TPPS	Sciures dépectinées	100 h	20°C	2,2	91,2
MnTPPS	Holocellulose	24 h	20°C	0,2	99,9
MnTPPS	Sciures dépectinées	100 h	20°C	2,9	79,0

Les valeurs obtenues varient de 0,2 à 2,9 mg, on note cependant une valeur plus élevée en phénols pour les filtrats issus de sciures dépectinées comparativement à ceux issus d'holocelluloses. Ceci est logique dans la mesure où les holocelluloses ont déjà subi une première délignification et sont donc moins riches en polyphénols.

III.3.1.b. Quantification du pourcentage de peroxyde d'hydrogène consommé

La quantité résiduelle de H₂O₂ est déterminée par iodométrie (voir partie expérimentale). La réaction de délignification nécessitait la présence de peroxyde

d'hydrogène. Dans la plupart des cas, cette consommation en H₂O₂ est supérieure à 80% ; il est donc légitime de penser que la quantité apportée était adaptée aux conditions expérimentales. Cependant elle est sans doute limitante dans les cas où la consommation de peroxyde était estimée à 99,9%.

III.3.2. Etude quantitative et qualitative des résidus et extraits glucidiques

III.3.2.a. Compositions centésimales

Ces compositions sont déterminées après dosages colorimétriques spécifiques des oses neutres¹²⁰, des acides uroniques¹²¹ et des oses réducteurs¹²⁴ (voir partie expérimentale) et sont présentées sur le Tableau 18. Les rendements massiques d'extraction sont très disparates d'un catalyseur à l'autre et varient entre 1,9 et 12,1%. Ils sont globalement plus élevés lorsque les xylanes sont extraits à partir de résidus holocellulosiques et lorsque le catalyseur contient du fer. Notons que pour la FeTPPS, les rendements sont identiques indépendamment du substrat. Si ces valeurs sont très encourageantes au vu de celles obtenues précédemment avec la méthode de délignification enzymatique, elles restent cependant en deçà des 19% obtenus lors de l'extraction alcaline. Les teneurs en acides uroniques sont majoritairement regroupées dans une fourchette de 15 à 17%, ce qui est conforme à l'idée que l'on se fait de l'acidité de la fraction hémicellulosique de bois de feuillus mais également similaire à notre extrait alcalin de référence. Les valeurs plus élevées indiquent peut être la co-extraction de protopectines, hypothèse qui pourra être confirmée par l'analyse monosaccharidique des ces extraits.

Tableau 18 : Compositions centésimales des filtrats après extraction aqueuse

Catalyseur ^(a)	Substrat ^(a)	AU (en %)	DP	Rendement massique d'extraction en xylanes (en %)
FePcS	Holocellulose	16,6	6	10,5
FePcS	Sciures dépectinées	16,3	3	3,9
MnPcS	Holocellulose	16,6	8	4,6
MnPcS	Sciures dépectinées	42,4	3	2,6
Fe TPPS	Holocellulose	14,9	5	12,0
Fe TPPS	Sciures dépectinées	17,4	3	12,1
MnTPPS	Holocellulose	22,1	18	5,1
MnTPPS	Sciures dépectinées	19,9	5	1,9

(a) Conditions expérimentales : 250 mg de substrat, 14 mg de catalyseur dans 25 mL d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène.

Les degrés de polymérisation (DP) sont en revanche très faibles (moins de 20 unités monosaccharidiques) et loin du DP 200 obtenu pour les xylanes extraits avec la méthode classique par la potasse. Les molécules recueillies sont donc des oligosaccharides. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : cette stratégie de délignification n'affecterait qu'une fraction peu retenue de MGX pariétaux de bas poids moléculaires. Elle pourrait affecter également la structure d'autres constituants de la paroi cellulaire. Ce serait par exemple le cas des hémicelluloses qui subiraient une hydrolyse de la liaison glycosidique et conduirait à la libération de résidus oligosaccharidiques. Enfin une autre hypothèse plausible est l'ouverture des cycles de certains xyloses conduisant à la formation d'aldéhydes. En effet le système phtalocyanine/*peroxyde* d'hydrogène a également été utilisé par Kachkarova-Sorokina et *al.*,²²⁸ comme première étape de la fonctionnalisation de polysaccharides suivant le schéma réactionnel proposé (Figure 65).

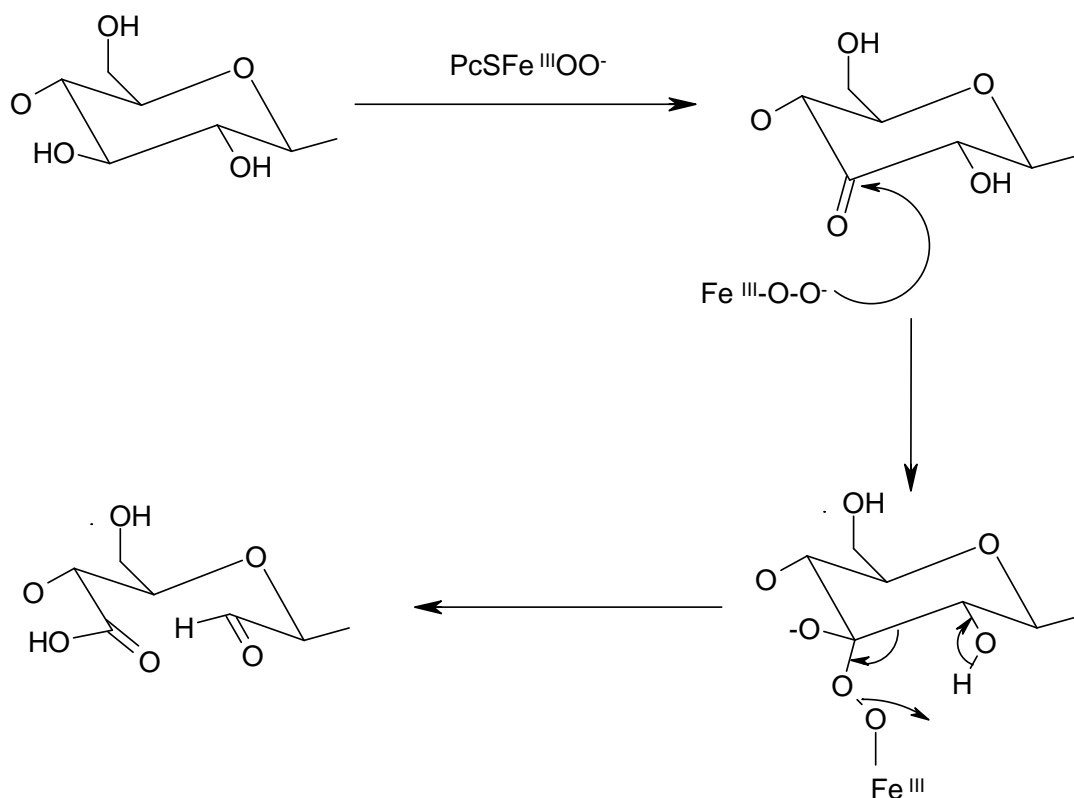


Figure 65 : Proposition de mécanisme pour le clivage de la liaison C₂-C₃ d'un anhydroglucose par Kachkarova-Sorokina et *al.*²²⁸

La présence de nouvelles fonctions aldéhydiques peut fausser le dosage des oses réducteurs, qui nous permet d'estimer le degré de polymérisation de nos polysaccharides, et qui consiste à doser les fonctions aldéhydiques réductrices. Le DP serait alors sous-estimé. Nous essaierons par la suite de valider cette dernière hypothèse par des expériences supplémentaires. De la même façon, la création de nouvelles fonctions acides peut interférer avec le dosage des

acides uroniques. Cependant, il faut que l'oxydation soit suffisante puisque la fonction alcool secondaire est en premier oxydée en aldéhyde, puis l'aldéhyde en acide.

III.3.2.b. Compositions monosaccharidiques

Comme dans les systèmes enzymatiques, les filtrats et résidus issus de l'extraction aqueuse après délignification ont été caractérisés par chromatographie en phase gazeuse après hydrolyse et dérivation. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 19. L'extraction de xylanes à partir de résidus holocellulosiques après délignification oxydative conduit globalement à une meilleure sélectivité. En effet, avec des valeurs comprises entre 60 et 85% de xylose et d'acide 4-*O*-méthylglucuronique, les teneurs en xylanes sont proches de celles obtenues par extraction alcaline de sciures délignifiés par le chlorite de sodium. On constate également que la délignification réalisée avec les composés de fer donne de meilleurs résultats qu'en présence de macrocycles de manganèse. Enfin pour un même métal, l'utilisation de catalyseurs porphyriniques semble moins efficace pour l'extraction qualitative des xylanes. Lorsque que les teneurs en xylanes sont faibles, c'est-à-dire essentiellement pour les extraits issus de sciures (Figure 17), les autres monosaccharides principalement identifiés dans les extraits sont le glucose, le galactose et l'acide galacturonique. Ce dernier indique que des protopectines, pectines très intimement liées à la paroi cellulaire et non solubilisées lors de l'étape de délignification, ont été extraites ici, comme ce fut déjà le cas pour les fractions hémicellulosiques recueillies aux micro-ondes dans l'eau et le DMA (paragraphe I.4.2.b).

Tableau 19 : Compositions monosaccharidiques des fractions après extraction aqueuse en % molaire

Catalyseur ^(a)	Substrat ^(a)	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-O-Me GlcA	Xylane^(b)
FePcS	Holocellulose	1,2	0,2	0,9	75,5	4,4	4,3	1,6	2,0	0,4	9,5	85,0
FePcS	Sciures dépectinées	1,5	0,5	2,4	58,7	11,3	12,7	2,2	3,4	0,9	6,5	65,2
MnPcS	Holocellulose	1,3	0,3	2,1	61,9	9,6	12,9	1,5	2,9	0,7	6,8	68,7
MnPcS	Sciures dépectinées	6,0	0,6	7,9	21,9	10,3	5,9	15,9	26,2	2,6	2,7	24,6
Fe TPPS	Holocellulose	1,6	0,6	0,9	66,8	6,0	8,7	1,2	2,0	1,4	10,9	77,7
Fe TPPS	Sciures dépectinées	2,4	0,7	2,9	50,1	7,6	21,7	1,7	3,7	2,4	6,7	56,8
MnTPPS	Holocellulose	3,9	0,3	2,7	50,9	6,4	4,7	6,7	13,3	1,6	9,6	60,5
MnTPPS	Sciures dépectinées	5,8	0,7	8,9	23,0	13,2	9,0	16,7	15,8	2,7	4,4	27,4

(a) Ces conditions concernent l'étape de délignification préalable à l'extraction des xylanes.

(b) La colonne correspond à la somme des teneurs en xylose et acide 4-*O*-méthylglucuronique.

Les compositions monosaccharidiques ont également été réalisées dans le cas de résidus et les résultats sont présentés sur le Tableau 20. Les teneurs en xylanes dans les résidus restent très élevées (80% en moyenne) en comparaison avec les 10% du résidu

holocellulosique issu de l'extraction alcaline. Cette dernière remarque est conforme avec les rendements d'extraction qui sont - dans les meilleurs des cas – moitié moindre que pour l'extraction alcaline précédée de la délignification au chlorite.

Tableau 20 : Compositions monosaccharidiques des résidus après extraction aqueuse en % molaire

Catalyseur ^(a)	Substrat ^(a)	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-O - Me GlcA	Xylane ^(b)
FePcS	Holocellulose	1,0	0,3	0,6	77,2	3,3	6,6	1,2	1,8	0,2	7,9	85,1
FePcS	Sciures dépectinées	1,0	0,4	0,7	78,7	2,4	4,7	0,8	1,0	1,1	9,3	88,0
MnPcS	Holocellulose	1,8	0,3	1,4	76,1	2,3	2,4	2,9	3,6	0,3	8,4	85,1
MnPcS	Sciures dépectinées	2,7	0,2	1,6	70,7	3,1	2,8	3,3	6,3	1,1	8,2	78,9
Fe TPPS	Holocellulose	1,2	0,5	0,5	57,6	4,4	22,1	0,9	2,1	0,8	10,1	67,7
Fe TPPS	Sciures dépectinées	2,4	0,7	2,9	50,1	7,6	21,7	1,7	3,7	2,4	6,7	56,8
MnTPPS	Holocellulose	2,4	0,3	1,2	68,5	2,7	3,9	3,3	5,9	0,8	11,1	79,6
MnTPPS	Sciures dépectinées	1,9	0,4	0,7	70,5	1,9	9,4	0,9	3,1	0,8	10,5	81,0

(a) Ces conditions concernent l'étape de délignification préalable à l'extraction des xylanes.

(b) La colonne correspond à la somme des teneurs en xylose et acide 4-O-méthylglucuronique.

Cependant, dans le cas des résidus délignifiés par les porphyrines de fer, les teneurs en xylanes, de l'ordre de 70%, sont plus faibles. En effet dans ce cas, les rendements d'extraction en xylanes sont les plus élevés, de l'ordre de 12%, ces résultats sont parfaitement transcrits par l'analyse des compositions monosaccharidiques par CPG.

III.3.2.c. Acétylation des xylanes extraits

Une analyse RMN ¹H sur l'extrait de xylane issu d'un résidu holocellulosique délignifié par FePcS a été réalisée afin d'infirmer ou de confirmer la présence de groupes acétyles. La présence du massif à 2,2 ppm spécifique des groupements acétyles localisés en C₂ et/ou C₃ des résidus xylose confirme l'extraction de xylanes acétylés (Figure 66). Le degré de substitution (DS) est estimé à 0,34 en suivant la méthode de calcul présentée au paragraphe I.3.1.c. et est conforme avec ceux classiquement annoncés dans la littérature pour les xylanes de feuillus.^{44, 94}

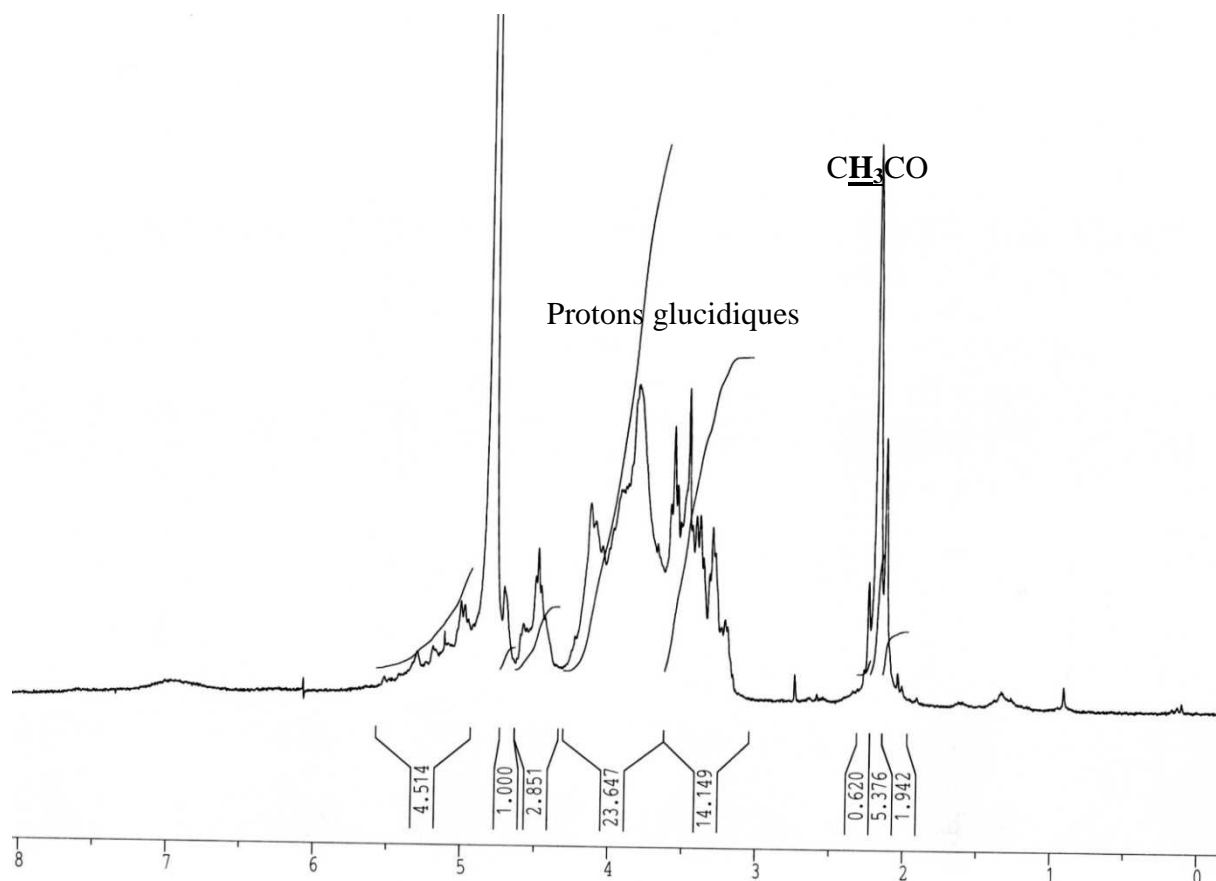


Figure 66 : Spectre RMN ^1H (D_2O) du xylane extrait dans l'eau à partir d'un résidu holocellulosique délignifié par le système $\text{FePcS}/\text{H}_2\text{O}_2$.

III.3.3. Optimisation des paramètres

La faisabilité technique de la mise en œuvre d'une approche de délignification de sciures par les phthalocyanines ou les porphyrines ayant été démontrée, nous avons souhaité optimiser les protocoles utilisés. A cette fin, nous avons procédé à de nouveaux essais en faisant varier la granulométrie, la température et le temps de réaction.

III.3.3.a. La granulométrie

Il est largement connu que, en milieu hétérogène, la taille d'une particule tant comme substrat que catalyseur a une influence significative sur le déroulement d'une réaction. Une granulométrie trop petite augmente la surface de contact et par conséquent la qualité de l'imprégnation mais la diminution trop importante de la taille des particules peut induire la formation d'agglomérats qui au contraire ralentissent la réaction. Dans notre cas, nous avons délignifié des substrats de granulométrie 500 μm et 200 μm . Les résultats sont présentés sur le Tableau 21.

Tableau 21 : Résultats qualitatifs et quantitatifs pour les xylanes extraits sur du matériel de granulométrie 200 et 500 μm

Catalyseur ^(a)	Substrat ^(a)	AU (en %)		DP		Rendement massique d'extraction des xylanes		Composition molaire en xylanes (en %)	
		500 μm	200 μm	500 μm	200 μm	500 μm	200 μm	500 μm	200 μm
FePcS	Holocellulose ^(b)	16,6	11,2	6	8	10,5	9,0	85,0	82,4
FePcS	Sciures dépectinées ^(c)	16,3	19,6	3	2	3,9	6,2	65,2	73,2
MnPcS 3	Holocellulose ^(b)	16,6	43,2	8	14	4,6	4,9	68,7	54,0
MnPcS 3	Sciures dépectinées ^(c)	42,4	35,3	3	5	2,6	2,4	24,6	25,8
Fe TPPS	Holocellulose ^(b)	14,9	17,0	5	4	12,0	14,2	77,7	74,4
Fe TPPS	Sciures dépectinées ^(c)	17,4	20,1	3	3	12,1	8,9	56,8	53,0
MnTPPS	Holocellulose ^(b)	22,1	27,1	18	24	5,1	4,6	60,5	54,8
MnTPPS	Sciures dépectinées ^(c)	19,9	21,3	5	5	1,9	1,9	27,4	24,9

(a) Ces conditions concernent l'étape de délignification préalable à l'extraction des xylanes

(b) 24 h de délignification

(c) 100 h de délignification

Globalement, les résultats obtenus avec ces deux granulométries sont comparables, tant qualitativement que quantitativement. Seuls les rendements d'extraction en xylanes à partir de sciures (et délignifié avec FePcS) et à partir d'holocellulose (et délignifié avec FeTPPS) ont vu leur taux augmenter par rapport à la granulométrie 500 μm passant de 12 à 14,2%. La taille des molécules extraites n'évolue pas, la majorité étant des oligosaccharides dont le DP est inférieur à 10. La granulométrie n'est donc pas un facteur déterminant dans le cadre expérimental que nous nous sommes fixés.

III.3.3.b. La température

Initialement la température de référence pour les étapes de délignification est de 20°C (température ambiante). Une augmentation de la température est souvent associée à l'amélioration de l'efficacité et donc des rendements d'extraction. Afin de ne pas provoquer une dégradation des hémicelluloses d'intérêt, nous avons optimisé la température et opéré de nouveaux essais à 40°C. La réaction de délignification oxydative a été réalisée sur des résidus de sciures dépectinées ou d'holocelluloses, avec la phtalocyanine de fer et dans les conditions standard définies au paragraphe III.3. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Résultats qualitatifs et quantitatifs pour les xylanes extraits sur des sciures et de l'holocellulose à 20 et 40°C

Substrat ^(a)	Température(°C) ^(a)	AU (en %)	DP	Rendement massique d'extraction (en %)	Composition molaire en xylanes (en %)
Holocellulose	20	16,6	6	10,5	85,0
Holocellulose	40	14,3	6	8,1	84,9
Sciures dépectinées	20	16,3	3	3,9	65,2
Sciures dépectinées	40	12,7	3	6,3	71,9

(a) Ces conditions concernent l'étape de délignification préalable à l'extraction des xylanes.

Pour les résidus holocellulosiques et les sciures, l'élévation de la température n'induit pas de modification sensible. Cependant il est possible de constater dans le cas des holocelluloses, une diminution du rendement d'extraction qui passe de 10,5% à 8% ; le phénomène est inversé dans le cas de sciures. Ces dernières sont très lignifiées et la chaleur doit favoriser dans ce cas le processus de délignification oxydative, et donc ensuite faciliter l'extraction des hémicelluloses dans l'eau.

III.3.3.c. Temps de réaction

L'influence du temps a également été étudiée sur notre système avec la FePcS comme catalyseur sur l'holocellulose et à une température de 20°C. Des durées de délignification oxydative de 1, 24 et 100 h sont testées (Tableau 23). Pour les résidus holocellulosiques, l'élévation du temps conduit à de changements non négligeables. L'élévation du temps réactionnel de 1 à 24 h permet une augmentation du rendement d'extraction qui passe de 6,3 à 10,5%. Un allongement supplémentaire du temps de 24 à 100 h n'induit pas d'évolution en termes de rendement massique et est même défavorable concernant la qualité des extraits (la composition molaire en xylanes diminuant). Un temps de réaction de 24 h semble optimal pour la délignification de l'holocellulose par le système phtalocyanine/H₂O₂. Dans tous les cas, les molécules extraites sont des oligosaccharides, les DP étant compris entre 3 et 8.

Tableau 23 : Résultats qualitatifs et quantitatifs pour les xylanes extraits sur de l'holocellulose à des temps variables (après délignification avec FePcS comme catalyseur)

Temps (en h) ^(a)	AU (en %)	DP	Rendement massique d'extraction (en %)	Composition molaire en xylanes (en %)
1	29,6	8	6,3	70,6
24	16,6	6	10,5	85,0
100	12,7	3	10,2	76,6

(a) Cette condition concerne l'étape de délignification préalable à l'extraction des xylanes.

Dans le cas des sciures, compte tenu de leur lignification plus élevée, seules les conditions de temps 24 et 100 h ont été testées. Les résultats sont présentés Tableau 24.

Tableau 24 : Résultats qualitatifs et quantitatifs pour les xylanes extraits sur des sciures pour des temps de délignification oxydative de 24 et 100h avec FePcS

Temps (en h) ^(a)	AU (en %)	DP	Rendement massique d'extraction (en %)	Composition molaire en xylanes (en %)
24	20,6	3	1,9	54,3
100	16,3	3	3,9	65,2

(a) Cette condition concerne l'étape de délignification préalable à l'extraction des xylanes.

Le constat est le même que précédemment puisque l'allongement du temps permet de doubler le rendement d'extraction qui passe de 1,9 à 3,9%. Une durée prolongée de délignification permet une meilleure dégradation des lignines et donc une meilleure extraction des xylanes auparavant liés à la lignine. Le rendement demeure toutefois modeste bien que la sélectivité soit améliorée. De ce fait, il ne semble pas que ce système soit adapté à des matrices telles que les sciures.

III.3.4. Hypothèse relative aux mécanismes d'oxydation et leur répercussion sur la structure des molécules

Précédemment, nous avons émis plusieurs hypothèses pour expliquer le faible degré de polymérisation des molécules extraites. Nous avons supposé que l'apparition de fonctions aldéhydes causée par le protocole de délignification mis en œuvre faussait le dosage des sucres réducteurs qui tient compte des fonctions aldéhydiques réductrices. De ce fait, le protocole de délignification a été renouvelé directement sur 250 mg de xylanes de deux types : des xylanes de hêtre commerciaux (Sigma) et des xylanes de châtaignier extraits selon le protocole proposé au paragraphe I.1. L'oxydation est réalisée à température ambiante, dans 25 mL d'eau distillée en présence de 14 mg de FePcS et de 1 mL de peroxyde d'hydrogène pendant 24 h.

III.3.4.a. Dosages colorimétriques

Les dosages colorimétriques spécifiques des acides uroniques¹²¹ et des oses réducteurs¹²⁴ nous donnent une première information qualitative sur les xylanes après leur

oxydation. Si globalement, les teneurs en acides uroniques n'ont pas ou peu varié, le degré de polymérisation estimé par colorimétrie s'est très nettement abaissé passant de 200 à 20 (Tableau 25). Ce constat laisserait penser que le système oxydant utilisé est en mesure de rompre les liaisons glycosidiques du xylane conduisant ainsi à leur dépolymérisation.

Tableau 25 : Données qualitatives des xylanes avant et après oxydation par le système FePcS/H₂O₂

Types de xylanes	Conditions	AU (%)	DP
Xylanes de hêtre commercial	Avant oxydation	9,0	160
	Après oxydation	9,0	14
Xylanes de châtaignier	Avant oxydation	12,3	200
	Après oxydation	9,1	26

Néanmoins, comme le montre la Figure 65, le système oxydant crée des fonctions aldéhydes qui pourraient interférer lors du dosage des fonctions aldéhydiques réductrices. Le DP sera alors sous-estimé

III.3.4.b. Dosages des fonctions acides carboxyliques et aldéhydes

Afin d'évaluer l'importance du phénomène d'oxydation sur le glucuronoxylane, la quantité de fonctions aldéhydes et carboxyliques a été dosée sur les polysaccharides avant et après oxydation. Pour le dosage des fonctions carboxyliques, le polysaccharide est placé en milieu légèrement basique et l'excès de soude est dosé par de l'acide chlorhydrique. Pour celui des fonctions aldéhydes, la méthode utilisée celle de Pommerening.²²⁹ Le principe du dosage est assimilé au dosage de Cannizarro et met en jeu la dismutation des fonctions aldéhydes sous l'action de la soude. La moitié des aldéhydes est oxydée en acide et l'autre moitié réduite en alcool (Figure 67).

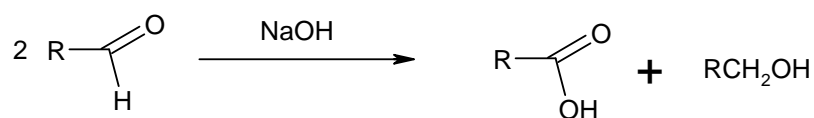


Figure 67 : Réaction de Cannizarro

Le nombre de moles créées pour chaque fonction est calculé par les formules données aux paragraphes III.2.4 et III.2.5 et les résultats sont exprimés en millimoles par gramme de polysaccharides (Tableau 26). Si la quantité de fonctions carboxyliques reste faible, la quantité de fonctions aldéhydiques créée est importante. Cela s'explique par le fait qu'une

fonction carboxylique est obtenue par oxydation d'une fonction aldéhyde ; ces dernières sont les premières formées et donc les plus nombreuses surtout chez le xylane de châtaignier.

Tableau 26 : Résultats des dosages des fonctions acides et aldéhydes

Variétés de xylanes	n _{COOH} créés en mmol/g de polysaccharide	n _{CHO} créés en mmol/g de polysaccharide
Xylanes de hêtre commercial	0,7	1,2
Xylanes de châtaignier	0,2	4,3

Les valeurs ainsi obtenues confirment l'apparition des fonctions carboxyliques et aldéhydiques et supportent l'hypothèse selon laquelle les fonctions aldéhydiques dosées dans cette étude puissent l'être également lors de l'estimation des oses réducteurs.

III.3.4.c. RMN ¹H et ¹³C

Afin de confirmer la création de ces fonctions acides et aldéhydes, une étude RMN a été effectuée. En proton ou en carbone les signaux concernant ces fonctions sont suffisamment déblindés pour être identifiables sans ambiguïté. Dans les spectres RMN ¹H, le signal le plus déblindé aux alentours de 5,5 ppm correspond au proton anomérique de l'acide 4-O-méthylglucuronique (Figure 68), mais aucun ne correspond à des fonctions aldéhydes.

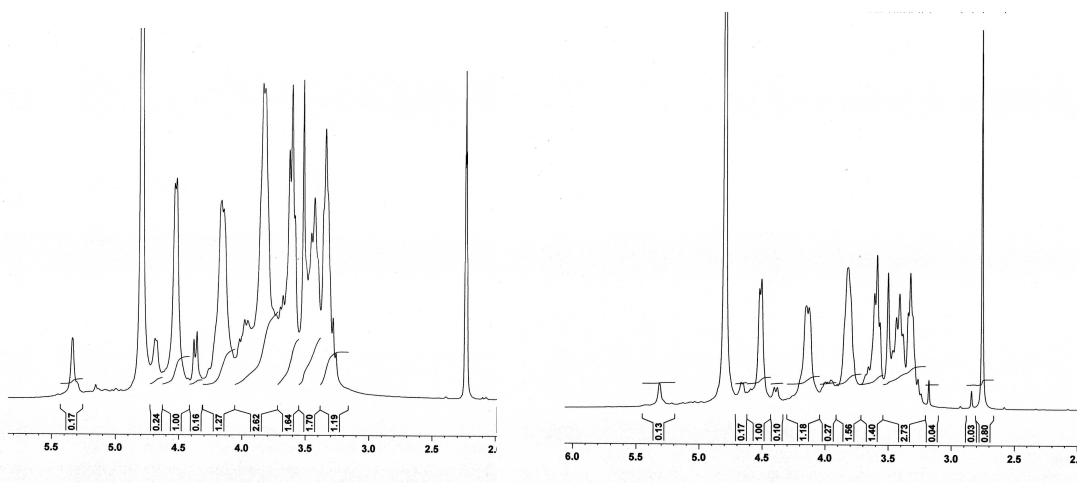


Figure 68 : Spectre RMN ¹H (D₂O) du xylane de châtaignier avant (à gauche) et après oxydation par le système FePcS/H₂O₂.

L'analyse RMN ¹³C conduit au même résultat. Chez les xylanes natifs, les 5 signaux à 101, 76, 73, 72 et 69 ppm correspondent respectivement aux carbones C-1, C-4, C-3, C-2 et

C-5 des unités de xylose non substitué. Cependant sur les spectres des xyloxydés aucun signal à 170 et à 180 ppm, caractéristiques des acides carboxyliques et des aldéhydes n'est identifié. Ceci peut s'expliquer par la présence d'un équilibre entre les formes aldéhydique et dialcool dans l'eau, ce qui masque la présence de ces fonctions aldéhydiques (Figure 69).

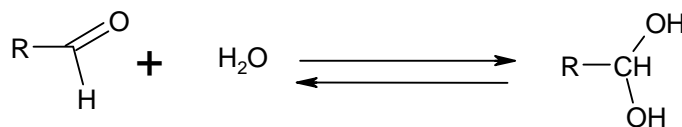


Figure 69 : Réaction d'équilibre d'un aldéhyde dans l'eau

III.3.4.d. Analyses par infrarouge

Pour détecter l'éventuelle présence de fonctions aldéhydiques, une analyse infrarouge est faite sur les deux xyloxydés. Le spectre IR montre l'apparition d'une bande vers 1720-1730 cm^{-1} caractéristique de la fonction C=O d'un aldéhyde confirmant l'oxydation du polysaccharide par le système FePcS/H₂O₂. Les aldéhydes ont aussi une bande $\nu(\text{C-H})$ vers 2700-2800 cm^{-1} .

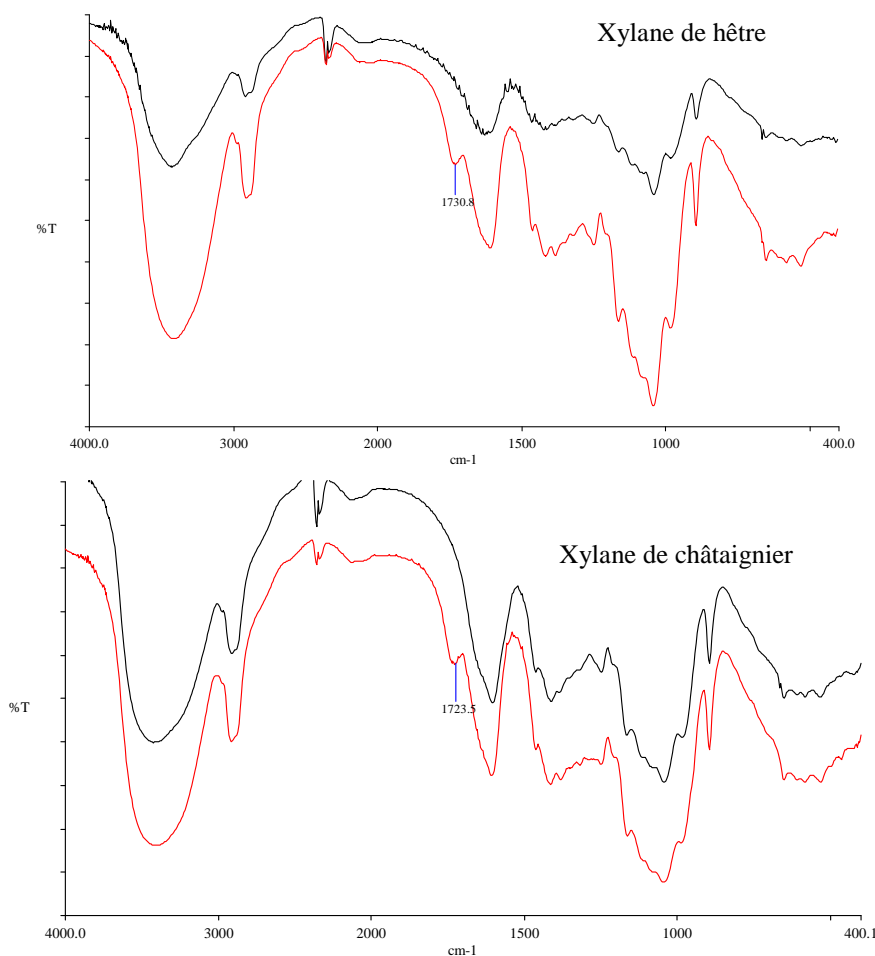


Figure 70 : Spectre IR des xyloxydés de hêtre et de châtaignier avant (spectres noirs) et après oxydation (spectres rouges) par le système FePcS/H₂O₂

III.3.4.e. Profils de masse moléculaire par HPLC

Afin de contrôler l'effet du système oxydant sur le profil de masse moléculaire des glucuronoxylanes, une analyse par HPLC sur colonnes d'exclusion stérique a été réalisée. La superposition des deux profils, en mettant en évidence l'apparition d'un décalage du profil du xylane oxydé vers des masses moléculaires plus faibles laisse supposer qu'une dépolymérisation partielle a eu lieu.

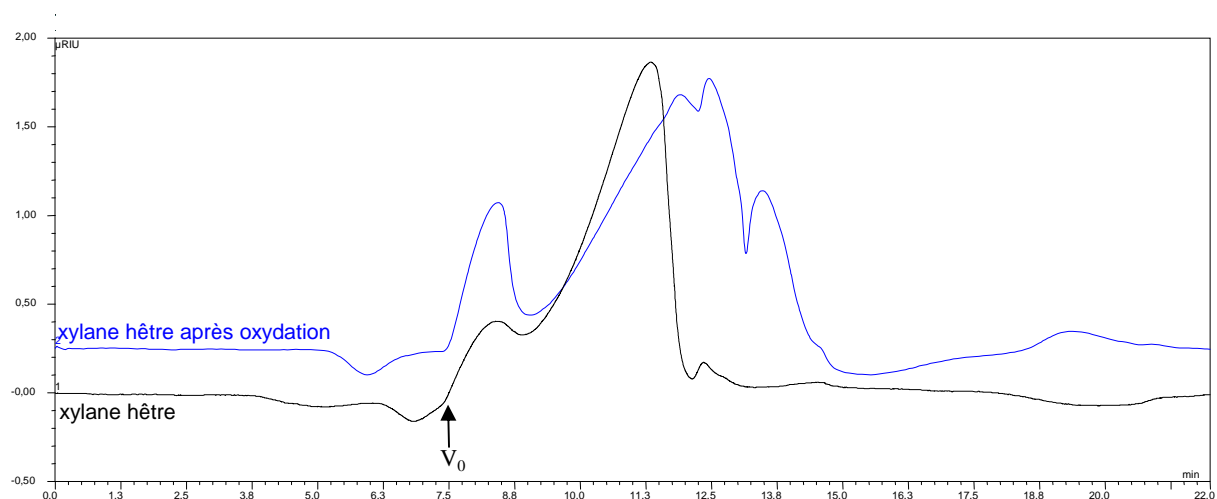


Figure 71 : Profils de masses de glucuronoxylanes de hêtre ayant ou non subi un traitement oxydatif par le système FePcS/H₂O₂

III.3.4.f. Bilan sur l'effet du système oxydant MPcS/H₂O₂ sur les xylanes

Il semblerait que le système oxydant étudié dans cette partie soit responsable de la création de fonctions aldéhydes et, dans une moindre proportion de fonctions acides. La présence de ces fonctions fausserait l'estimation de la taille des molécules dont les DP ne seraient pas aussi faibles que ceux annoncés. Toutefois le profil de masse moléculaire indique qu'une dépolymérisation se produit également. Ainsi le système MPcS/H₂O₂ non seulement oxyderait les lignines comme cela était notre objectif mais il altérerait la structure de nos hémicelluloses d'intérêt d'une part en les oxydant et d'autre part en provoquant la rupture de liaisons glycosidiques de la chaîne principale de xylose.

III.4. Bilan sur le système de délignification MPcS ou MTPPS/H₂O₂

L'étude du système de délignification MPcS ou MTPPS/H₂O₂ démontre qu'il est possible de concurrencer les systèmes classiques de délignification par le chlorite de sodium et d'extraction alcaline de matériaux très lignifiés telles les sciures de bois. Nous avons obtenu des rendements massiques en xylanes de l'ordre de 14% après délignification avec notre système et extraction aqueuse alors que pour la délignification au chlorite et l'extraction alcaline il est de 20%. Les résultats préliminaires obtenus avec ces procédés sont moins performants que le système classique au chlorite de sodium mais présentent l'avantage d'utiliser des produits réputés propres. La qualité des extraits reste comparable en termes de compositions monosaccharidiques par rapport à une extraction alcaline classique, avec une sélectivité en xylanes aussi élevée. Cependant nous avons observé une diminution des DP ainsi que l'apparition probable de fonctions aldéhydes et acides.

Chapitre IV. Délignification induite photochimiquement en présence de porphyrines ou de phtalocyanines

Poursuivant la recherche de nouveaux systèmes de délignification, nous nous sommes alors attachés à utiliser des macrocycles tétrapyrroliques comme photosensibilisateurs. En effet les porphyrines comme les phtalocyanines sont fortement colorés en raison de leur aromaticité. Ces produits présentent un caractère de photosensibilisateurs si leurs états excités ont une durée de vie suffisante.

Pour les phtalocyanines utilisées lors de cette étude nous avons choisi le zinc, le nickel et l'aluminium car au regard de la littérature, ce sont de bons candidats pour la production d'oxygène singulet.^{89, 230} Le Rose de Bengale est lui aussi un photosensibilisateur efficace pour les réactions de photo-oxydation en produisant de l'oxygène singulet avec de forts rendements.⁸⁸

Les photosensibilisateurs sont utilisés dans l'eau en présence de substrats à délignifier sous atmosphère oxygénée et sous irradiation lumineuse afin de dégrader photochimiquement les lignines, selon le principe présenté Figure 72.

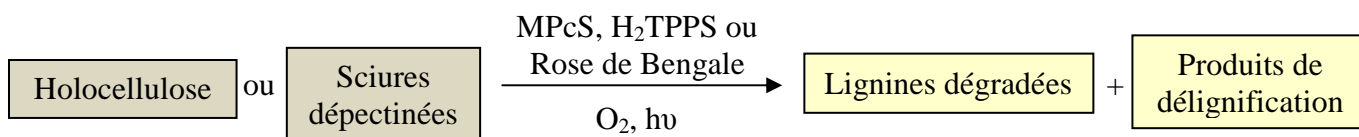


Figure 72: Présentation du système de photooxydation. (M=Al, Ni, Zn)

IV.1. Synthèse des photosensibilisateurs

IV.1.1. Synthèse de la tétraphénylporphyrine sulfonée

Elle est obtenue selon le schéma de synthèse présenté Figure 62. Le rendement après purification est de 87%. La masse obtenue en MALDI-TOF ($m/z = 935,24$) et la RMN ¹H confirme la structure du produit attendu.

IV.1.2. Synthèse de la sulfophtalocyanines d'aluminium, de nickel et de zinc

Elles ont été synthétisées selon la même méthode que les phtalocyanines de fer et de manganèse (Figure 61) en utilisant des chlorures hydratés d'aluminium, de zinc et de nickel et sont utilisées sans purification supplémentaire. Elles ont été caractérisées par UV-Visible, par

spectrométrie de masse MALDI-TOF et par RMN ^1H , et les résultats de ces analyses confirment les structures attendues.

IV.2. Protocole de dégradation des lignines et d'extraction des xylanes

Le matériel à délignifier (1% masse/volume) est placé en milieu aqueux en présence de 0,056% (m/v) de photosensibilisateur. Après saturation du milieu en oxygène, celui-ci est fermé hermétiquement et placé sous irradiation lumineuse. L'irradiation apportée est de la lumière blanche sous forme de deux lampes de 100 Watts afin de produire l'oxygène singulet. Les matériaux à délignifier sont des lots d'holocellulose et de sciures de châtaignier de 500 μM . Les xylanes sont ensuite extraits simplement à reflux dans l'eau.

IV.2.1. Etude qualitative et quantitative des extraits après délignification photochimique

IV.2.1.a. Dosage des phénols

Nous dosons les phénols comme précédemment avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Tableau 27). Avec les phtalocyanines d'aluminium et de zinc comme photosensibilisateurs, on constate que la quantité de phénols dosés et relargués dans le milieu sont identiques quel que soit le substrat qui subit la délignification (0,7 mg pour AlPcS et 1,1 mg pour ZnPcS).

Tableau 27 : Quantités estimées en phénols par dosages après délignification photochimique

Photosensibilisateur	Substrat	Quantité en phénols (en mg)
H_2TPPS	Sciures	1,0
	Holocellulose	1,9
AlPcS	Sciures	0,7
	Holocellulose	0,7
NiPcS	Sciures	0,9
	Holocellulose	3,3
ZnPcS	Sciures	1,1
	Holocellulose	1,2
Rose de Bengale	Sciures	0,8
	Holocellulose	1,8

Dans le cas de la porphyrine de fer, la phtalocyanine de nickel et le Rose de Bengale, les quantités de phénols libérés sont nettement supérieures (au moins le double) lors de la délignification des sciures que de l'holocellulose, ce qui semble logique puisque l'holocellulose a déjà été délignifiée et qu'elle contient donc moins de polyphénols

IV.2.1.b. Réaction secondaire de photoblanchiment

Au cours de la réaction, un photoblanchiment des photosensibilisateurs est observé de façon plus ou moins prononcée selon le type de photosensibilisateurs. La turbidité des solutions après photooxydation ne nous permettait pas d'obtenir, même après centrifugation, les spectres UV-visible de l'absorbance. Nous avons donc choisi d'évaluer visuellement ce phénomène (Figure 73).

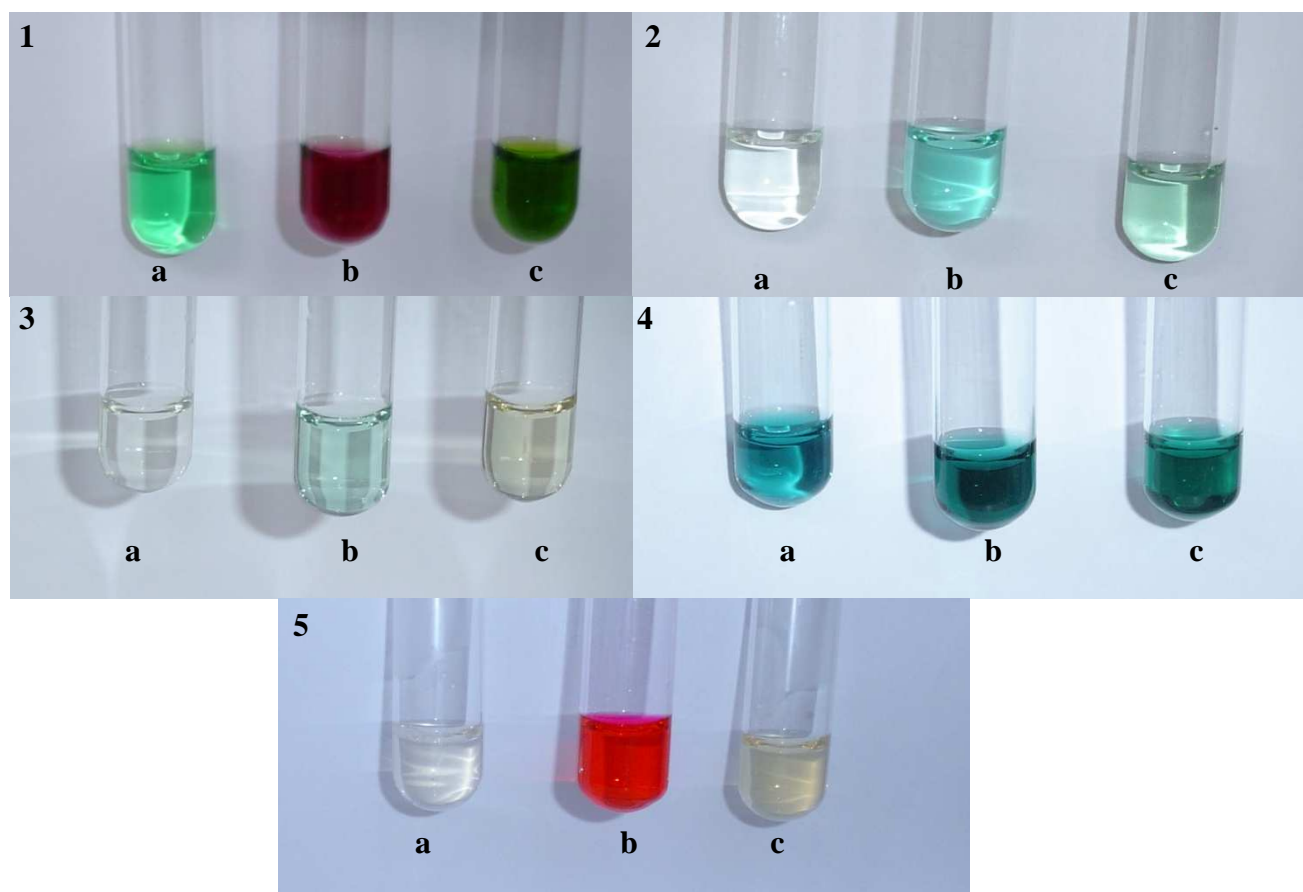


Figure 73 : Filtrats correspondant aux délignifications photochimiques. Photo 1 : H₂TPPS. Photo 2 : AlPcS. Photo 3 : ZnPcS. Photo 4 : NiPcS. Photo 5 : Rose de Bengale.

(a) Solutions après délignification de l'holocellulose. (b) Solutions avant photooxydation. (c) Solution après délignification de sciures dépectinées.

La couleur initiale de H₂TPPS (Photo 1) solubilisée dans l'eau est violette. Au bout de huit jours de réaction, les couleurs des solutions sont vertes. Les porphyrines peuvent être

utilisées comme indicateurs colorés car en milieu acide elles deviennent vertes et sont violettes au pH de l'eau. Le pH des solutions est de 5,85 pour la solution porphyrinique avant la délignification ; il n'est plus que de 3,35 pour les deux autres solutions, ce qui explique le changement de coloration. L'abaissement du pH au cours de la réaction est sans doute causé par le relargage dans le milieu de polyphénols ou de structures similaires lors de la délignification. La solution ayant contenu l'holocellulose a subi un photoblanchiment tandis que la solution de sciures semble avoir une couleur aussi intense que la solution initiale de H₂TPPS.

Pour les délignifications photochimiques avec AlPcS (Photo 2) et ZnPcS (Photo 3), un photoblanchiment est observé, ce dernier étant plus prononcé pour le filtrat contenant l'holocellulose. Kluson²³⁰ note que la décomposition des phtalocyanines d'aluminium et de zinc est insignifiante mais la réaction n'a lieu que sur 200 minutes contre 100 h dans le cas de notre étude, ce qui explique la différence de photostabilité.

Pour la phtalocyanine de nickel (NiPcS), il y a seulement un léger photoblanchiment qui nous permet de dire que NiPcS est très résistant à la photooxydation comme cela a déjà été précédemment observé par d'Alessandro.²³¹ Il affirme aussi que cette stabilité est thermique puisque des essais montrent qu'au bout de 24 h à 80°C, pas de changements sont perceptibles après analyses UV.

Pour le Rose de Bengale, le photoblanchiment paraît très marqué car les filtrats après délignification sont quasi transparents mais il s'avère que la coloration a plutôt imprégné les résidus holocellulosiques et les sciures. En effet, lors du rinçage, une importante et persistante coloration rose est apparue dans les eaux, ce qui laisse supposer que le Rose de Bengale n'est pas aussi instable et sensible à la lumière que ne le suggère la photo.

IV.2.1.c. Interprétation

Tous nos photosensibilisateurs produisent de l'oxygène singulet (¹O₂) à partir de l'oxygène moléculaire comme cela a été vérifié par le test à l'acétate d'ergostérol. Ce dernier est utilisé comme accepteur d'oxygène singulet afin de former l'endoperoxyde d'acétate d'ergostérol. L'analyse des produits formés met en évidence, après quinze minutes d'irradiation, la présence de l'endoperoxyde et donc la formation d'oxygène singulet pour tous les macrocycles testés. C'est cet oxygène singulet qui provoque la dégradation de la lignine ainsi que les réactions secondaires de photoblanchiment.⁸⁸ Il semblerait que les photosensibilisateurs ne subissent pas tous avec la même intensité ce phénomène. Ainsi la H₂TPPS, la NiPcS et le Rose de Bengale semblent les plus résistants à leur dégradation et sont

ceux qui dans le cas des matériaux bruts telles les sciures dégradent le plus la lignine si l'on se réfère au dosage des phénols. Un tel constat est conforme avec l'idée selon laquelle un photosensibilisateur qui se dégrade facilement produit moins d'oxygène singulet et présentera en conséquence des capacités plus faibles à oxyder la lignine.

IV.2.2. Etude qualitative et quantitative des xylanes extraits

L'étude des compositions centésimales et monosaccharidiques des fractions extraites dans l'eau après délignification vont nous permettre d'apprécier la qualité de la dégradation photochimique des lignines.

IV.2.2.a. Composition centésimale

Concernant la H₂TPPS, les rendements d'extraction (Tableau 28) en xylanes sont similaires et de l'ordre de 4% quels que soient les substrats de la délignification. Pour les autres photosensibilisateurs, ils sont globalement au moins trois fois plus élevés lorsqu'elle a lieu sur de l'holocellulose que sur des sciures dépectinées.

Tableau 28 : Compositions centésimales des fractions après extraction aqueuse

Photosensibilisateur	Substrat ayant subi la délignification photochimique	AU (en %)	DP	Rendement massique d'extraction en xylanes (en %)
H ₂ TPPS	Holocellulose	39,2	5	3,8
	Sciures dépectinées	24,6	19	4,2
AlPcS	Holocellulose	24,0	26	6,9
	Sciures dépectinées	22,0	12	2,1
ZnPcS	Holocellulose	17,1	37	5,2
	Sciures dépectinées	20,1	10	1,6
NiPcS	Holocellulose	17,6	9	4,3
	Sciures dépectinées	16,4	12	1,1
Rose de Bengale	Holocellulose	14,4	15	5,3
	Sciures dépectinées	36,9	10	1,6

L'étape de délignification mise en place ici ne semble pas suffisante pour les sciures dépectinées et ne permet pas d'extraire quantitativement les xylanes pariétaux. Qualitativement, les xylanes extraits sont des oligosaccharides de DP variables, avec une moyenne de 15 unités par xylane.

IV.2.2.b. Composition monosaccharidique

Les résultats des compositions monosaccharidiques des extraits sont présentés Tableau 29. Les extraits issus d'holocelluloses sont très riches en xylanes avec des teneurs comprises entre 74 et 81%, valeurs sensiblement identiques à celles que l'on obtient également après extraction alcaline de résidus délignifiés par le chlorite de sodium. Avec de 40 à 53% de xylanes, l'extraction aqueuse sur des sciures conduit à une moins bonne sélectivité. Une telle différence de comportement ne peut pas être expliquée uniquement par l'effet du solvant qui, est l'eau dans les deux cas.

Tableau 29 : Compositions monosaccharidiques des extraits après extraction aqueuse

Catalyseur	Substrat de la délignification avant extraction	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-O-Me GlcA	Xylane
H ₂ TPPS	Holocellulose	3,0	0,2	1,5	67,3	4,5	2,3	3,9	5,7	0,7	10,8	78,1
	Sciures dépectinées	5,5	0,9	12,9	35,6	9,4	6,8	10,0	13,2	1,6	4,0	39,6
AlPcS	Holocellulose	2,4	0,2	1,6	76,0	4,6	1,9	4,0	3,7	0,4	5,3	81,3
	Sciures dépectinées	3,2	0,3	6,5	48,0	12,4	9,9	7,3	7,0	1,0	4,5	52,5
ZnPcS	Holocellulose	2,3	0,1	1,5	70,0	6,3	3,4	2,9	4,8	0,8	7,8	77,8
	Sciures dépectinées	2,8	0,4	5,7	49,0	14,4	11,9	5,7	5,4	0,8	4,0	53,0
NiPcS	Holocellulose	2,4	0,0	1,6	65,9	8,8	3,5	3,0	5,8	0,6	8,4	74,3
	Sciures dépectinées	3,3	0,4	7,9	44,7	17,5	10,4	5,6	6,5	0,7	3,1	47,8
Rose de Bengale	Holocellulose	2,4	0,2	1,7	71,0	5,4	2,4	3,0	3,6	0,6	9,7	80,7
	Sciures dépectinées	3,0	0,4	6,8	44,5	14,3	7,2	7,1	11,7	0,8	4,3	48,8

Les résidus après délignification et extraction des xylanes ont également subi une analyse chromatographique (Tableau 30).

Tableau 30 : Compositions monosaccharidiques des résidus après extraction aqueuse des xylanes

Catalyseur	Substrat de la délignification avant extraction	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-O - Me GlcA	Xylane
H ₂ TPPS	Holocellulose	2,0	0,4	0,5	72,0	3,6	5,5	2,7	3,0	0,4	9,7	81,7
	Sciures dépectinées	2,8	0,2	1,3	68,1	2,5	3,2	4,4	7,3	1,4	8,9	77,0
AlPcS	Holocellulose	1,7	0,2	0,5	72,3	3,6	7,5	2,1	2,2	0,4	9,6	81,9
	Sciures dépectinées	2,7	0,1	1,7	70,5	3,0	2,8	3,5	6,3	1,0	8,4	78,9
ZnPcS	Holocellulose	2,1	0,2	0,7	70,3	3,3	7,2	2,9	3,1	0,5	9,7	80,0
	Sciures dépectinées	2,7	0,2	1,6	68,9	2,6	3,4	4,2	6,3	1,0	9,3	78,2
NiPcS	Holocellulose	2,2	0,2	0,6	70,4	2,8	6,8	3,1	3,2	0,5	10,4	80,8
	Sciures dépectinées	2,5	0,3	1,4	68,8	2,8	2,7	3,1	6,5	1,4	10,7	79,5
Rose de Bengale	Holocellulose	2,5	0,4	0,7	70,2	3,6	5,9	3,1	3,7	0,4	9,5	79,7
	Sciures dépectinées	2,8	0,3	1,2	68,3	3,4	3,0	3,9	6,2	0,8	10,2	78,5

Avec des teneurs d'environ 80% en xylanes, les résidus obtenus présentent des quantités résiduelles en xylanes importantes ce qui est expliqué par les faibles valeurs de rendements d'extraction enregistrées.

IV.2.3. Bilan de la délignification photochimique

La délignification photochimique est une méthode de délignification originale, non polluante puisqu'elle se réalise en conditions aqueuses et ne nécessite, en dehors des photosensibilisateurs, que de la lumière. Néanmoins, les résultats obtenus tant qualitatifs que quantitatifs (rendement optimal à 6%) sont modestes non seulement par comparaison avec la méthode alcaline de référence mais aussi avec le système oxydant phtalocyanine ou porphyrine/H₂O₂. Ce constat est d'autant plus vrai lorsque les sciures dépectinées sont utilisées comme substrat. Cela nous permet de dire que les espèces radicalaires comme HO[•] sont plus oxydantes que l'oxygène singulet libéré au cours de la photooxydation. D'autre part, tout comme la méthode enzymatique, ce processus ne semble pas particulièrement adapté à des matériaux aussi lignifiés que les sciures de bois.

IV.3. Bilan général

Dans le cadre de ce travail, plusieurs solvants d'extraction des xylanes et trois méthodes de délignification ont été sélectionnés et comparés aux procédés classiquement utilisés. S'agissant d'extraire des hémicelluloses, le traitement alcalin par la potasse reste incontestablement le plus efficace tant sous l'angle quantitatif - *les rendements d'extraction*

atteignent généralement plus de 20% de la masse - que qualitatif - cet agent d'extraction présente une bonne sélectivité pour les xylanes qui représentent plus de 90% de la composition molaire des extraits bruts recueillis. Un tel résultat est à associer aux propriétés chimiques des solutions alcalines qui sont en mesure notamment de rompre les liaisons de type ester, qui stabilisent la relation entre les hémicelluloses et les lignines. Avec des rendements d'extraction d'environ 10% massique et une bonne sélectivité, le DMSO apparaît lui aussi très spécifique des xylanes. En revanche, l'eau ne permet pas d'extraire quantitativement les xylanes trop ancrés à l'intérieur de la paroi cellulaire. La variabilité du mode de chauffage - *classique ou micro-ondes* - tout comme la mise en œuvre de prétraitements par les ultrasons ne conduit à aucune amélioration significative.

Il convenait alors de recourir à une délignification préalable des sciures pour parvenir à extraire les xylanes dans l'eau. C'est la raison pour laquelle nous avons testé d'autres méthodes de délignification que celle - *considérée comme classique* - qui recourt à l'utilisation du chlorite de sodium. Si le procédé enzymatique qui n'a produit que des résultats modestes s'est avéré décevant, la méthode photochimique, originale dans son approche, a conduit à l'obtention de quelques résultats encourageants. Il conviendra dans une démarche ultérieure de compléter cette approche par des essais d'optimisation qui devront intégrer le suivi de l'évolution de la structure des glucuronoxylanes extraits. Pour conclure, la délignification thermique par des macrocycles de fer et de manganèse en présence de *peroxyde d'hydrogène* semble la plus aboutie des méthodes alternatives prospectées dans cette étude. Intéressante sous l'angle quantitatif et qualitatif - *les xylanes sont extraits avec des rendements de l'ordre de 12% et une sélectivité de 80% molaire* - cette stratégie, ainsi qu'en témoigne nos résultats, conduit néanmoins à une évolution de la structure des glucuronoxylanes extraits ce qui s'oppose aux prérequis généralement retenus par l'expérimentateur désireux d'extraire quantitativement les molécules d'intérêt sous leur forme native. Un tel phénomène, à savoir l'apparition de fonctions aldéhydiques réputées très réactives peut conduire à la fonctionnalisation des extraits polysaccharidiques et doit pouvoir permettre aux glycochimistes de développer de nouvelles stratégies de valorisation des glucides en utilisant l'eau comme unique solvant.

**Troisième partie : Quelques propriétés oncologiques de
xylanes de châtaignier (*Castanea sativa*)**

L'importance de certaines classes de polysaccharides est actuellement ré-évaluée et, comme nous l'avons précisé dans l'introduction bibliographique, de nombreuses applications sont aujourd'hui proposées – y compris à l'échelle industrielle – pour les polysaccharides de la famille des xylanes. Après avoir développé plusieurs stratégies d'obtention d'hémicelluloses avec délignification préalable, nous nous proposons de présenter les propriétés oncologiques de xylanes extraits de châtaignier. A cette fin, nous avons isolé deux fractions hémicellulosiques de sciures de feuillus. Ces propriétés sont comparées avec celles d'hémicelluloses d'argan dont une fraction est dépourvue d'acides uroniques. Une telle stratégie doit nous permettre d'appréhender le rôle des fonctions carboxyle du point de vue de l'activité anticancéreuse. Ces fonctions sont souvent corrélées à des propriétés biologiques bien que cette caractéristique ne soit pas un déterminant absolu.²³² Une étude préliminaire consacrée aux propriétés biologiques de glucuronoxylanes de châtaignier en oncologie cellulaire et moléculaire²⁰⁶ a été initiée au Laboratoire en collaboration avec le Professeur Kraemer (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Paris XIII) ; ils ont effectivement montré des activités cytotoxiques remarquables vis à vis de cellules cancéreuses. Nous nous sommes attachés à préciser cette relation structure - activité avec pour objectif de comprendre le déterminisme moléculaire de la variabilité des propriétés biologiques des xylanes sur les cellules cancéreuses A431 issues d'un épiderme vulvaire.

Chapitre I. Extraction, purification et caractérisation chimique de xylanes de bois de châtaignier et de péricarpe d'argan

I.1. Extraction alcaline des xylanes de châtaignier et d'argan

I.1.1. Extraction de xylanes de châtaignier

Le protocole expérimental utilisé (Figure 74) pour l'extraction séquentielle et sélective des polysaccharides pariétaux des sciures de bois est celui proposé dans notre laboratoire par Moine² et a déjà été présenté au paragraphe I.1. Pour le protocole II, un prétraitement à la potasse diluée a été ajouté à l'extraction classique à la potasse à 4,3 M. Celui-ci, en induisant le gonflement de la paroi cellulaire, peut favoriser l'extractabilité des polysaccharides présents dans cette paroi.

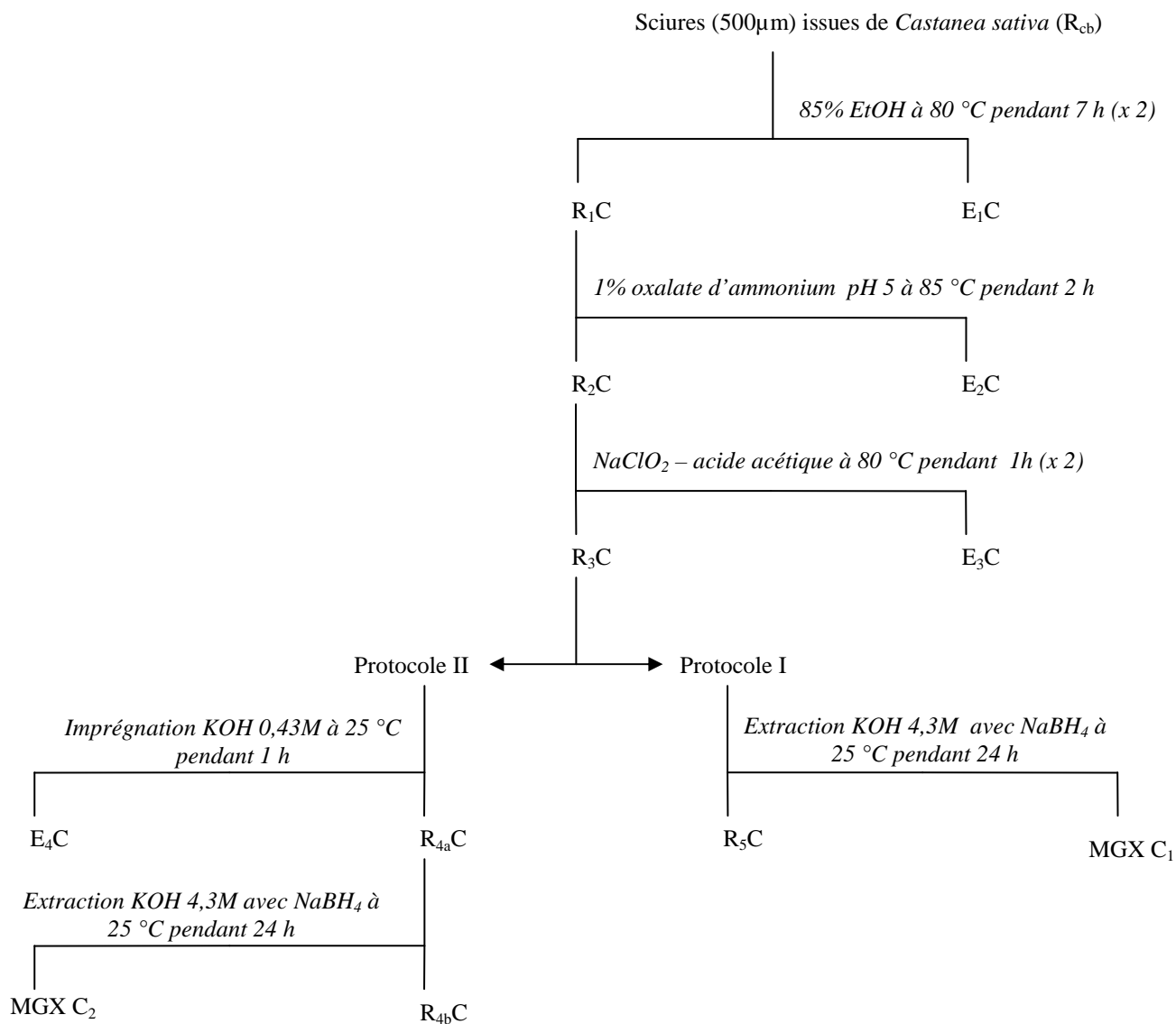


Figure 74 : Protocole d'extraction des xylanes de châtaignier MGX C₁ et MGX C₂

I.1.2. Extraction de xylanes d'argan

Pour l'extraction des xylanes d'argan, le protocole utilisé (Figure 75) est adapté de Habibi et coll.,⁴² et les premières étapes (extraction au Soxhlet, extraction des pectines et délignification) sont identiques au III.1.1.a.

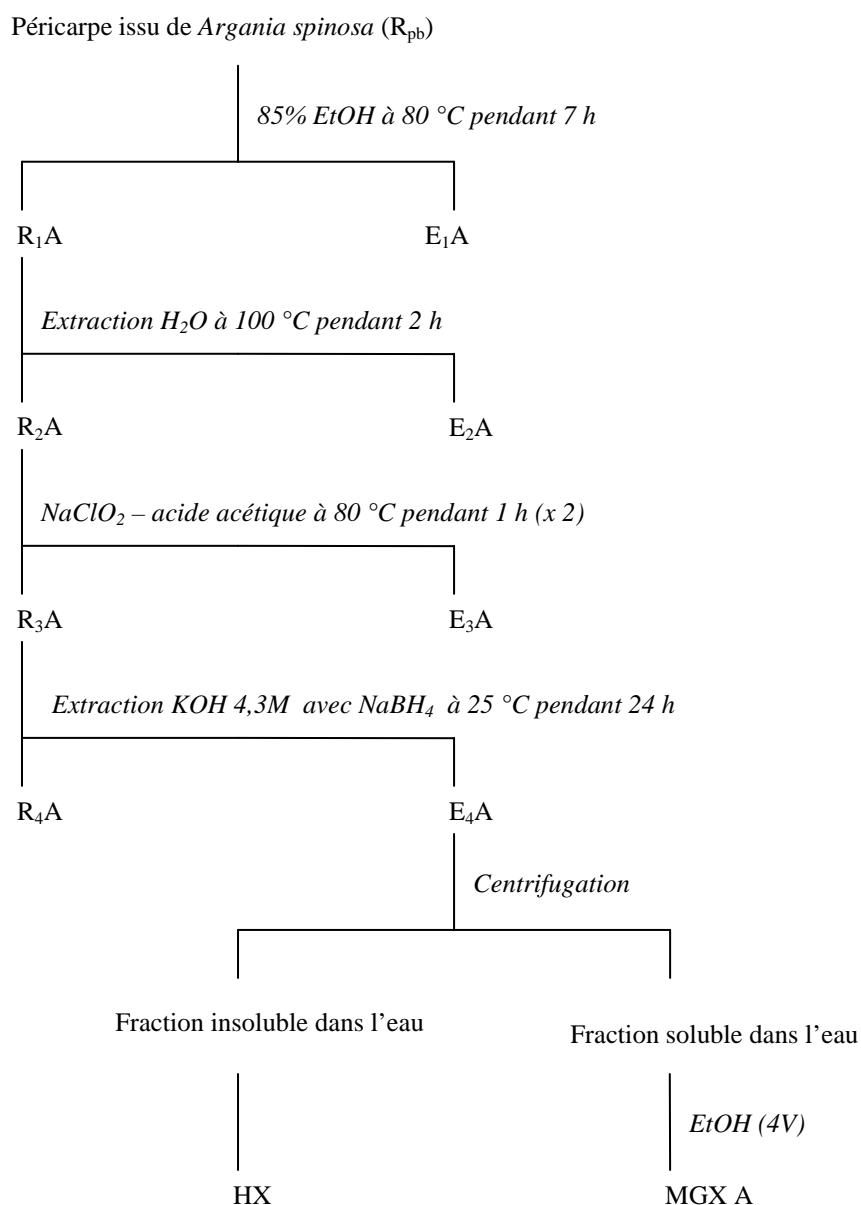


Figure 75 : Protocole d'extraction des xylanes d'argan MGX A et HX

I.2. Caractérisations chimiques

I.2.1. Composition centésimale

Les rendements massiques d'extraction ont été déterminés par dosages des oses totaux en spectroscopie UV-Visible. Les valeurs obtenues pour les deux extraits de châtaignier et pour les deux extraits d'argan ont été regroupées dans le Tableau 31.

Les xylanes ont été isolés selon les procédures décrites Figure 74 et Figure 75 avec des rendements massiques allant de 12% (MGX C₂) à 19% (MGX C₁ et MGX A).

Tableau 31 : Rendements massiques d'extraction en xylanes

Xylanes	Rendements d'extraction (% m/m)
MGX C ₁	19,2
MGX C ₂	12,3
MGX A	19,2
HX	18,1

I.2.2. Analyse Chromatographique en Phase Gazeuse

L'analyse de la composition monosaccharidique des extraits bruts de sciures et des résidus d'extraction a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés. Les résultats présentés dans le Tableau 32 et le Tableau 33 sont les compositions monosaccharidiques respectivement des extraits et résidus issus du châtaignier et du péricarpe d'argan. Le suivi de la composition des résidus ne montre pas d'évolution notable de la quantité en xylose lors des trois premières étapes (extractions des tannins et sucres circulants, pectines, et enfin lignines). Le résidu final obtenu après extraction alcaline révèle un très fort appauvrissement en xylose, preuve qu'ils ont été extraits puisque le pourcentage passe de plus de 90% à moins de 30%.

Tableau 32 : Compositions monosaccharidiques des différents extraits et résidus pour le châtaignier

	Composition monosaccharidique molaire (%)									
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-O-Me GlcA
R _{Cb}	2,7	0,0	1,7	69,0	4,0	4,0	4,2	6,3	0,9	7,2
R ₂ C	3,3	0,0	1,8	65,8	3,5	4,3	6,8	8,1	1,2	5,2
R ₃ C	2,3	0,0	1,2	66,6	3,6	4,0	3,8	5,3	1,2	12,1
R _{4a} C	1,8	0,0	0,7	58,2	8,2	14,4	3,4	1,2	0,8	11,4
R _{4b} C	0,9	0,0	0,6	7,6	12,5	71,2	3,6	1,5	1,0	1,2
R ₅ C	1,6	0,0	0,8	9,7	11,7	65,8	4,2	4,1	0,7	1,4
MGX C ₁	1,8	0,0	0,8	76,3	0,9	1,0	2,0	2,1	0,6	14,6
MGX C ₂	1,8	0,0	0,7	81,8	0,7	0,8	0,7	2,3	1,4	9,9

La fraction insoluble issue du péricarpe d'argan, (Tableau 33) avec près de 99% molaire de xylose présente la composition typique d'un homoxylane (HX). Avec des pourcentages molaires en xylose et en 4-O-MeGlcA allant de 76 à 86% et 13 à 14,6%

respectivement, les extraits KOH de péricarpe d'argan (MGX A) et de sciures de châtaignier (MGX C₁ et C₂) sont caractéristiques de polysaccharides de type 4-*O*-méthylglucuronoxylane.

Tableau 33 : Compositions monosaccharidiques des différents extraits et résidus pour l'argan

	Composition monosaccharidique molaire (%)									
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	GalA	GlcA	4-<i>O</i>-Me GlcA
R _{pb}	1,4	0,1	1,1	90,3	0,1	2,8	1,0	1,1	0,2	1,8
R ₁ A	1,5	0,0	1,0	94,0	1,0	0,8	0,7	1,0	0,0	0,0
R ₃ A	1,3	0,0	0,6	92,0	0,1	1,3	0,8	1,0	0,2	2,8
R ₄ A	0,0	0,0	0,0	27,9	0,0	72,1	0,0	0,0	0,0	0,0
HX	0,7	0,0	0,0	98,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
MGX A	0,9	0,0	0,0	85,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,3

On peut également noter que contrairement aux extraits de châtaignier, la contamination par les autres monosaccharides (rhamnose, glucose...) est quasi inexistante pour ceux d'argan.

I.2.3. Distribution en masse

Une autre caractéristique des xylanes est leur taille ainsi que la distribution en masse. Le degré de polymérisation, obtenu en faisant le rapport entre les quantités de oses totaux et d'extrémités réductrices estimées à partir de dosages colorimétriques spécifiques et correspond au nombre d'unités monosaccharidiques qui constituent le polymère. Les DP des MGX de châtaignier est inférieurs à ceux d'argan (Figure 76). Les valeurs obtenues pour le DP, égales au moins à 180, sont la caractéristique de polymères.

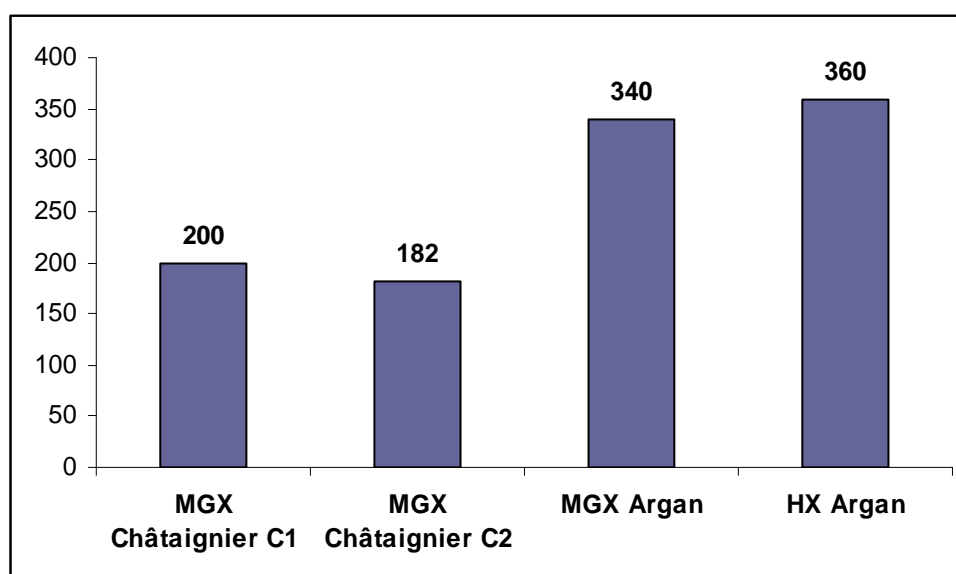


Figure 76 : Degrés de polymérisation des différents xylanes extraits

La polydispersité massique des extraits a par la suite été étudié par HPLC sur colonnes d'exclusion stérique. Les pics d'élution obtenus, relativement étroits, indiquent une composition homogène pour chaque extrait (Figure 77).

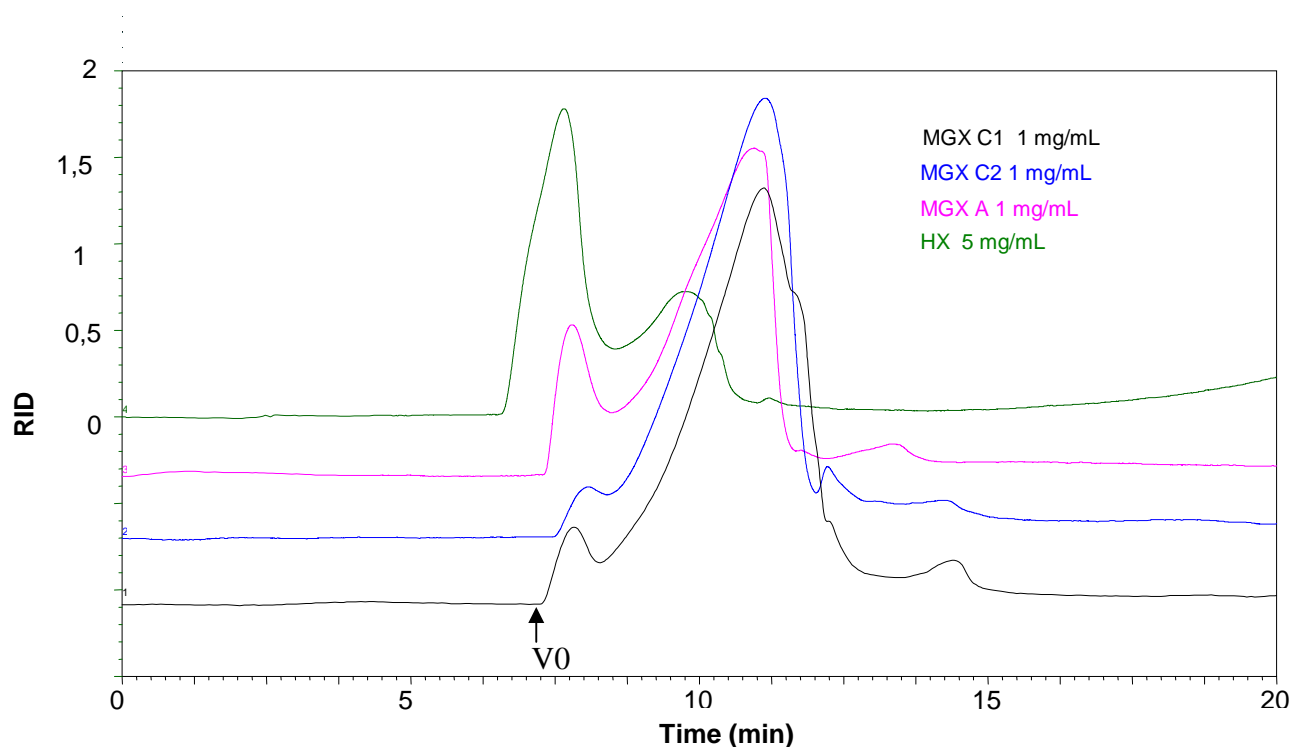


Figure 77 : Superposition des profils d'élution obtenus par analyse HPLC des MGXs et du HX. V_0 : Volume mort.

I.2.4. Etude de la distribution des acides uroniques

Ebringerová et *al.*,¹⁶⁵ ont suggéré que la variété structurale des xylanes peut affecter leurs propriétés biologiques. Une telle variabilité structurale peut trouver son origine dans le degré de polymérisation, la composition monosaccharidique (et spécialement le rapport xylose/4-*O*-MeGlcA) mais également la distribution régulière ou aléatoire des acides uroniques le long de la chaîne de xylose. Cette dernière considération reflète la structure macromoléculaire des chaînes qui peut affecter les interactions intramoléculaires des molécules de xylanes en solution, en créant notamment des réseaux ou des interactions avec des biopolymères à la surface des cellules des lymphocytes T par exemple.¹⁶⁵ Ceci nous a donc mené à étudier la distribution des unités MeGlcA dans les MGX C₁, MGX C₂ et MGX A par analyses de spectrométrie de masse MALDI après leur dégradation par autohydrolyse. L'autohydrolyse des polysaccharides, c'est-à-dire leur hydrolyse par leurs propres fonctions acides, est une méthode douce, sélective et facile à mettre en œuvre. Par simple chauffage à l'étuve et sous l'effet de l'acidité apportée par les fonctions carboxyliques protonées après

passage sur une résine, le polymère est hydrolysé. Les rendements d'autohydrolyse dépendent de la concentration en acides alors que les mécanismes chimiques dépendent de la distribution de ces acides et leur habilité à interagir avec les liaisons glycosidiques. Les fragments ainsi obtenus sont représentatifs de la structure du polymère de départ. Appliqués aux xylanes d'argan et de châtaignier, l'autohydrolyse conduit à leur dégradation en des oligosaccharides formés par de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique (GA) et des résidus xylose (X) dont les masses moléculaires sont observées en spectrométrie de masse MALDI et notées X_n , X_nGA , ou X_nGA_2 ($n = 1$ à 14) (Figure 78). Dans cette figure, les masses sont représentées sous formes de bâtonnets où la hauteur des différentes espèces correspond à l'abondance relative de la masse de chaque ion. Les profils de masses des glucurono-xylooligosaccharides obtenus à partir de MGX C₂ et MGX A sont presque similaires : une distribution gaussienne, centrée sur les DP 5 à 7 est observée. Deux séries majeures d'oligosaccharides sont observées dans les deux cas, correspondant aux formes non-substituée (X_n) et mono-substituée (X_nGA). La présence de nombreuses masses correspondant à une disubstitution (X_nGA_2) révèle une distribution irrégulière des acides uroniques, déjà suggérée par Jacob et *al*²³³. Dans le cas du xylane de châtaignier MGX C₁, les oligosaccharides les plus significatifs sont plus petits avec X_1 , X_2 , X_3 XGA et X_2GA les espèces les plus abondantes. La série disubstituée (XGA_2), peu présente, suggère dans ce cas une distribution plus régulière des acides uroniques le long de la chaîne de xylose.

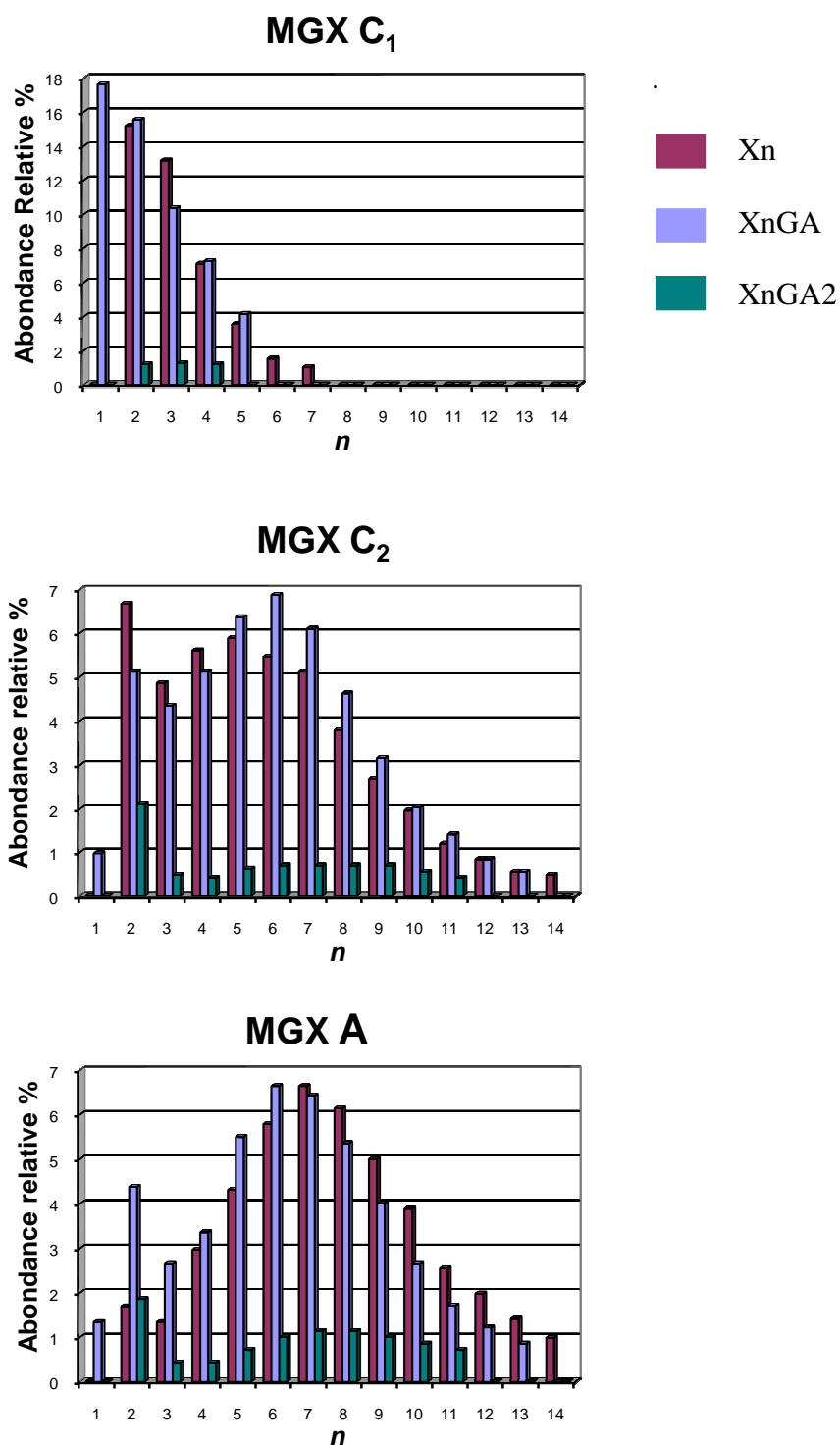


Figure 78 : Distribution des acides uroniques des xylanes de châtaignier et d'argan après autohydrolyse et analyses par spectrométrie de masse MALDI.

Nous nous sommes par la suite intéressés à la différence de structure déduite par les analyses MALDI des MGX C₁ et MGX C₂ obtenus après autohydrolyse de sciures de

châtaignier, respectivement non-imprégnée et imprégnées. De telles différences peuvent être expliquées par les méthodes d'extraction utilisées. Comme le suggèrent Dahlman *et al.*,²³⁴ les molécules de xylanes sont distribuées des couches les plus internes aux plus externes des pâtes à papier de feuillus et dont les caractéristiques structurales (masse molaire, teneur en acides uroniques) diffèrent selon leur localisation mais aussi selon le processus d'extraction utilisé (cuisson, blanchiment, délignification). A partir de nos résultats, il peut être supposé que l'étape d'imprégnation favorise l'extraction d'une seconde classe de MGX – *avec une distribution irrégulière des unités de 4-O-MeGlcA* – intimement associés à la paroi cellulaire végétale au travers de liaisons ester avec des composés phénoliques résiduels.²³⁵

I.2.5. Analyse structurale (RMN)

Les extraits polysaccharidiques ont également été caractérisés par RMN du proton à partir de leur forme native. Les spectres ont été enregistrés dans l'eau lourde (D₂O) sauf pour l'homoxylane d'argan insoluble dans l'eau et dont le spectre a été enregistré dans le DMSO-d₆.

Les spectres RMN ¹H des glucuronoxylanes (MGX C₁, C₂ et A) (Tableau 34) font apparaître des signaux intenses correspondant aux protons des unités xylose de la chaîne principale non substitués, ainsi que des signaux moins intenses attribués aux unités d'acide uronique et aux unités xylose qui les portent en position 2. L'intensité de ces signaux dépend du taux de substitution par l'acide uronique. Les doublets attribués aux protons anomériques des unités xylose, substituées (4,5 ppm) ou non (4,6 ppm), sont associés à une constante de couplage d'environ 7 Hz, caractéristique d'une liaison osidique de type β. La constante de couplage du doublet correspondant aux protons anomériques de l'acide uronique, à 5,3 ppm, est quant à elle de l'ordre de 2 Hz, ce qui caractérise une liaison osidique de type α. Il est par ailleurs possible d'observer sur les différents spectres ¹H des xylanes, un singulet fin vers 3,5 ppm, qui est à associer à l'existence de groupements méthyle portés, compte-tenu de l'intégration, par l'acide uronique. Cette dernière remarque confirme la présence de l'acide 4-O-méthylglucuronique. Celui-ci est fixé en position 2 du xylose, ce qui se traduit par un déblindage plus important du H₂ par rapport aux unités xylose non substituées.

Tableau 34 : Déplacements chimiques (ppm) en RMN ¹H pour les glucuronoxylanes de châtaignier et d'argan

	position	(1→4)-β-D-Xylp	(1→4)-β-D-Xylp-2-O-(4-O-Me-GlcpA)	4-O-Me-α-D-GlcpA
		¹ H	¹ H	¹ H
		δ (ppm) (J Hz)	δ (ppm) (J Hz)	δ (ppm) (J Hz)
MGX C ₁	1	4,48 d (7,5)	4,63 d (7,2)	5,29 d (2,0)
	2	3,29 t (8,2)	3,44 m	3,60 m
	3	3,55 t (9,0)	3,62 m	3,76 m
	4	3,79 m	3,81 m	3,22 t (9,7)
	5ax	4,10 dd (4,5 ; 11,5)	4,15 m	4,33 d (10,1)
	5eq	3,38 t (11,0)	3,42 m	
	6	-	-	-
	O-CH3	-	-	3,46 s
MGX C ₂	1	4,51 d (7,5)	4,66 d (7,0)	5,31 d (2,5)
	2	3,32 t (8,4)	3,57 m	3,61 m
	3	3,59 t (9,0)	3,68 m	3,77 m
	4	3,79 m	3,82 m	3,26 t (9,7)
	5ax	4,14 dd (4,4 ; 11,5)	4,15 m	4,36 d (10,0)
	5eq	3,41 t (11,0)	3,46 m	
	6	-	-	-
	O-CH3	-	-	3,50 s
MGX A	1	4,51 d (7,1)	4,66 d (6,4)	5,32 d (1,6)
	2	3,31 t (8,1)	3,57 m	3,61 m
	3	3,61 t (8,9)	3,67 m	3,77 m
	4	3,80 m	3,82 m	3,26 t (9,6)
	5ax	4,14 dd (4,6 ; 11,0)	4,15 m	4,36 d (9,9)
	5eq	3,41 t (11,0)	3,47 m	
	6	-	-	-
	O-CH3	-	-	3,50 s

^a Ax = axial, eq = equatorial, ³J_{H,H} en Hz

Pour les glucuronoxylanes, dont un spectre RMN type est représenté Figure 79, la RMN confirme les teneurs en MeGlcA données par la CPG (Tableau 36). Le ratio xyl/MeGlcA est calculé en faisant le rapport entre l'intégration des pics correspondant aux protons anomériques du xylose non substitué et substitué par du MeGlcA (en vert sur la figure) et l'intégration du pic correspondant au proton anomérique du MeGlcA (en rouge sur la figure).

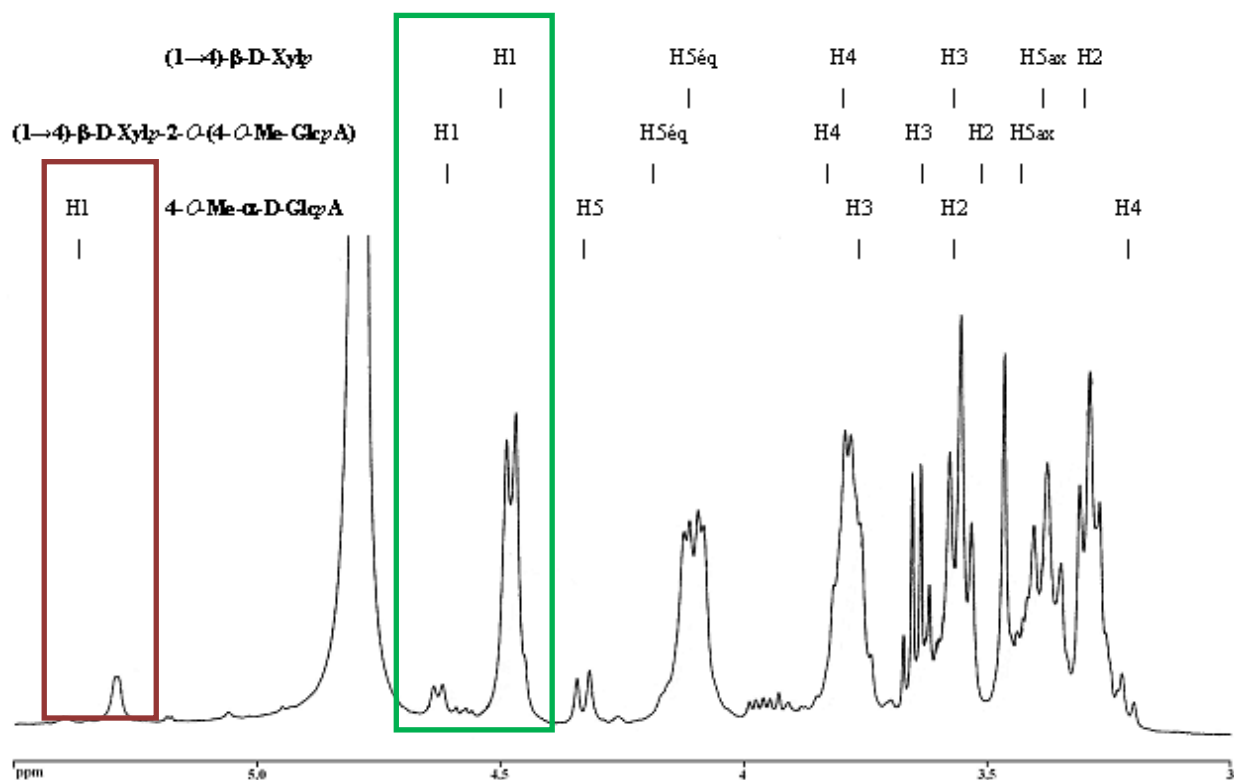


Figure 79 : Spectre RMN ^1H d'un 4-*O*-méthylglucuronoxylane dans le D_2O avec attribution des signaux

Le spectre RMN du proton de l'extrait HX présente 6 signaux à des δ 4,28 (H-1), 3,05 (H-2), 3,30 (H-3), 3,50 (H-4), 3,17 (H-5 éq) et 3,88 (H-5 ax) (Tableau 35) correspondant aux résidus 1→4 β -D-Xyl et est conforme aux données publiées par Habibi et Vignon⁴² pour la structure d'un homoxylane.

Tableau 35 : Déplacements chimiques (ppm) en RMN ^1H pour l'homoxylane d'argan

position	(1→4)- β -D-Xylp
	^1H
	δ (ppm)
1	4,27
2	3,05
3	3,30
4	3,50
5ax	3,88
5eq	3,17

^a Ax = axial, eq = equatorial, $^3J_{\text{H,H}}$ en Hz.

I.2.6. Conclusion sur les caractérisations chimiques

Les caractéristiques chimiques et structurales établies pour les xylanes sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 36 : Caractéristiques chimiques des différents xylanes extraits

	Ratio Xyl/MeGlcA (¹ H NMR)	Distribution des acides	DP
Glucuronoxylane de châtaignier extrait avec imprégnation (MGX C ₁)	5,9/1	Régulière	200
Glucuronoxylane de châtaignier extrait sans imprégnation (MGX C ₂)	6,1/1	Aléatoire	182
Glucuronoxylane d'argan (MGX A)	4,8/1	Aléatoire	340
Homoxylane d'argan (HX)	/	/	360

Chapitre II. Evaluation des propriétés biologiques des extraits en oncologie cellulaire et moléculaire

Une évaluation biologique de ces xylanes extraits vis-à-vis de cellules cancéreuses à été réalisée au Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Paris XII sous la direction du Professeur Michel Kraemer.

La lignée tumorale A431 d'un carcinome épidermoïde vulvaire humain se caractérise par un grand nombre de récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor). Ce facteur de croissance épidermique est une hormone protéique qui lors de sa fixation sur ses récepteurs provoque une activité mitotique, c'est-à-dire, une division cellulaire très rapide au sein des tissus épithéliaux vulvaires. Par ailleurs, les cellules de cette lignée sécrètent une quantité importante de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor = Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire), protéine qui est émise par la tumeur primitive pour assurer sa vascularisation à partir de vaisseaux sanguins déjà existants. Ce phénomène de vascularisation appelé angiogenèse permet à certaines cellules cancéreuses de la tumeur primitive de migrer via le flux sanguin vers d'autres organes. Ces cellules cancéreuses vont alors envahir un nouvel organe et former une nouvelle tumeur appelée métastase. La lignée tumorale A431 représente donc un bon modèle pour évaluer l'effet biologique de molécules de synthèse, ou, comme c'est le cas dans ce travail, de substances naturelles.

Nous avons testé l'effet de ces xylanes sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales. La dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases ayant un rôle essentiel dans l'invasion et la dissémination d'une tumeur, nous avons également étudié les effets des xylanes sur l'expression des métalloprotéases.

II.1. Effets sur la prolifération des cellules A431

L'étude des effets des xylanes sur la multiplication des cellules tumorales A431 a été réalisée en traitant ces cellules pendant 72 heures avec des doses croissantes de produit. Des concentrations comprises entre 0,7 μM à 50 μM ont été utilisées afin de déterminer la concentration induisant 50 % d'inhibition (IC_{50}). L'homoxylane d'argan ne présente qu'une faible activité cytotoxique (19%) et uniquement pour des concentrations élevées. Le glucuronoxylane d'argan MGX A ne présente aucun effet dose et n'inhibe que faiblement la prolifération cellulaire (29%). Le xylane de châtaignier extrait avec prétraitement (MGX C₂) inhibe la prolifération des cellules A431 de façon dose dépendante avec une inhibition de la

prolifération cellulaire de 45% pour une concentration de 50 μM (45%). Seul le xylane de châtaignier non imprégné (MGX C₁) atteint l'IC₅₀ pour une concentration de 50 μM .

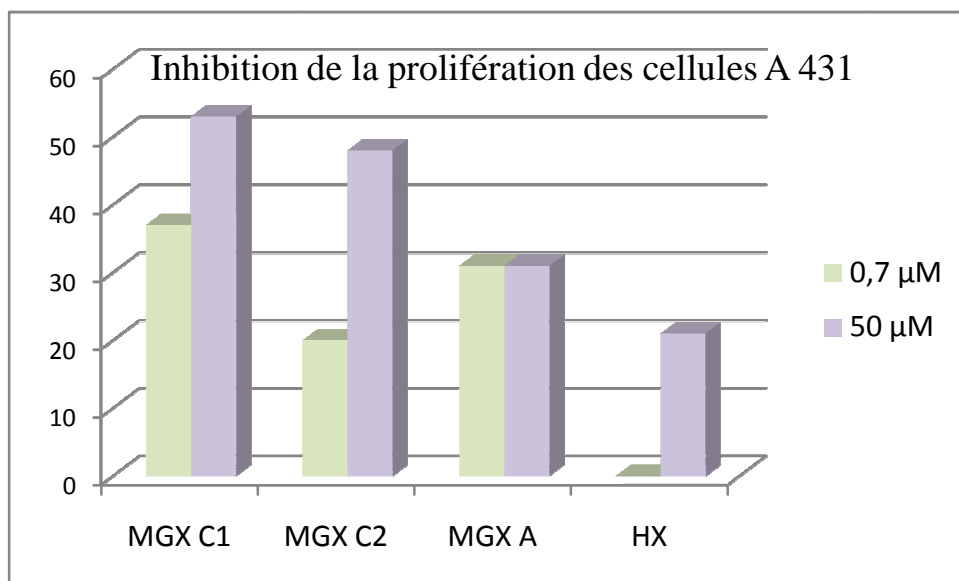


Figure 80 : Corrélation de la cytotoxicité des xylanes sur la prolifération des cellules A 431

Compte tenu des résultats préliminaires, nous avons choisi de poursuivre les tests biologiques avec les xylanes MGX C₁ et C₂ en étudiant leur effet sur la migration et l'invasion des cellules tumorales A431.

II.2. Effets sur la migration des cellules A 431

L'étude de la migration des cellules tumorales A431 s'effectue dans des chambres de culture appelées chambres de Boyden. Celles-ci sont composées d'inserts constitués d'une membrane poreuse et sont placés dans une plaque de 24 puits (Figure 84 de la partie expérimentale). Pour la migration, la membrane poreuse est recouverte de fibronectine et les cellules A431 sont déposées sur cette membrane puis incubées pendant 24 heures. La présence d'une substance stimulante comme le Sérum de veau foetal (SVF) dans la partie inférieure de la chambre de Boyden conduit les cellules A431 à migrer à travers les pores vers la surface inférieure de la membrane. On ajoute alors le xylane à une certaine concentration dans l'eau. Après 24 heures, les cellules ayant migré à travers la membrane sont colorées puis dénombrées au microscope.

En absence de xylane, la migration est totale (100 % de migration). Par contre elle diminue significativement de 68 % et de 99 % en présence respectivement de 5 μM et de 50 μM de MGX C₁ (Figure 81). Dans le cas du MGX C₂, la migration est réduite de 50 % en présence de 50 μM et de 55 % en présence de 100 μM de polysaccharide.

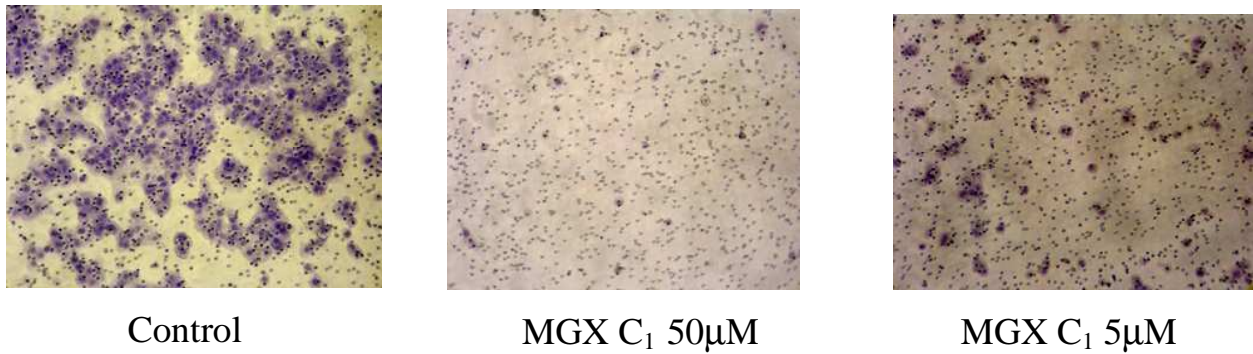


Figure 81 : Effets du MGX C₁ sur la migration des cellules A 431. Agrandissement: x 200.

II.3. Effets sur l'invasion des cellules A 431

Après les tests de migration, nous avons procédé à des tests d'invasion. Dans ce cas, la membrane est recouverte de matrigel, qui mime la matrice extracellulaire. La présence de sérum de veau fœtal dans la partie inférieure de la chambre de Boyden conduit les cellules tumorales A431 à digérer le matrigel et à traverser la membrane poreuse vers la surface inférieure de celle-ci. Ce test permet de déterminer si les xylanes inhibent les cellules tumorales A431 les empêchant ainsi de digérer la matrice. En absence de xylane, l'invasion est de 100 %, les cellules cancéreuses ont digéré le matrigel et traversé la membrane poreuse. En présence de MGX C₁, les capacités d'invasion des cellules tumorales A431 ne sont pas affectées par des concentrations en MGX C₁ de 5 µM et abaissées de 55% pour des concentrations de 50 µM (Figure 82). De meilleurs résultats sont obtenus dans le cas de MGX C₂. L'invasion diminue de 72 % en présence de 5 et de 50 µM de polysaccharide.

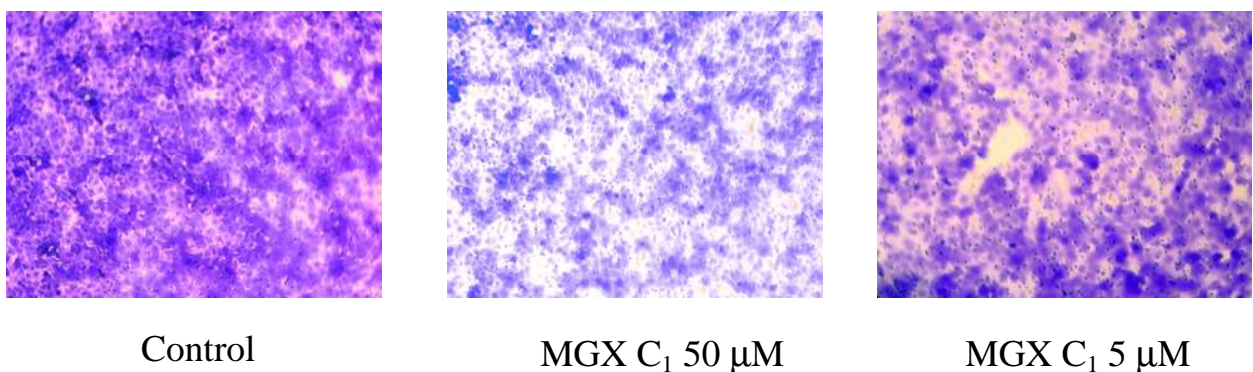


Figure 82 : Effets du MGX C₁ sur l'invasion des cellules A 431. Agrandissement: x 200.

II.4. Effets sur l'expression des métalloprotéases

La migration des cellules a lieu durant l'angiogénèse et exige une dégradation de la matrice cellulaire par les protéases telles que la matrice métalloprotéase (MMP). Une étude permettant de déterminer quelle métalloprotéase dégrade la matrice a consisté à réaliser une zymographie sur les deux composés les plus intéressants. Nous avons utilisé comme témoins la prométalloprotéase 9, la métalloprotéase 9 et la prométalloprotéase 2.

Dans le cas du MGX C₁, l'analyse quantitative indique qu'en présence de 12,5 µM de polysaccharide, la concentration des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2 sécrétées n'est pas significative après 24 ou 48 heures de traitement. Après 72 heures, l'expression des MMP9 est totalement abolie, tandis que l'expression des ProMMP9 et des ProMMP2 diminue de 50 et 56%, respectivement (Figure 83).

Dans le cas du MGX C₂, on observe qu'après 72 heures de traitement avec 12,5 µM de polysaccharide, l'expression des MMP9 et ProMMP2 diminue respectivement de 10 % et 39%. L'expression des ProMMP2 n'est pas affectée même après 72 heures.

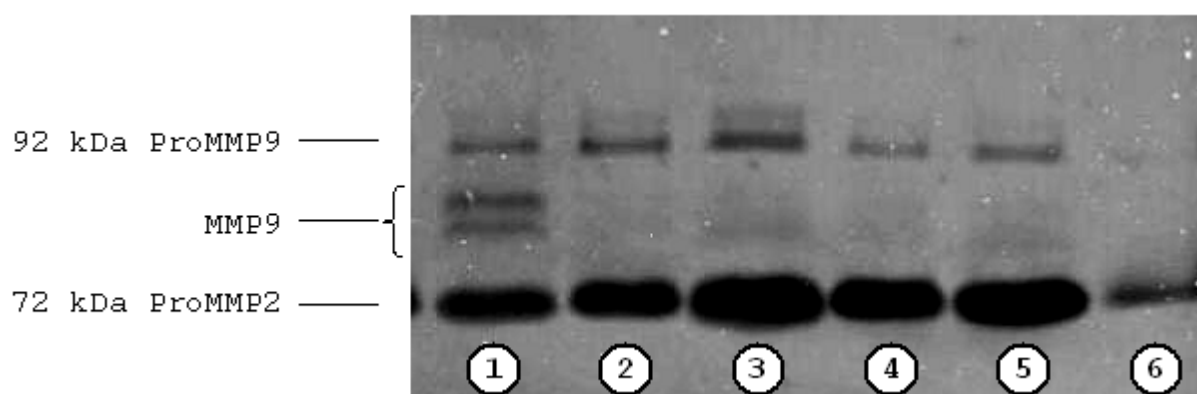


Figure 83 : Effets du MGX C₁ sur la sécrétion par les cellules A 431 des ProMMP9, MMP9 et ProMMP2. Les milieux de culture non traités (lignes 1, 3, et 5) ou les cultures cellulaires traitées avec 12.5 µM MGX C₁ (lignes 2, 4, et 6) sont collectés après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation. Ligne (1), cellules non traitées pendant 24h; Ligne (2), cellules traitées pendant 24 h; Ligne (3), cellules non traitées pendant 48 h; Ligne (4), cellules traitées pendant 48 h; Ligne (5), cellules non traitées pendant 72 h; Ligne (6), cellules traitées pendant 72 h.

L'ensemble des données concernant les propriétés biologiques est regroupé dans le tableau suivant :

Tableau 37 : Effets des xylanes de châtaignier et d'argan sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules A431 et sur l'expression des MMP9, ProMMP2 et des ProMMP9

Xylane	Inhibition de la prolifération (%)		Inhibition de la migration (%)		Inhibition de l'invasion (%)		Zymographie à 12,5 µM		
	0.7 µM	50 µM	5 µM	50 µM	5 µM	50 µM	Inhibition des MMP9 (%)	Inhibition des ProMMP2 (%)	Inhibition des ProMMP9 (%)
MGX C ₁	35±1	51±2	68±2	99±2	0	55±2	100	56	50
MGX C ₂	18±2	45±3	50±4	55±2	72±6	72±6	10	39	0
MGX A	29±1	29±1	nd ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd
HX	0	19±2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^a nd: non déterminé.

II.5. Corrélation entre les effets biologiques et la structure des molécules

L'activité biologique des polysaccharides est souvent corrélée avec leur acidité, même si cette caractéristique n'est pas absolument déterminante. D'un autre côté, une structure plus complexe (liaisons glycosidiques principales, degré de branchement et de ramification, DP) semble avoir une influence positive sur leurs capacités à déclencher leur activité biologique. La comparaison des réponses biologiques obtenues pour le HX neutre et les MGX acides révèlent une relation intéressante entre le DP, le rapport Xyl/MeGA, la distribution des MeGA le long du squelette de xylose et les propriétés cytotoxiques envers les cellules A431. Le HX de péricarpe d'argan caractérisé par un DP fort et l'absence de substituants MeGA, est dépourvu d'activité cytotoxique envers les cellules A431. C'est aussi le cas pour sa forme acide (MGX A). Ainsi, la présence de MeGA ne peut être considéré comme un facteur déterminant. Le cas des MGX C₁ et MGX C₂ extraits de sciures de châtaignier est très intéressant. Avec de DP et des ratios Xyl/MeGA similaires, ces extraits ne présentent pas le même niveau d'activité cytotoxique. L'IC₅₀ n'est obtenu que dans le cas du MGX C₁ non imprégné de sciures de châtaignier. Ce dernier est le seul à présenter une distribution régulière de ses acides uroniques le long de la chaîne de xylose de la molécule. Les compositions monosaccharidiques obtenues pour le MGX A de péricarpe d'argan et le MGX C₂ imprégné de sciures de châtaignier ainsi que leur distribution des MeGA sur le squelette de xylose de la molécule sont presque similaires. Néanmoins, le MGX A, alors qu'il montre une activité cytotoxique envers les cellules A 431 plus faible, est aussi caractérisé par une valeur de DP

plus élevée. Dans ce cas, les valeurs de DP fortes semblent avoir une influence négative sur leur activité biologique.

A partir des données obtenues dans cette étude, il est possible d'affirmer que la distribution des acides uroniques mais aussi le degré de polymérisation sont des facteurs structuraux clés pour l'activité biologique des xylanes sur les cellules A431. Le degré de polymérisation peut influencer la structure tridimensionnelle des xylanes et plus particulièrement leur organisation hélicoïdale. Il est maintenant accepté que non seulement la structure primaire mais aussi la structure tridimensionnelle de la molécule entrent en jeu dans l'expression des propriétés biologiques. Afin de comprendre cette relation structure-fonction, nous avons initié une étude sur la structure tridimensionnelle, dans laquelle les xylanes apparaissent comme des macromolécules très organisées, et ce de façon hélicoïdale.¹³ L'étude des effets de DP élevés ainsi que la variabilité du taux de substitution en MeGA sur la conformation hélicoïdale des xylanes constituent les prochaines étapes qui nous permettront de mieux comprendre les propriétés biologiques des glucuronoxylanes de bois de châtaignier.

CONCLUSION GENERALE

La fraction polysaccharidique non cellulosique des sciures de bois, co-produit abondant de la filière forestière, peut-elle être mobilisée et dans quelle(s) condition(s) ? La question porte à la fois sur l'organisation structurale des parois secondaires des cellules végétales et sur les méthodologies physique, chimique et biologique - *compatibles avec la notion de Chimie verte* - qui peuvent être mises en œuvre afin d'en extraire sélectivement les constituants natifs. Dans notre cas, il s'agissait de développer de nouvelles approches d'extraction du 4-*O*-méthylglucuronoxylane (MGX). Cette hémicellulose est typique de la famille des xylanes et très répandue dans les bois durs issus de feuillus tel le châtaignier utilisé ici comme modèle. L'organisation tridimensionnelle de la paroi cellulaire végétale repose sur des interactions moléculaires multiples tant par le nombre que par la nature des liaisons chimiques. Le taux de lignification élevé des parois secondaires - *quantitativement majoritaire dans le bois* - s'oppose par ailleurs à l'extractabilité des hémicelluloses dans l'eau et impose donc la mise en œuvre d'une délignification préalable des sciures.

Dans une première partie, plusieurs stratégies de délignification ont été développées, adaptées et testées sur les sciures de châtaignier. Parmi les méthodologies existantes, l'approche enzymatique qui recourt à l'utilisation des laccases, si elle apparaît comme conceptuellement très attrayante, s'est avérée techniquement décevante. Utilisées dans l'eau, à des concentrations très faibles, les enzymes sont pourtant capables de catalyser un grand nombre de réactions chimiques. Toutefois, s'agissant d'une réaction en phase hétérogène, une telle stratégie se heurte à la complexité des sciures qui est le substrat lignocellulosique de la réaction. En revanche, la délignification chimique développée à partir des phtalocyanines ou les porphyrines de fer en milieu peroxydé est particulièrement attractive. Similaire à l'approche enzymatique du point de vue de la chimie réactionnelle, cette approche n'en supporte pas les mêmes limites. Nos résultats démontrent qu'elle est parfaitement adaptée à des substrats lignocellulosiques bruts telles que les sciures de bois.

Sur le plan des perspectives, et en utilisant l'approche du plan d'expérience, cette méthodologie doit pouvoir bénéficier d'essais d'optimisation qui feront varier la nature des catalyseurs tout comme les quantités d'eau oxygénée introduites dans le milieu réactionnel. Dans un autre registre d'idée, l'apparition de fonctions aldéhydiques réputées très réactives au cours de réaction de délignification conduit à la fonctionnalisation des glucuronoxylanes recueillis par la suite dans l'eau. Un tel résultat doit pouvoir profiter au développement de nouvelles stratégies de valorisation chimique des polysaccharides - *en phase homogène ou hétérogène* - en utilisant l'eau comme unique solvant de la réaction.

La deuxième partie de ce travail est consacrée aux propriétés biologiques des glucuronoxylanes de châtaignier et plus précisément à leurs propriétés cytotoxiques envers la lignée de carcinome épidermoïde vulvaire humain (cellule A431). Nous avons ainsi caractérisé les liens étroits qui existent entre la structure chimique des xylanes et leurs propriétés biologiques. Si l'acidité de la molécule apparaît comme un prérequis indispensable à l'expression de ces propriétés, nos résultats révèlent que la distribution de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique le long de la chaîne principale tout comme le degré de polymérisation de la molécule apparaissent comme des déterminants supplémentaires. Dépendantes de la structure de la molécule, les propriétés sont par ailleurs et probablement intimement liées à sa conformation et donc à sa capacité à interagir avec les systèmes biologiques. Un tel constat oriente les perspectives de poursuite de cette étude vers l'établissement de l'architecture tridimensionnelle du 4-*O*-méthylglucuronoxylane de châtaignier par des approches de modélisation moléculaire. Des données sont déjà disponibles mais doivent être complétées tout d'abord par l'étude de l'impact de la distribution de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique sur l'organisation tridimensionnelle du glucuronoxylane puis en direction de l'identification du plus petit motif glucidique actif.

Pour conclure, l'étude présentée dans ce mémoire, en constituant une illustration aboutie, affirme la complémentarité qui existe entre la structure des phytopolysaccharides et l'expression de leurs propriétés sur un système biologique déterminé. Situé à l'interface des disciplines chimiques et biologiques propres aux activités du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, ce travail s'inscrit par ailleurs dans une démarche de valorisation non alimentaire des co-produits agricole et forestier. Il peut constituer la base de travaux ultérieurs académiques et/ou finalisés consacrés aux stratégies éco-compatibles de délignification de la matière lignocellulosique.

Quatrième partie : Partie Expérimentale

I.1. Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et des solvants utilisés est présentée dans le tableau suivant et il convient de préciser qu'ils sont utilisés sans purification supplémentaire :

Réactifs	CAS [Reg. Num.]	Pureté	Fournisseur
Acétate de manganèse	[638-38-0]	98%	VWR
Acétate de sodium	[127-09-3]	99%	Acros
Acide acétique	[64-19-7]	99-100 %	Acros
Acide chlorhydrique	[7647-01-1]	37%	Fisher Labosi
Acide formique	[64-18-6]	99-100%	VWR
Acide gallique	[5995-86-8]	98%	Aldrich
Acide glucuronique	[6556-12-3]	97+%	Fluka
Acide 4-sulfophthalique	[89-08-7]	50%	Acros
Acide sulfurique	[7664-93-9]	95-98 %	VWR
Ammoniaque	[1336-21-6]	28%	VWR
Anhydride acétique	[108-24-7]	99%	Aldrich
BSTFA	[25561-30-2]	98%	Alltech
Butanol	[71-36-3]	99,5%	Acros
Chlorite de sodium	[7758-19-2]	80%	Acros
Chloroforme	[67-66-3]	99,95%	SDS
Chlorure d'acétyle	[75-36-5]	98%	Acros
Chlorure d'aluminium	[7446-70-0]	99%	VWR
Chlorure d'ammonium	[12125-02-9]	p.a	Acros
Chlorure de fer	[13478-10-9]	98%	Alfa Aesar
Chlorure de nickel	[7791-20-0]	98%	Sigma
Chlorure de zinc	[7646-85-7]	98%	Acros
D ₂ O	[7789-20-8]	100%	SDS
Dioxanne	[123-91-1]	100%	SDS
DMSO	[67-68-5]	99,8%	Acros
Ethanol	[64-17-5]	99,99%	Carlos Erba
Ethylène diamine	[107-15-3]	99%	Acros
Heptane	[142-82-5]	99%	Sigma
Hydrogénophosphate de potassium	[7778-77-0]	99%	Sigma
Hydrogénophosphate de sodium	[10039-32-4]	98%	VWR
HOBt	[2592-95-2]	95%	Aldrich
Hydroxyde de potassium	[1310-58-3]	p.a	Acros
Hydroxyde de sodium	[1310-73-2]	p.a	Acros
Iodure de potassium	[7681-11-0]	99%	Acros
Laccase	[80498-15-3]	1,1U/mg	Fluka
MeOH	[67-56-1]	99,8%	Acros

Méso-innositol	[87-89-8]	98%	Acros
MHDP	[580-51-8]	90%	Aldrich
Molybdate d'ammonium	[12054-85-2]	p.a	Sigma
NaBH ₄	[16940-66-2]	98%	Acros
NaOH	[1310-73-2]	p.a.	Acros
NH ₄ PF ₆	[16941-11-0]	99,5%	Alfa Aesar
Oxalate d'ammonium	[6009-70-7]	98%	VWR
PABAH	[5351-23-5]	97%	Fluka
Péroxyde d'hydrogène	[7722-84-1]	35%	Acros
Phénol	[108-95-2]	99%	Acros
Pyridine	[110-86-1]	99,8%	Aldrich
Rose de Bangale	[632-69-9]	90,0%	Sigma
Sulfate de fer	[7782-63-0]	p.a	Acros
Sulfate de manganèse	[10034-96-5]	p.a	VWR
Tétraborate de sodium	[1303-96-4]	99%	Sigma
THF	[109-99-9]	99,5%	Carlos Erba
Urée	[57-13-6]	99%	Acros
Xylose	[58-86-6]	99%	Sigma

II.1. Analyse chimique

II.1.1. Analyses spectroscopiques

II.1.1.a. 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 cm⁻¹. Les échantillons sont déposés sur pastilles de KBr. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm⁻¹.

II.1.1.b. RMN

Les spectres de RMN ont été réalisés au service commun de RMN de l'université de Limoges sur un appareil Bruker DPX-400 à une fréquence de 400,13 MHz pour le proton et de 100,62 MHz pour le carbone 13. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm ; le tétraméthylsilane étant pris comme référence interne ($\delta = 0$ ppm). Les constantes de couplages J sont exprimées en Hz. Les abréviations retenues sont : s (singulet), sél. (singulet élargi), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), dt (double triplet), tap (triplet apparent), dtap (double triplet apparent), ddd (double double doublet), m (multiplet).

II.1.1.c. Ultraviolet-Visible

Les densités optiques des dosages colorimétriques sont mesurées sur un spectrophotomètre UV-visible à double faisceau Shimadzu UV-1700 series. Elles sont effectuées dans des cellules en polystyrène (PS) de 1 cm de trajet optique. Les spectres des phtalocyanines et des porphyrines synthétisées ont été réalisés sur un spectrophotomètre UV-visible Perkin Elmer Lambda 25 dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet optique à une concentration voisine de 10^{-5} - 10^{-6} M dans l'eau. Les longueurs d'onde correspondantes aux absorbances maximales sont exprimées en nm et les coefficients d'absorption molaire ϵ , en $\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$.

II.1.1.d. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les spectres de masse MALDI-TOF des oligosaccharides ont été réalisés à la plateforme de spectrométrie de masse de l'INRA de Nantes (UR 1268 BIA). Les échantillons hydrolysés ont été dissous dans l'eau à une concentration de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre MALDI-LR (Waters, Manchester, UK) dont le laser émet dans l'UV à 337 nm (fréquence 5 HZ) pour dessorber et ioniser un mélange de matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique. La matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), dissoute à 5 mg.mL^{-1} dans 0,1% de TFA.

Les spectres de masse MALDI-TOF des porphyrines et des phtalocyanines ont été effectués au Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique de l'Université de Paris VI par le Dr. Sandra Alves par désorption laser avec un spectromètre à temps de vol Voyager Elite.

II.1.2. Chromatographie

II.1.2.a. Chromatographie sur couche mince

Des plaques de silice Kieselgel 60F₂₅₄ 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 10 minutes à l'étuve à 100°C pour être révélées.

II.1.2.b. Chromatographie en phase gazeuse

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, $\varnothing_{\text{int}} = 0,32$ 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.

II.1.2.c. Chromatographie basse pression sur Biogel P₂

Les séparations par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne en basse pression, ont été réalisées sur colonnes de Biogel P₂. Les colonnes sont équilibrées dans le système d'élution. L'élution se fait grâce à une pompe péristaltique dont le débit est fixé à 10 mL.h⁻¹ et les différentes fractions sont recueillies à l'aide d'un collecteur (Redifrac ; Pharmacia-Biotech.).

II.1.2.d. Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

Les profils HPLC des masses moléculaires sont obtenus à l'aide d'un système HPLC (Dionex P-680), équipé de deux colonnes d'exclusion stérique PL-aquagel-OH mixed 8 μm (Polymers Laboratories-300*7,5mm). L'équilibrage se fait dans l'eau ultrapure (Millipore) à un débit de 1 mL.min⁻¹. Ce système est complété par un détecteur à indice de réfraction Shodex (RI-101).

III.1. Extraction des xylanes

A. Xylanes de sciures de châtaignier

III.1.1. Préparation de l'holocellulose

III.1.1.a. Matériel biologique

Les sciures utilisées pour nos expérimentations sont des sciures de châtaignier, arbre appartenant à la catégorie des bois durs. Elles nous ont été fournies par l'établissement Mazières de la Chapelle Montbrandeix (87). Ces sciures ont été séchées à l'étuve ventilée durant trois jours à la température de 50°C. Elles ont par la suite été broyées puis tamisées (à 200 et 500 μm) afin de faciliter l'extractibilité des hémicelluloses qu'elles renferment.

III.1.1.b. Extraction à l'éthanol

Cette première étape permet d'éliminer les sucres circulants et les tannins solubles. L'extraction a été réalisée à partir de 45 g de sciures de châtaignier préalablement tamisées à 500 μm dans 900 mL d'éthanol à 80% à 80°C pendant 7 h. Le résidu obtenu (R_{Sox}) est alors refroidi à température ambiante avant d'être mis à sécher une nuit à l'étuve ventilée à 40°C.

III.1.1.c. Extraction des pectines

R_{Sox} est dépectinisé dans 1,6 L d'oxalate d'ammonium à 1% à 80°C pendant 2 h. La solution est refroidie à température ambiante avant d'être filtrée sur verre fritté de porosité 3. Le résidu $R_{\text{Dép}}$ est, quant à lui, rincé à l'eau distillée.

III.1.1.d. Délignification chimique par le chlorite de sodium

De façon à extraire les hémicelluloses plus facilement, la délignification de $R_{\text{Dép}}$ est essentielle. Elle est réalisée à partir de $R_{\text{Dép}}$ placé dans 1,6 L d'une solution acide de chlorite de sodium (0,47 g/g de sciures brutes + 0,2 mL l'acide acétique glacial par g de sciures brutes). La solution est portée à 80°C pendant 1h, refroidie à température ambiante et filtrée sur verre fritté de porosité 3. Le résidu est rincé à l'eau distillée jusqu'à neutralisation du filtrat. Pour une meilleure délignification et donc une plus grande pureté de l'holocellulose (R_{Holo}), le protocole est renouvelé.

III.1.1.e. Délignification enzymatique par le système laccase/HOBt/O₂

Cette étape est réalisée sur 2 g de sciures ou d'holocellulose et placées dans 100 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium à 50 mM ajustée à pH 5,5 (par de l'acide acétique glacial dilué), en présence de la laccase et du médiateur HOBt à 2 % (40 mg). La réaction se déroule sous atmosphère de dioxygène sous agitation magnétique, et à des temps (1 à 4 h) et des températures (25°C à 45°C) variables. A la fin de la réaction, l'enzyme est inactivée par chauffage à 100°C pendant quelques dizaines de secondes et la solution est filtrée.

III.1.1.f. Délignification par des phtalocyanines et des porphyrines sulfonées et métallées par le fer ou le manganèse

Dans 25 mL d'eau distillée sont placés 250 mg de sciures dépectinées ou d'holocellulose auxquels on ajoute la phtalocyanine ou la porphyrine (dont la quantité varie entre 4,8 μmol et 10,6 μmol) ainsi que 1 mL d' H_2O_2 à 35% par tranche de 24 h de réaction. La réaction est placée sous agitation magnétique pendant des temps variables (de 1 à 100 h) et des températures variables (20 et 40°C). A la fin de la réaction, la solution est filtrée ; le résidu est ensuite rincé à l'eau distillé puis lyophilisé.

III.1.1.g. Délignification photochimique en milieu oxygéné

Dans 25 mL d'eau distillée sont placés 250 mg de sciures dépectinées ou d'holocellulose auxquels on ajoute 14 mg de photosensibilisateur (qui peuvent être la TPPS, le Rose de Bengale ou des phtalocyanines sulfonées de zinc, aluminium ou nickel). La réaction est placée sous agitation magnétique et sous irradiation lumineuse de deux ampoules de 100 watts pendant 8 jours à température ambiante. A la fin de la réaction, la solution est filtrée, le résidu est ensuite rincé à l'eau distillé puis lyophilisé.

III.1.2. Extraction des xylanes

III.1.2.a. Extraction alcaline

Un gramme d'holocellulose est ajouté à 50 mL d'une solution de KOH 4,3 M à 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NaBH_4 (agent réducteur). L'enceinte d'extraction est saturée à l'argon pour prévenir tout risque de dégradation du produit, puis placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24 h. A la fin de la réaction, la solution est filtrée et le résidu est rincé à l'eau distillée puis lyophilisé. Le pH du filtrat est ajusté à 5,5 par ajout d'acide acétique glacial. Il est ensuite placé en dialyse 48h dans une membrane Spectrapor dont le seuil de coupure est compris entre 6000 et 8000 Da. Après concentration, les hémicelluloses sont précipitées par 3 volumes d'éthanol puis centrifugées pendant 20 minutes à 1860 g (2000 rpm). Le surnageant éthanolique est éliminé et le culot est repris dans de l'eau distillée.

III.1.2.b. Extraction aqueuse des xylanes

L'extraction se fait toujours dans de l'eau distillée et à raison de 1g de matière pour 50 mL de solvant. La réaction a lieu à reflux (100°C) sous agitation magnétique pendant une

heure. Après refroidissement de la solution, celle-ci est filtrée sur papier filtre et le résidu est lyophilisé.

III.1.2.c. Extraction des xylanes aux micro-ondes

Toutes les extractions ont été réalisées dans un micro-ondes de laboratoire (Milestone, modèle microSynth) à une puissance de 200 W et durant 10 minutes à la température sélectionnée.

➤ *Choix du solvant*

Dans un bicol, on ajoute 50 mL de solvant (eau distillée, DMSO ou DMA selon les cas) à 1 g d'holocellulose. Le ballon est surmonté d'un réfrigérant et placé dans l'enceinte du four à micro-ondes. La consigne de température est de 100°C pour l'eau, 165°C pour le DMA et 189°C pour le DMSO. Après irradiation, la solution est filtrée sur papier filtre et le résidu rincé abondamment à l'eau distillée. Pour les extractions qui se sont faites dans les solvants organiques, 50 mL d'eau distillée sont ajoutés au filtrat avant que celui-ci ne soit placé deux jours en dialyse dans des membranes dont le seuil de coupure se situe entre 6000 et 8000 Da.

➤ *Prétraitements ultrasons*

Les traitements ultrasons se font à l'aide d'une sonde à ultrasons Sonifier Cell Disruptor B-30 durant des temps variables et selon un fonctionnement discontinu à 25, 50, 75 ou 100% de la puissance maximale et à une fréquence de 20 kHz.

B. Xylanes de péricarpe d'argan

III.1.3. Extraction des xylanes à partir de péricarpe d'argan

III.1.3.a. Matériel biologique

Les péricarpes d'argan nous ont été fournis par la société EFAS de Ait Amira au Maroc. Ils ont été broyés puis tamisés de façon à obtenir une fine poudre blanche.

III.1.3.b. Extraction à l'éthanol

Cette première étape permet d'éliminer les sucres circulants et les tannins solubles. L'extraction a été réalisée à partir de 25 g de poudre de péricarpes d'argan dans 900 mL

d'éthanol à 80% à 80°C pendant 7 h. Le résidu obtenu (R_{Sox}) est alors refroidi à température ambiante avant d'être mis à sécher une nuit à l'étuve à 40°C.

III.1.3.c. Extraction des pectines

Le mode opératoire est le même que celui décrit dans *III.1.1.c.*

III.1.3.d. Délignification chimique par le chlorite de sodium

Le mode opératoire est le même que celui décrit dans *III.1.1.d.*

III.1.4. Extraction alcaline des xylanes

Deux grammes d'holocellulose de péricarpe d'argan sont ajoutés à 100 mL d'une solution de KOH 4,3 M à 3 mg.mL⁻¹ de NaBH₄ (agent réducteur). L'enceinte d'extraction est saturée à l'argon pour prévenir tout risque de dégradation du produit, puis placée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 24h. A la fin de la réaction, la suspension est filtrée et le résidu est rincé à l'eau distillée puis lyophilisé. Le pH du filtrat est porté à 5,5 par ajout d'acide acétique glacial. Il est ensuite placé en dialyse 48h dans une membrane Spectrapor dont le seuil de coupure est compris entre 6000 et 8000 Da. A la fin de la dialyse, la solution est centrifugée de façon à séparer la fraction insoluble (contenant l'homoxylane) de la fraction soluble (qui contient le 4-*O*-méthylglucuronoxylane). Après concentration de cette dernière fraction, les hémicelluloses de la fraction soluble sont précipitées par 3 volumes d'éthanol puis centrifugées pendant 20 minutes à 1860 g (2000 rpm). Le surnageant éthanolique est éliminé et le culot est repris dans de l'eau distillée.

III.2. Caractérisations chimique des xylanes

III.2.1. Etude de la composition centésimale

III.2.1.a. Dosage des oses

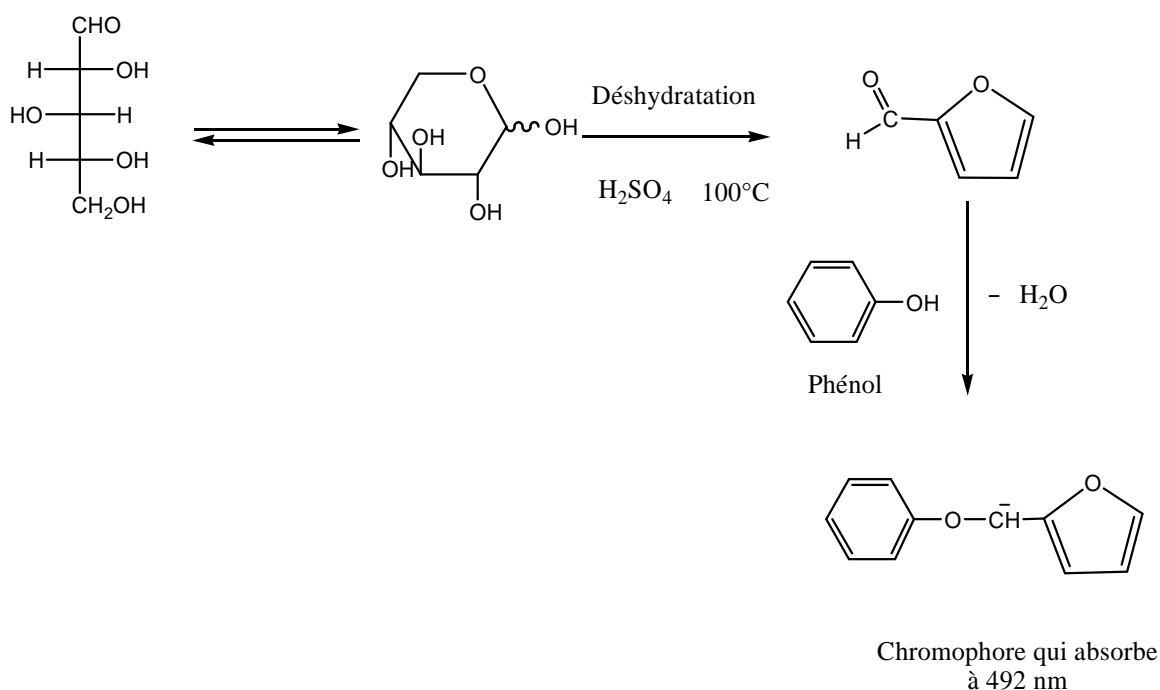
L'appréciation de la quantité en oses neutres et en acides uroniques présents dans les polysaccharides repose sur 2 dosages complémentaires :

- le dosage des oses totaux par la méthode de Dubois *et al.*,¹²⁰,
- le dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen¹²¹.

➤ *Dosage des oses totaux*

Les solutions de polysaccharides à doser, de concentrations comprises entre 5 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ainsi que des solutions de xylose et d'acide glucuronique constitutives de la gamme étalon sont préparées simultanément. A 200 μL des solutions à doser ou de gamme étalon, on ajoute 200 μL 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.

Principe du dosage des oses neutres par la méthode de Dubois *et al.*,¹²⁰



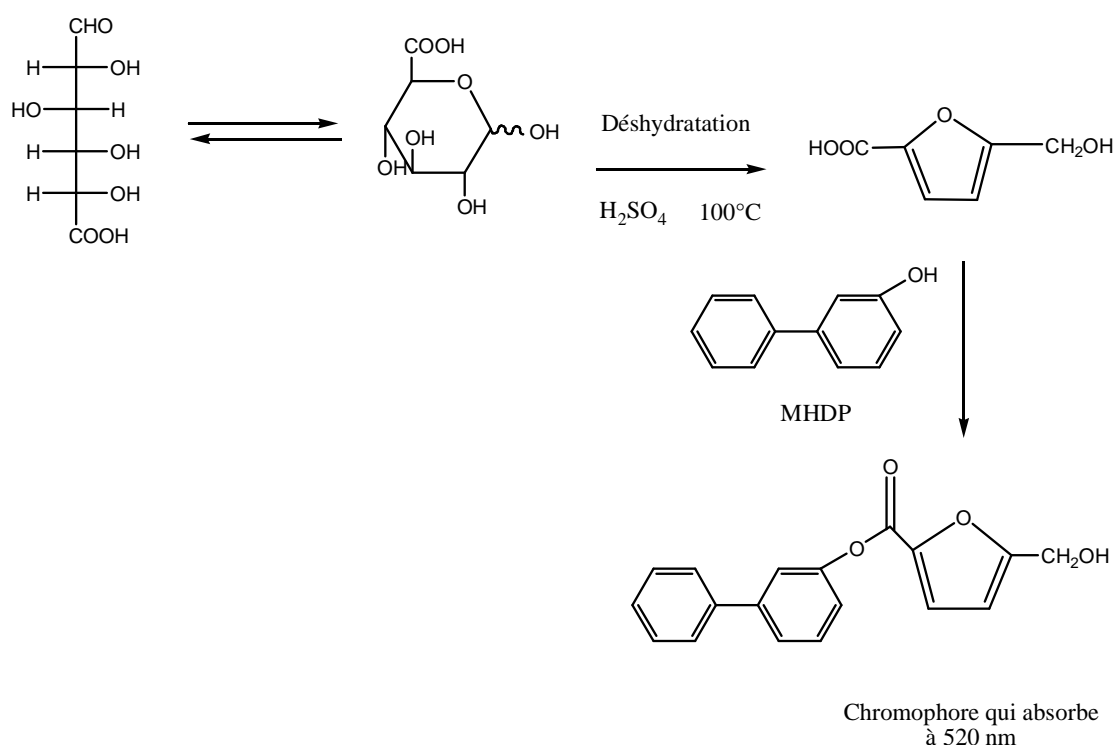
➤ *Dosage des acides uroniques*

Les solutions de polysaccharides 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 xylose à 50, 100, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A 200 μL 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 μL d'une solution de MHDP (*mé*ta-hydroxydiphényle) à 0,15 % dans NaOH 0,5 %. Les contenus des 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 Spik¹³⁶ qui permet d'éliminer les interférences des acides uroniques dans le dosage des oses neutres et réciproquement.

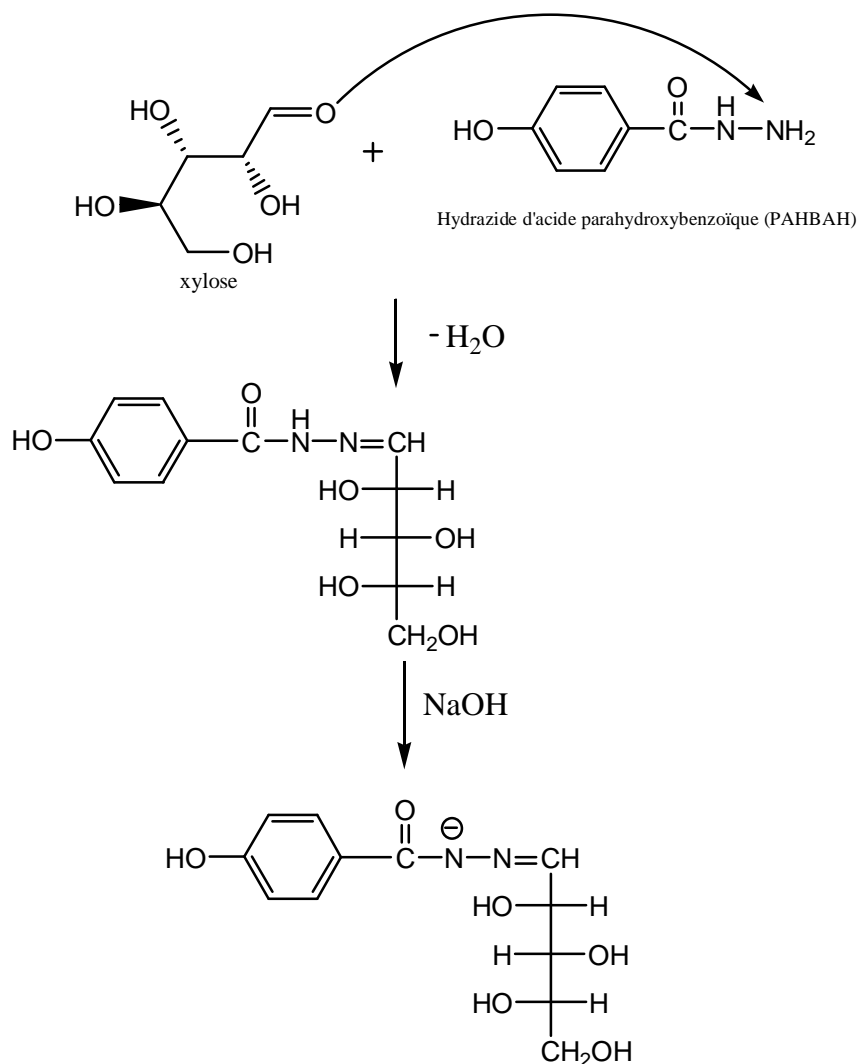
Principe du dosage des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen¹²¹



➤ Dosage des oses réducteurs

Les solutions de polysaccharides à doser sont préparées simultanément avec une gamme étalon composée de solutions de xylose à 10, 25 et $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A $333 \mu\text{L}$ de solution à doser, on ajoute $1000 \mu\text{L}$ d'une solution de PAHBAH (acide hydrazide para-hydroxybenzoïque) à 5 % dans HCl 0,5 M, fraîchement dilué au 1/5 par NaOH 0,5 M. Le mélange est homogénéisé au vortex et porté à 100°C au bain-marie durant 5 minutes, puis refroidi. La lecture des densités optiques est réalisée à 410 nm.

Principe du dosage des oses réducteurs par la méthode de Lever¹²⁴



Anions colorés en jaune absorbant à 410nm

III.2.2. Dosage des hydroxyles phénoliques totaux

La teneur en groupements hydroxyles phénoliques totaux est déterminée par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu proposée par Pereira²²² et modifiée par Pilo-Veloso *et al.*,²³⁶. Cette méthode repose sur une réaction d'oxydo-réduction indépendante du degré de polymérisation des composés phénoliques. Ainsi, elle implique tous les composés sans différenciation entre l'acide gallique, les monomères, les dimères et les composés phénoliques les plus grands. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un réactif formé de phosphomolybdate et de

phosphotungstate. Ces derniers sont réduits par réaction avec les composés phénoliques sous l'effet de la chaleur en milieu alcalin pour former un produit bleu. La concentration de ce dérivé coloré est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 760 nm. Des solutions d'acide gallique de concentrations croissantes sont utilisées comme étalon.

Un millilitre d'extrait brut après délignification enzymatique est mélangé à 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois par de l'eau ultra-pure. Le mélange est aussitôt additionné de 2 mL d'une solution de bicarbonate de sodium à 75 g.L^{-1} puis placé au bain-marie à 50°C pendant 5 minutes avant d'être placé dans un bain d'eau froide. Les mesures d'absorbance sont effectuées au spectromètre UV-visible (Shimadzu) à 760 nm. Les concentrations en hydroxyles phénoliques sont estimées par référence à une droite étalon d'acide gallique de concentrations comprises entre 20 et 100 mg.L^{-1} . Les résultats sont exprimés en équivalents massiques d'acide gallique.

III.2.3. Dosage du peroxyde d'hydrogène résiduel

Un prélèvement d'un volume V de 1 mL du mélange réactionnel est introduit dans un bécher de 100 mL et mélangé à 25 mL d'une solution de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 500 mM (pH 7). On y ajoute une spatule d'empois d'amidon et 5 mL d'une solution d'iodure de potassium (0,4 M) fraîchement préparée. L'iode libéré est titré avec une solution de tiosulfate de sodium (0,01 M) placée dans une burette graduée. Les équilibres mis en jeu dans ce dosage sont :



La quantité de peroxyde d'hydrogène résiduelle ($n_{\text{H}_2\text{O}_2}$) contenu dans le mélange réactionnel se calcule, d'après les équilibres (1) et (2) par la formule :

$$n_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{1}{2} \times V_{\text{éq}} \times 0,01 \times V_{\text{tot}}/V$$

avec $V_{\text{éq}}$, le volume de thiosulfate de sodium versé jusqu'à la décoloration de la solution et V_{tot} le volume total de la solution à doser.

III.2.4. Dosage des fonctions acides carboxyliques

Un prélèvement d'une masse de 20 mg d'échantillon est mis en solution dans 50 mL d'eau distillée auxquels est ajouté 1 mL de soude 0,1 M. L'excès de soude est dosé par HCl

0,02 M en utilisant une électrode de verre et un pHmètre. Un blanc est réalisé à partir du polysaccharide non oxydé. Le nombre de moles de fonctions carboxyliques créés est calculé selon la formule suivante :

$$n_{\text{COOH(échantillon)}} = (V_{\text{éq (blanc)}} - V_{\text{éq (échantillon)}}) * [\text{HCl}]$$

III.2.5. Dosage des fonctions aldéhydes (réaction de Cannizarro)

Un prélèvement d'une masse de 50 mg d'échantillon est mis en solution dans 10 mL de soude 0,1 M. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 10 minutes sous agitation magnétique. L'excès de soude est alors titré en retour par HCl 0,02 M en utilisant une électrode de verre et un pHmètre. Un blanc est réalisé à partir du polysaccharide non oxydé. Le nombre de moles de fonctions carboxyliques créés est calculé selon la formule suivante :

$$n_{\text{CHO(échantillon)}} = 2 * ((V_{\text{éq (blanc)}} - V_{\text{éq (échantillon)}}) * [\text{HCl}] - n_{\text{COOH(échantillon)}})$$

III.2.6. Etude de la composition monosaccharidique par CPG

Le principe de cette méthode repose sur l'obtention de méthylglycosides triméthylsilylés par méthanolyse suivie d'une *per*triméthylsilylation des monosaccharides libérés.

III.2.6.a. Préparation des dérivés méthylglycosides triméthylsilylés

Les monosaccharides neutres et les acides uroniques sont identifiés et analysés sous forme de méthylglycosides *O*-triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling et *al.*,¹²⁸ modifiée par Montreuil et *al.*,¹³⁶. Deux cents à cinq cents microgrammes de polysaccharides, auxquels on ajoute un témoin interne, le méso-inositol (MI), à raison de 50% de la quantité de polysaccharide, sont traités. Cette analyse, qui a été adaptée à l'analyse de poudres d'origine végétale par Marga et *al.*,²³⁷, a été également utilisée pour l'étude de la composition monosaccharidique des sciures brutes et des résidus d'extraction.

➤ 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 200 µg d'un échantillon polysaccharidique anhydre contenant 20 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'azote. La phase méthanolique est délipidée par trois lavages successifs à l'heptane (3 x 1 mL). Elle est à nouveau évaporée sous flux d'azote.

➤ *Triméthylsilylation*

Les méthylglycosides sont triméthylsilylés pendant 2 h à température ambiante par 200 µL d'un mélange V/V pyridine/BSTFA (*N,O*-bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide) à 1 % de triméthylchlorosilane (TMCS) avant de pouvoir être injectés en CPG.

III.2.6.b. Analyse des dérivés TMS en 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⁻¹, avec un palier de 5 min à 190°C, puis de 210 à 260°C à raison de 5°C.min⁻¹. Les résultats sont exprimés en pourcentage molaire après correction des aires des pics.

III.2.7. Evaluation du taux d'acétylation et d'acide 4-*O*-méthylglucuronique

Le calcul de ces pourcentages a été effectué par utilisation de la RMN ¹H. 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 l'eau deutériée. Les pourcentages ont été calculés selon la méthode décrite au paragraphe I.3.1.c (Preprière Partie) pour les différents xylnes testés.

III.3. Autohydrolyse des xylnes

Cette méthode de fragmentation a été utilisée pour différents glucuronoxylnes de châtaignier et d'argan.

III.3.1. Protocole

Le protocole utilisé a été adapté de Cescutti et *al.*,²³⁸ pour l'analyse d'un polysaccharide acide. Une solution aqueuse de polysaccharide à 1 mg.mL⁻¹ est convertie en sa forme acide

par passage sur résine Amberlite IR-120 (H⁺). Cette solution est alors placée à l'étuve à 100°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.

III.3.2. Séparation des oligosaccharides

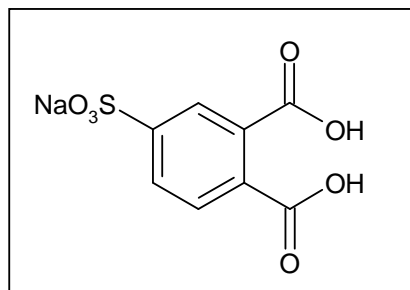
Les produits d'hydrolyse ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne de résine basique Dowex 1×2 sous forme Cl⁻ (mesh 200-400 ; Fluka ; colonne : Ø 1 cm × 50 cm). Un gradient d'élution linéaire de formiate d'ammonium de 0,05 M à 0,5 M a été appliqué pour séparer les oligosaccharides 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⁻¹. 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'H₂SO₄ 20 % à 0,1 % d'orcinol et passage à l'étuve à 100°C.

III.3.3. Purification 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⁻¹ et collectés.

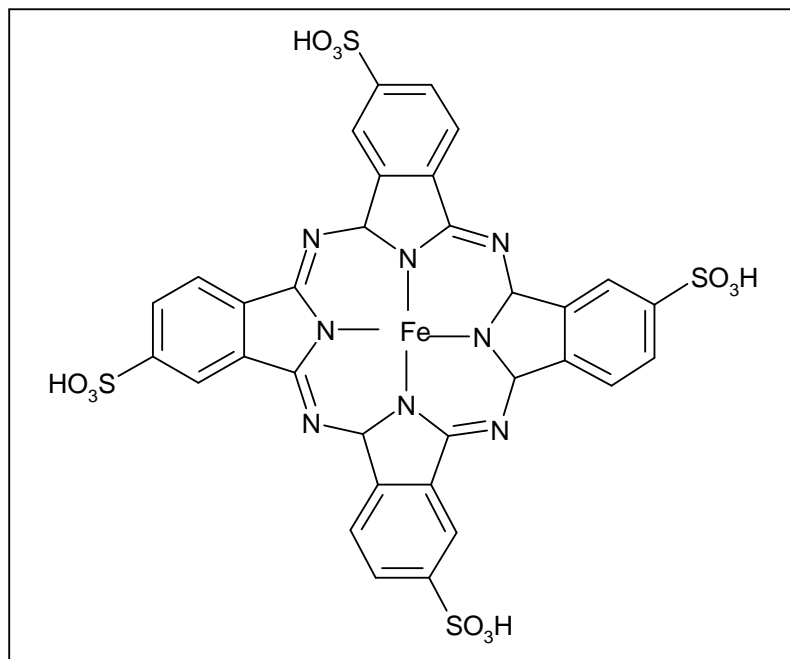
IV.1. Synthèses

IV.1.1. Sel de sodium de l'acide sulfophtalique



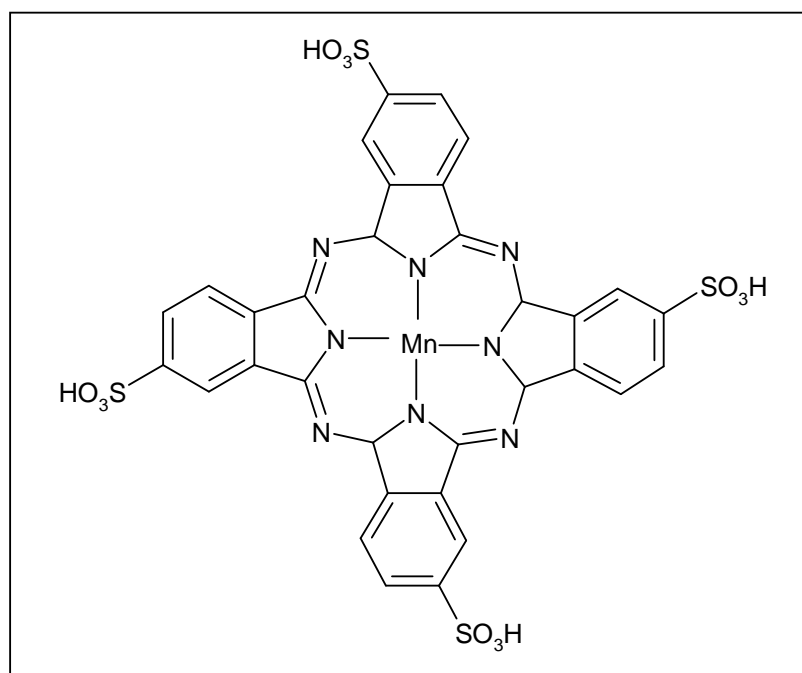
De la soude (15 g, 0.375 mol) est dissoute dans un minimum d'eau. Cette solution est ajoutée avec précaution à l'acide sulfophtalique (80 mL, 0,21 mol). Le pH de la solution est suivi et l'on s'arrête à la première équivalence (pH=1,3). L'eau est ensuite évaporée et le produit est alors précipité par de l'éthanol. La solution est filtrée sur Büchner et le précipité est séché à l'étuve à 40°C pendant une nuit. Le rendement est de 95% et le produit est utilisé sans autre purification supplémentaire.

IV.1.2. 4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphthalocyanine de fer (FePcS)



Dans un ballon de l'acide sulfophtalique (64 mmol, 17,2 g), de l'urée (386 mmol, 23,2 g), du chlorure d'ammonium (35 mmol, 1,87 mg), du sulfate de fer (12 mmol, 3,34 g) en présence de molybdate d'ammonium (0,2 mmol, 247 mg). Toutes les poudres sont broyées au mortier, mélangées et déposées dans une boîte de Pétri en verre, elle-même placée sur plaque chauffante à 200°C pendant 2 h. Le produit de la réaction est caractérisé et dosé par l'UV-visible (λ_{max} en nm / ϵ en mol.L⁻¹ : 328 / 55700 ; 630 / 65000)²²⁷. Le rendement molaire obtenu est de 76%,

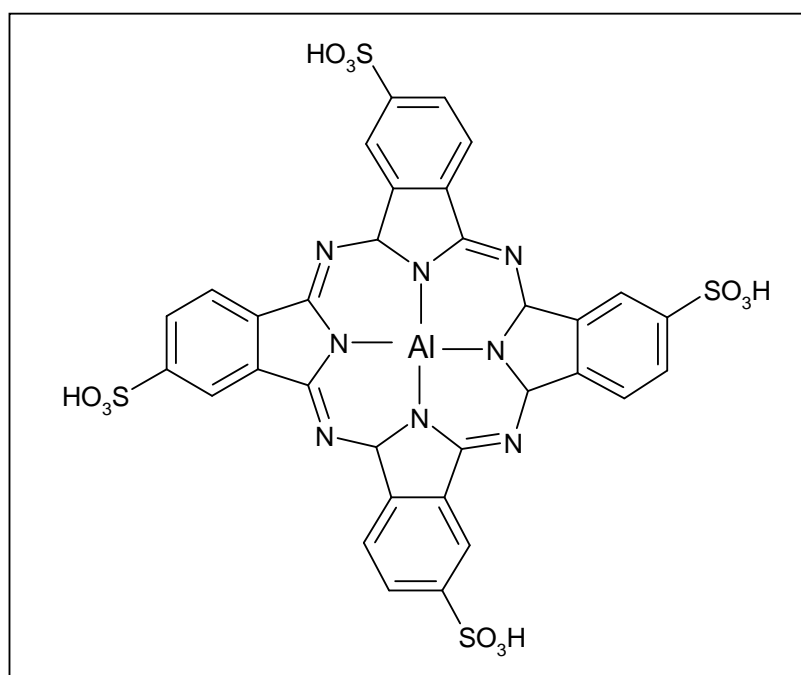
IV.1.3. 4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine de manganèse
(MnPcS)



Dans un ballon de l'acide sulfophtalique (6,4 mmol, 1,72 g), de l'urée (3,8 mmol, 2,32 g), du chlorure d'ammonium (3,5 mmol, 187 mg), du sulfate de manganèse (1,2 mmol, 210 mg) en présence de molybdate d'ammonium (0,2 mmol, 27 mg). Toutes les poudres sont broyées au mortier, mélangées et déposées dans une boîte de Pétri, en verre elle-même placée sur plaque chauffante à 200°C pendant 2 h. Le produit de la réaction est caractérisé et dosé par l'UV-visible (λ_{\max} en nm / ϵ en mol.L⁻¹ : 506 / 7943 ; 640 / 26915 ; 714 / 51286)²²⁸. Le rendement (molaire) est de 16 %.

SM (MALDI) : m/z 886,91 [M+H]⁺

IV.1.4. 4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine d'aluminium
(AlPcS)

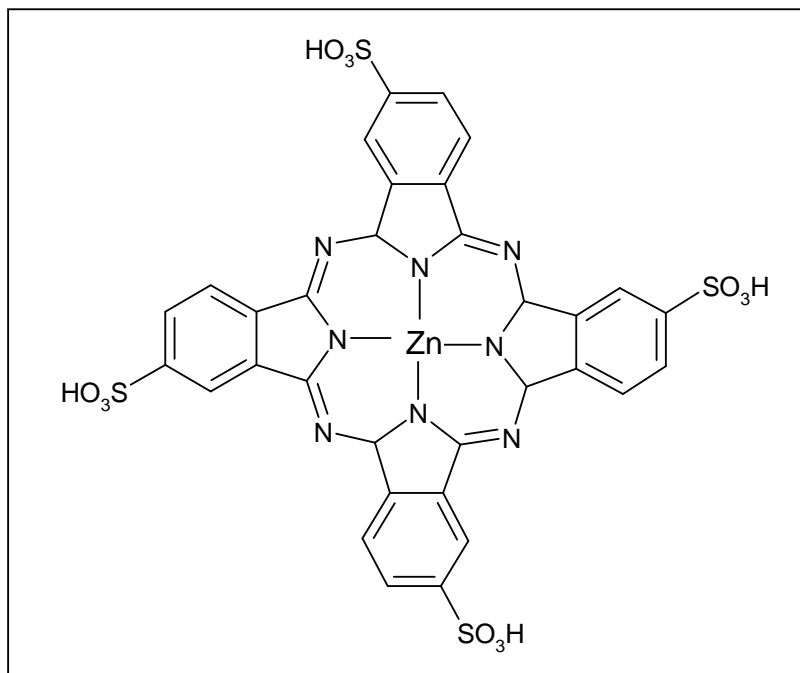


Dans un ballon de l'acide sulfophtalique (6,4 mmol, 1,72 g), de l'urée (3,8 mmol, 2,32 g), du chlorure d'ammonium (3,5 mmol, 187 mg), du chlorure d'aluminium (1,2 mmol, 290 mg) en présence de molybdate d'ammonium (0,2 mmol, 27 mg). Toutes les poudres sont broyées au mortier, mélangées et déposées dans une boîte de Pétri en verre, elle-même placée sur plaque chauffante à 200°C pendant 2 h. Le produit de la réaction est caractérisé et dosé par l'UV-visible (λ_{max} en nm / ϵ en mol.L⁻¹ : 681/3870 ; 614/794). Le rendement molaire est de 55 %.

SM (MALDI) : *en cours*

RMN ¹H : (400 MHz, DMSO d₆, 25°C), 7-8 ppm, protons aromatiques

IV.1.5. 4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine de zinc (ZnPcS)

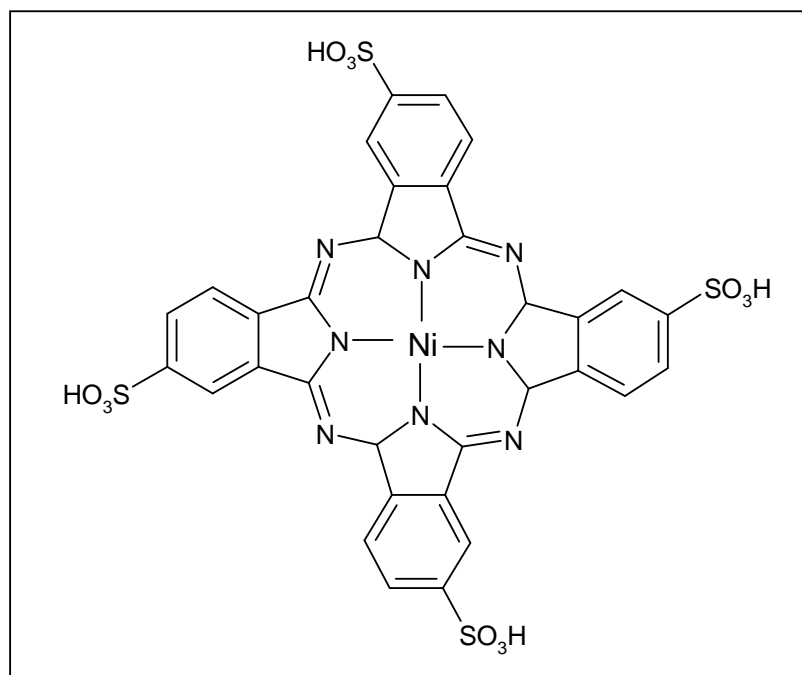


Dans un ballon de l'acide sulfophtalique (6,4 mmol, 1,72 g), de l'urée (3,8 mmol, 2,32 g), du chlorure d'ammonium (3,5 mmol, 187 mg), du chlorure de zinc (1,2 mmol, 290 mg) en présence de molybdate d'ammonium (0,2 mmol, 27 mg). Toutes les poudres sont broyées au mortier, mélangées et déposées dans une boîte de Pétri en verre, elle-même placée sur plaque chauffante à 200°C pendant 2 h. Le produit de la réaction est caractérisé et dosé par l'UV-visible (λ_{max} en nm / ϵ en mol.L⁻¹ : 677/683 ; 636/496). Le rendement molaire est de 71%.

SM (MALDI) : *en cours*

RMN ¹H : (400 MHz, DMSO d₆, 25°C), 7-8 ppm, protons aromatiques

IV.1.6. 4,4',4'',4'''-tétrasulfonylphtalocyanine de nickel (NiPcS)

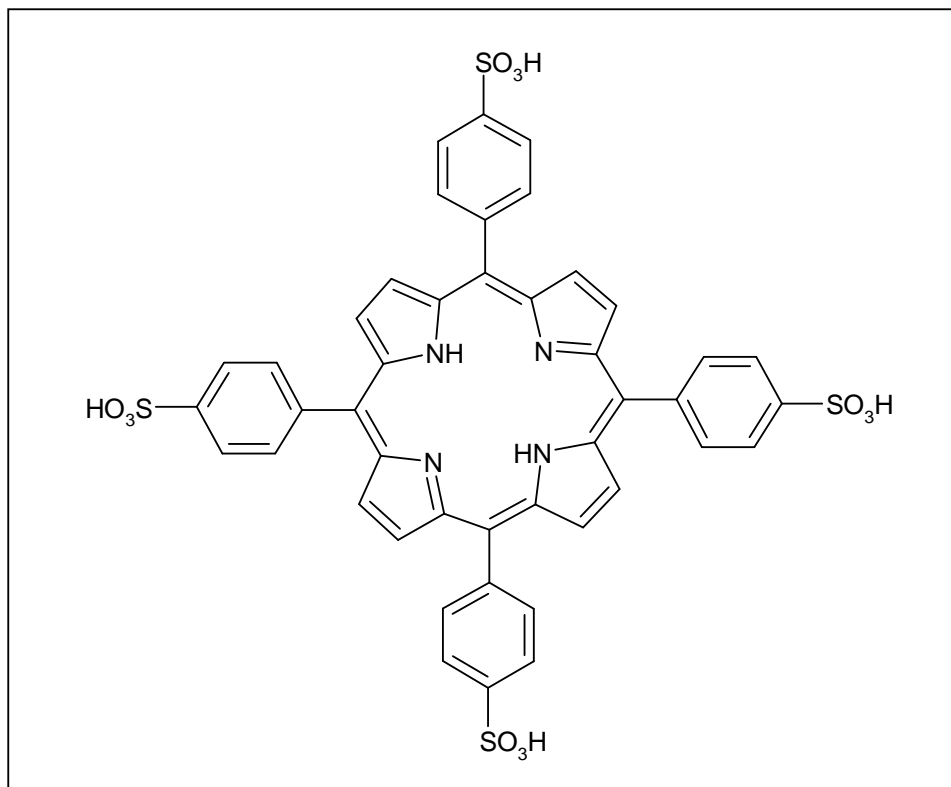


Dans un ballon de l'acide sulfophtalique (6,4 mmol, 1,72 g), de l'urée (3,8 mmol, 2,32 g), du chlorure d'ammonium (3,5 mmol, 187 mg), du chlorure de nickel (1,2 mmol, 280 mg) en présence de molybdate d'ammonium (0,2 mmol, 27 mg). Toutes les poudres sont broyées au mortier, mélangées et déposées dans une boîte de Pétri en verre, placée sur plaque chauffante à 200°C pendant 2 h. Le produit de la réaction est caractérisé et dosé par l'UV-visible (λ_{max} en nm / ϵ en mol.L⁻¹ : 661/13792 ; 628/15895). Le rendement molaire est de 42%.

SM (MALDI) : *en cours*

RMN ¹H : (400 MHz, DMSO d₆, 25°C), 7-8 ppm, protons aromatiques

IV.1.7. 5,10,15,20-tétra(4-sulfonatophényl)porphyrine (H₂TPPS)



Dans un ballon de 100 mL, on place 710 mg (1,15 mmol) de tétraphénylporphyrine (H₂TTP) (préalablement purifiée sur colonne) en présence de 30 mL d'H₂SO₄ à 95% (0,16 mol), à 80°C. Après 20 h de réaction, la solution est placée dans un bain de glace et avec précaution, la tétraphénylporphyrine sulfonée est versée dans 100 mL d'eau distillée. La neutralisation se fait par de la soude puis par une solution saturée de Na₂CO₃ jusqu'à ce que la porphyrine qui était verte devienne violette. La solution est alors évaporée sous pression réduite. La H₂TPPS est ensuite dissoute dans du méthanol ; les sels précipitent à froid et sont éliminés par filtration. Plusieurs lavages sont ainsi réalisés avant l'évaporation du méthanol sous pression réduite. La H₂TPPS est reprise dans de l'eau et placée dans des membranes de dialyse (dont le seuil de coupure est de 1000 Da) pendant 48 h. Après évaporation de l'eau, la H₂TPPS est obtenue sous la forme d'une poudre violette avec un rendement de 87%.

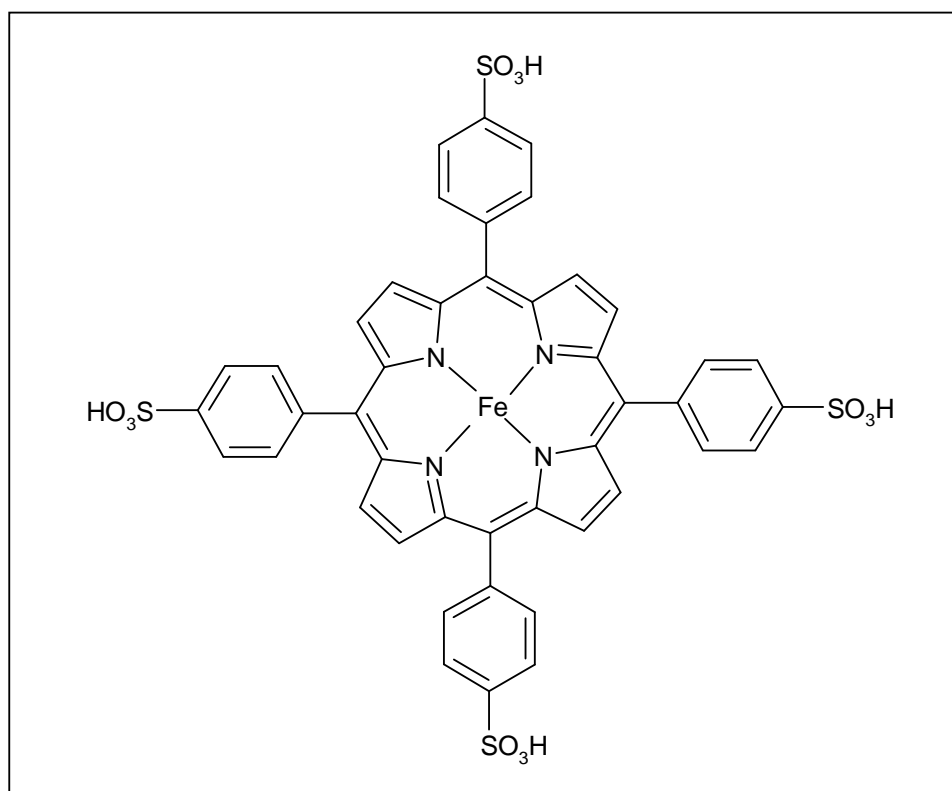
R_f = 0,54 (CHCl₃/MeOH/H₂O 60/35/5)

RMN ¹H : (400 MHz, DMSO d₆, 25°C) δ en ppm (*J* en Hz), -2,93 (s, 2H, **NH** pyrrole), 8,06 (d, *J*=7,9 Hz, 8H, **H**-*m*-ArSO₃H), 8,19 (d, *J*=7,9 Hz, 8H, **H**-*p*-ArSO₃H), 8,86 (s, 8H, **H** pyrrole).

SM (MALDI) : *m/z* 935,24 [M+H]⁺

UV-Visible λ_{max} en nm / ε en mol.L⁻¹ dans l'eau: 413 (413242), 515 (5479), 552 (5809), 580 (5030), 633(2608)

IV.1.8. 5, 10, 15,20-tétra(4-sulfonatophényl)porphyrine de fer
(FeTPPS)



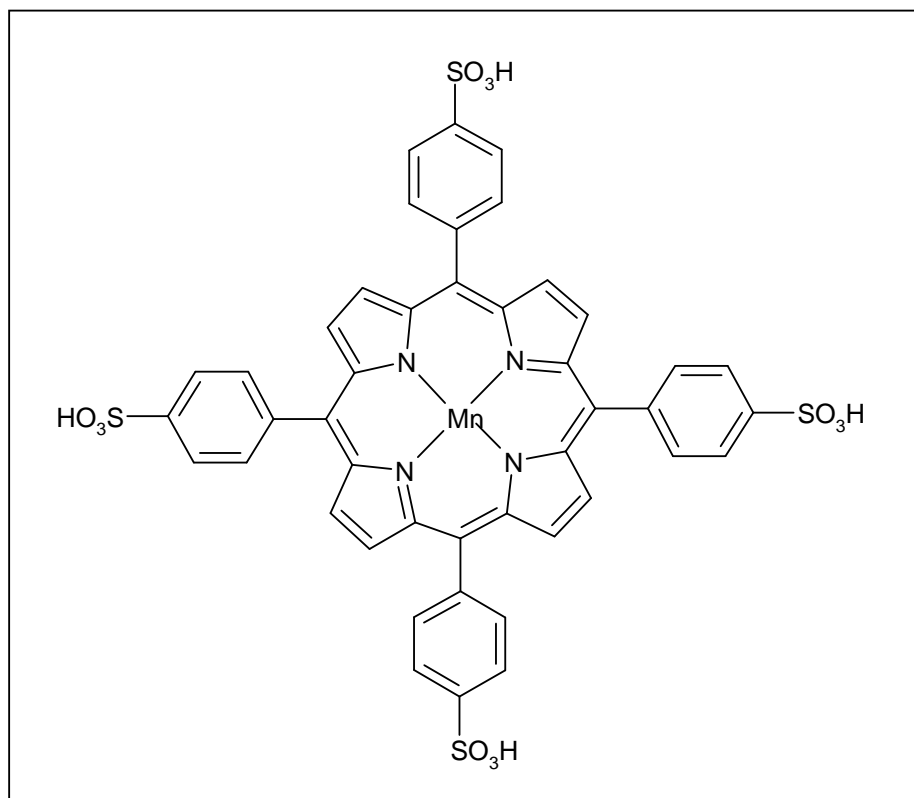
Dans un ballon 200 mg de H₂TPPS (0,19 mmol, 1 éq.) sont dissouts dans 100 mL d'eau distillée auxquels on ajoute 387 mg de FeCl₂·4H₂O (1,9 mmol, 10 éq.) dans un ballon de 250 mL. La réaction est portée à 80 °C pendant 28 h. Après refroidissement du milieu réactionnel, le surplus de fer est précipité par du méthanol à froid. La solution est ensuite centrifugée 15 minutes à 3000 rpm pour séparer les sels. La solution porphyrinique est alors évaporée sous vide puis reprise dans de l'eau distillée avant d'être placée en dialyse 48 h dans des membranes de seuil de coupure fixé à 1000 Da. La solution purifiée est alors elle aussi évaporée à sec et l'on obtient une poudre marron avec un rendement de 43%.

R_f = 0,5 (CHCl₃/MeOH/H₂O 60/35/5)

SM (MALDI) : *en cours*

UV-Visible λ_{max} en nm / ϵ en mol.L⁻¹ dans l'eau: 392/68187 ; 528/8407 ; 580/4727

IV.1.9. 5, 10, 15, 20-tétra(4-sulfonatophényl)porphyrine de manganèse (MnTPPS)



Dans un ballon 200 mg de H₂TPPS (0,19 mmol, 1 éq.) sont dissouts dans 100 mL d'eau distillée auxquels on ajoute 335 mg d'acétate de manganèse (1,9 mmol, 10 éq.) dans un ballon de 250 mL. La réaction est portée à 85 °C pendant 16 h. Après refroidissement de la réaction, le surplus de fer est précipité par du méthanol à froid. La solution est ensuite centrifugée 15 minutes à 3000 rpm pour séparer les sels. La solution porphyrinique est alors évaporée sous vide puis reprise dans de l'eau distillée avant d'être mise en dialyse 48 h dans des membranes de seuil de coupure fixé à 1000 Da. La solution ainsi purifiée est enfin évaporée à sec ce qui permet d'obtenir une poudre marron avec un rendement de 52%.

R_f = 0,56 (CHCl₃/MeOH/H₂O 60/35/5)

SM (MALDI) : m/z 988,00 [M+H]⁺

UV-Visible λ_{max} en nm / ε en mol.L⁻¹ dans l'eau: 466/ 123625 ; 562/15170 ; 596/10522

V.1. Evaluation des propriétés biologiques de cytotoxicité des extraits

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés au Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire (EA 3410) de l'Université de Paris XIII avec la collaboration du professeur Michel Kraemer et l'assistance technique de Mme Odile Sainte Catherine.

V.1.1. Efficacité des xylanes en oncologie cellulaire et moléculaire

V.1.1.a. Lignée cellulaire

Les études ont été menées sur des cellules de la lignée tumorale A431 provenant de l'ATCC (American Type Collection Culture). Cette lignée d'un carcinome épidermoïde vulvaire humain se caractérise par une morphologie de cellules épithéliales et un grand nombre de récepteurs à l'EGF²³⁹. Par ailleurs, ces cellules sécrètent une quantité importante de VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire), favorisant l'angiogénèse (L'angiogénèse est un mécanisme de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant. Elle est particulièrement importante et indispensable en particulier pour la croissance des tumeurs, le développement des métastases).²⁴⁰

V.1.1.b. Entretien cellulaire

La lignée cellulaire est cultivée dans un milieu de culture DMEM (4500 mg.mL⁻¹ de glucose, pyruvate de sodium et glutaMAX), enrichi de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et contenant un mélange d'antibiotiques (50 UI.mL⁻¹ de péniciline, 50 µg.mL⁻¹ de streptomycine) (Invitrogen). Les cellules sontensemencées dans des tubes Falcon T75 à raison de 5.10⁵ à 10⁶ cellules.10 mL⁻¹ de milieu de culture et maintenues en culture dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ en atmosphère humide. A confluence, les cellules sont rincées avec une solution saline de phosphate tamponnée (PBS : Gibco) puis détachées par une solution de trypsine-EDTA (0,0025% de trypsine, 0,01% d'EDTA ; Invitrogen) et reensemencées au 1/10^{ème} de la confluence dans de nouvelles boîtes de culture. Chaque trypsination correspond à un passage numéroté.

V.1.2. Etude de la viabilité cellulaire

V.1.2.a. Tests MTT

L'effet des différents composés sur la viabilité cellulaire a été étudié grâce à un test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltétrazolium ; Sigma-Aldrich).²⁴¹

V.1.2.b. Etude des effets de doses et du temps

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 96 puits (Falcon) à raison de 5.10^3 cellules. $100 \mu\text{L}^{-1}$ dans du milieu complet (10% de SVF). Après 24 h de culture, le milieu est éliminé et remplacé par du milieu à 2% de SVF contenant des concentrations croissantes de produits. Après 72 h de traitement, les cellules sont rincées au PBS puis incubées avec $100 \mu\text{L}$ de MTT ($0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ de PBS pendant 4h à 37°C et 5% de CO_2). Le MTT réduit en bleu de formazan, est solubilisé par l'addition de $100 \mu\text{L}$ de DMSO (diméthylsulfoxyde ; Sigma-Aldrich) dans chaque puits. La densité optique (DO) est mesurée à 595 nm grâce à un lecteur de plaque Labsystem Multiskan MS. Le pourcentage de viabilité cellulaire (%V) est déterminé selon la formule suivante :

$$\%V = [\text{DO}_{\text{cellules traitées}} / \text{Moy} (\text{DO}_{\text{cellules non traitées}})] \times 100$$

V.1.2.c. Etude de la migration et de l'invasion cellulaire

L'effet des xylanes a été étudié sur la migration et l'invasion des cellules A431 a été étudié. Pour cela, nous avons utilisé des chambres de culture (ou chambre de migration) appelées chambres de Boyden (Becton Dickinson). Ces chambres sont composées d'inserts constitués d'une membrane poreuse (membrane de $0,3 \text{ cm}^2$, pores de $8 \mu\text{m}$), placés dans des plaques de 24 puits (plaques companions ; Falcon ; Becton Dickinson).

➤ Préparation des inserts pour la migration

Pour l'étude de la migration cellulaire, l'intérieur des inserts (déposés dans les puits de la plaque compagne) est recouvert de $100 \mu\text{L}$ de fibronectine (à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du PBS) par inserts. Après une nuit à 4°C , l'excès de fibronectine est éliminé, les membranes sont rincées 2 fois au PBS puis saturées 1 heure avec 1% de BSA (albumine bovine ; Sigma-Aldrich). Le milieu avec 1% BSA est finalement éliminé.

➤ *Préparation des inserts pour l'invasion*

Pour l'étude de l'invasion cellulaire, l'intérieur des inserts (déposés dans les puits de la plaque companion) est recouvert par 100 μL de Matrigel à 10 mg.mL^{-1} PBS (Becton Dickinson). La plaque de culture est alors placée dans l'incubateur à 37 °C pendant 3 heures, puis sous une hotte à flux laminaire (12 à 24 heures) pour permettre la polymérisation du Matrigel. Les inserts sont stockés à 4 °C puis réhydratés 24 heures avant l'expérience avec 500 μl de milieu.

➤ *Préparation des cellules pour la migration*

Les cellules A431 sontensemencées dans des tubes Falcon T25 à raison de $1.7.10^6$ - 2.10^6 cellules. 5 mL^{-1} par T25 dans du milieu de culture à 10 % de SVF. Après 24 h, les cellules sont rincées au PBS puis traitées par des solutions à 50 ou 100 μM des xylanes (dilution dans du milieu à 10% de SVF) pendant 24 h. Des cellules, servant de témoins, ne sont pas traitées (milieu 10 % SVF). Après les traitements par les différents lots de xylanes, les cellules sont rincées au PBS, détachées à la trypsine, puis comptées. Elles sont alors diluées dans du milieu dépourvu de sérum mais additionné de 0,1 % de BSA.

➤ *Préparation des cellules pour l'invasion*

Les cellules ne sont pas pré-traitées mais sont placées simultanément au contact de solutions à 50 ou 100 μM de xylanes dans les inserts.

➤ *Migration cellulaire*

Les cellules pré-traitées et non traitées (témoins) sont déposées dans les inserts recouverts de fibronectine à raison de 10.10^4 cellules. $500 \mu\text{L}^{-1}$ par insert dans du milieu 0,1 % de BSA. Du milieu à 10 % de SVF est placé comme chémoattractant dans les puits de la plaque companion (500 μL par puits), afin de permettre la formation d'un gradient chimiotactique de part et d'autre de la membrane poreuse (Figure). Après 24 h de migration dans l'incubateur à 37 °C, le surnageant est éliminé et les inserts sont rincés au PBS sur chaque face. Les cellules n'ayant pas migré au travers des pores (face interne des inserts) sont éliminées par grattage

avec un coton-tige, celles qui ont migré sur la fibronectine (face externe des inserts) sont fixées pendant 10 minutes au méthanol, puis colorées au crystal violet. Les cellules sont comptées au microscope (Zeiss Axiophot). L'ensemble des cellules est dénombré (grossissement X200) et les pourcentages de migration sont déterminés en comparant le nombre de cellules pré-traitées qui ont migré ($N_{\text{traitées}}$) au nombre de cellules non traitées qui ont migré ($N_{\text{non traitées}}$). Ainsi :

$$\% \text{Migration} = (N_{\text{traitées}} / N_{\text{non traitées}}) \times 100$$

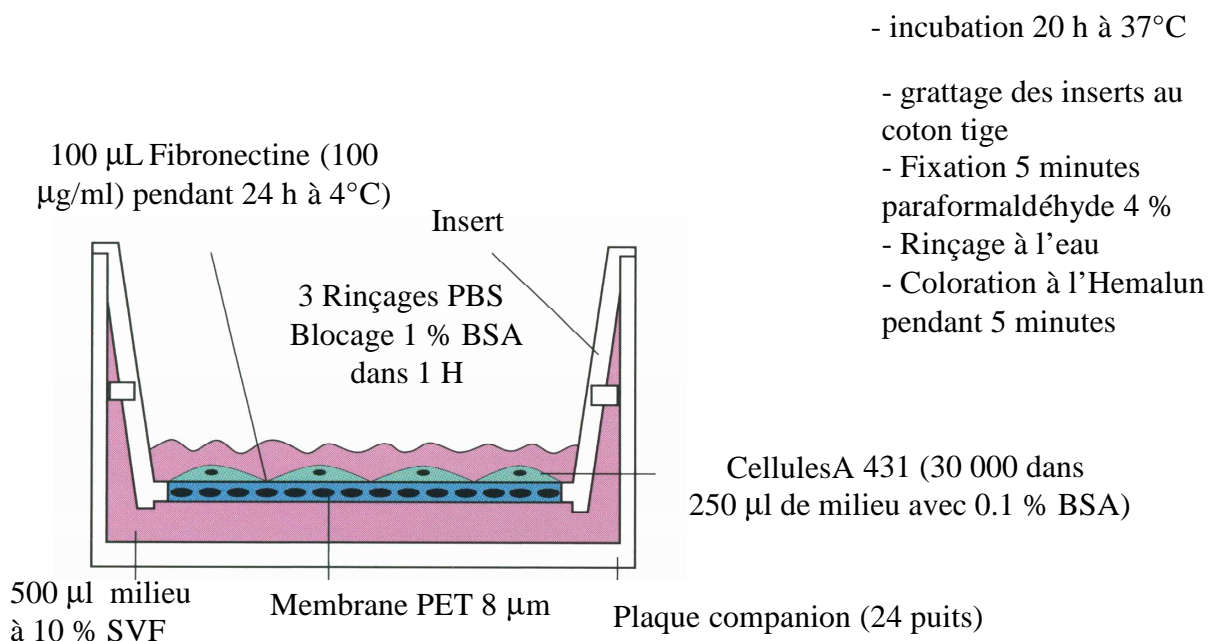


Figure 84 : Principe de la migration et de l'invasion cellulaires en chambre de Boyden

V.1.2.d. Invasion cellulaire

Les cellules non traitées sont déposées dans les inserts recouverts par le Matrigel à raison de $10 \cdot 10^4$ cellules $\cdot 500 \mu\text{L}^{-1}$ par insert dans du milieu 0,1 % de BSA contenant différentes concentrations de xylanes de châtaignier et d'argan et d'homoxylanes d'argan. Comme précédemment, du milieu à 10 % de SVF est placé dans les puits de la plaque companion (500 μL par puits). Après 24 h d'invasion dans l'incubateur à 37 °C, les inserts sont récupérés et les cellules ayant traversé le Matrigel sont lavées, fixées, colorées et comptées comme décrit pour l'étude de la migration. Des pourcentages d'invasion cellulaire sont calculés de la même manière que les pourcentages de migration.

V.1.2.e. Zymographie

➤ Principe

L'activité gélatinolytique des métalloprotéases 2 et 9 contenues dans les surnageants de culture ainsi que celle de leurs formes zymogènes est étudiée par zymographie. Il s'agit d'une électrophorèse SDS-PAGE effectuée en conditions non réductrices. Le substrat de la protéase étudiée (gélatine) est copolymérisé avec l'acrylamide.

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits (Falcon) à raison de 50.10^4 cellules. 2 mL^{-1} dans du milieu complet (10 % de SVF). L'expérience comporte des temps de traitement des cellules de 24 h, 48 h et 72 h. Après 24 h de culture, le milieu est enlevé et remplacé par du milieu sans SVF pour les cellules non traitées, et 0,015 mM des différents lots de xylanes pour les cellules traitées pour la première plaque. Les autres plaques sont maintenues avec 10 % de SVF pour 24 h et 48 h supplémentaires. Les surnageants des cellules A431 (sans sérum) sont récoltés toutes les 24 heures de traitement. Les surnageants sont concentrés avec des centricons 1000g pendant 1 h30 (Millipore) puis dilués dans un tampon d'échantillon non réducteur SDS 4X, 30 minutes à température ambiante avant le dépôt sur un gel de polyacrylamide 10 % co-polymérisés avec 1 mg.mL^{-1} de gélatine (Gélatine type B ; Sigma-Aldrich) ; substrat préférentiel des MMP-2 et MMP-9. L'électrophorèse débute à 60 V pendant 20 minutes puis se poursuit à 160 V à 4 °C. Après migration, le SDS est éliminé par des lavages successifs dans une solution de Triton sous agitation à température ambiante pour permettre la renaturation des protéines, puis à l'eau distillée. Les gels sont incubés dans un tampon de digestion (50 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 0,2M NaCl ; 5 mM CaCl_2 ; 0,05 % Brij 35) contenant les éléments nécessaires à l'activité enzymatique des MMPs durant 19 heures à 37 °C. Le gel est enfin coloré pendant 1 heure dans une solution à 30 % de méthanol, 10 % d'acide acétique et 0,5 % de Bleu de Coomassie R.250 puis décoloré dans des bains à 30 % de méthanol, 10 % d'acide acétique. Les gélatinases sont révélées par une bande claire sur un fond bleu, correspondant à la protéolyse locale de la gélatine dans le gel.

Sur chacun des zymogrammes réalisés, une fraction de surnageant issue de la culture de la lignée HT 1080 (Fibrosarcome humain, ATCC) et sécrétant les pro-MMP2 et pro-MMP9 en quantité importante est déposée en parallèle des échantillons analysés. La quantification des plages de lyse est effectuée par analyse semi-automatique. La surface

(μm^2), ainsi que la densité grise des plages de lyse sont mesurées pour chaque dépôt effectué, les activités pro-MMP2 sont alors exprimées en teinte gris. μm^{-2} . Les activités ainsi mesurées sont ramenées au nombre de cellule déterminées dans chaque puits dont sont issus les échantillons analysés (dosage de protéines). De façon à pouvoir normaliser l'ensemble des valeurs obtenues et effectuer une comparaison des activités mesurées à partir des différents gels, la valeur d'activité mesurée pour la plage de lyse correspondant à l'activité pro-MMP2 sécrétée par HT 1080 est prise pour référence et chacune des valeurs lui est comparée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. <http://www.limousin.ecologie.gouv.fr/spip.php?rubrique43>.
2. Moine C., Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois-Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, **2005**, 240 p.
3. Laberche J. C., L'organisation cellulaire. In *Biologie végétale*, Dunod, Ed. **1999**, 81-83.
4. Raven P. H., Evert R. F., Echnorn S. E., In *Biologie végétale*, 7ème ed.; Ed Boeck, D., **2007**, p 56.
5. Govin, A. Aspects physico-chimiques de l'interaction bois-ciment - Modification de l'hydratation du ciment par le bois. Thèse de Doctorat, Université Jean Monnet et ENS des Mines, St Etienne, **2004**, 202 p.
6. Robert D., Roland J. C., Les parois. In *Biologie végétale: caractéristiques et stratégie évolutive des plantes*, Doin, Ed. **1989**; Vol. Tome 2: L'organisation cellulaire, 35-113.
7. Ebringerová A., Hromádková, Z., Heinze, T., Hemicellulose. *Advances in Polymer Sciences* **2005**, 186, 1-67.
8. Brudieux V., Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure/activité à la dermocosmétique. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, **2007**, 223 p.
9. Lanzalunga O., Bietti M., Photo- and radiation chemical induced degradation of lignin model compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2000**, 56, 85-108.
10. Bonini C., D'Auria M., Maggio P. D., Ferri R., Characterization and degradation of lignin from steam explosion of pine and corn stalk of lignin: the role of superoxide ion and ozone. *Industrial Crops and Products* **2008**, 27, 182-188.
11. Brown D. M., Zeef L. A. H., Ellis J., Goodacre R., Turner S. R., Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *The Plant Cell* **2005**, 17, 2281-2295.
12. Reis D., Vian B., Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction. *Comptes-Rendus Biologies* **2004**, 327, 785-790.
13. Mazeau K., Moine C., Krausz P., Gloaguen V., Conformational analysis of xylan chains. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 340, 2752-2760.
14. Atkins E. D. T., Three-dimensional structure, interactions and properties of xylans. *Progress in Biotechnology* **1992**, 7, 39-50.
15. Dervilly-Pinel G., Thibault J. F., Saulnier L., Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. *Carbohydrate Research* **2001**, 330, 365-372.

16. Yui T., Imada K., Shibuya N., Ogawa K., Conformation of an arabinoxylan isolated from the rice endosperm cell wall by X-ray diffraction and a conformational analysis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **1995**, 59, 965-968.
17. Bidlack J., Malone M., Benson R., Molecular structure and components integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* **1992**, 72, 51-56.
18. Lerouxel O., Cavalier D. M., Liepman A. H., Keegstra K., Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides- a complex process. *Current Opinion in Plant Biology* **2006** 9, 621-630.
19. Boudet A. M., Kajita S., Grima-Pettenati J. Goffner D., Lignins and lignocelulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* **2003**, 8, 576-581.
20. Whetten R., Sederoff R., Lignin biosynthesis. *The Plant Cell* **1995**, 7, 1001-1013.
21. York W. S., O'Neill M. A., Biochemical control of xylan biosynthesis - Which end is up? *Current Opinion on Plant Biology* **2008**, 11, 258-265.
22. Baydoun E. A.-H., Waldron K. W., Brett C. T., The interaction of xylotransferase and glucotransferase involved in glucuronoxylan synthesis in pea (*Pisum sativum*) epicotyls. *Biochemical Journal* **1989**, 257, 853-858.
23. Awano T., Takabe K., Fujita M., Xylan and lignin deposition on the secondary wall of *Fagus crenata* fibers. *Progress in Biotechnology* **2001**, 18, 137-142.
24. Terashima N., Awano T., Takabe K., Yoshida M., Formation of macromolecular lignin in ginkgo xylem cell walls as observed by field emission scanning electron microscopy. *Comptes Rendus Biologies* **2004**, 327, 903-910.
25. Ruel K., Chevalier-Billosta V., Guillemin F., Berrio-Sierra J., Joseleau J. P., The wood cell wall at the ultrastructural scale- Formation and topochemical organization. *Maderas. Ciencia y tecnologia* **2006**, 8, 107-116.
26. Gurjanov O. P., Ibragimova N. N., Gnezdilov O. I., Gorshkova T. A., Polysaccharides tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre: Isolation and identification. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 72, 719-726.
27. Newman R. H., Hemmingson J. A., Interactions between locust bean gum and cellulose characterized by ¹³C n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 36, 167-172.
28. Akerholm M., Salmén L., Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy. *Polymer* **2001**, 42, 963-969.
29. Tokoh C., Takabe K., Sugiyama J., Fujita M., Cp/mas ¹³NMR and electron diffraction study of bacterial cellulose structure affected by cell wall polysaccharides. *Cellulose* **2002**, 9, 351-360.
30. Tenkanen M., Tamminen T., Hortling B., Investigation of lignin-carbohydrate complexes in kraft pulps by selective treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, 5, 241-248.

31. Das N. N., Das S. C., Sarkar A. K., Mukherjee A. K., Lignin-xylan ester linkage in mesta fiber (*Hibiscus cannabinus*). *Carbohydrate Research* **1984**, 129, 197-207.
32. Lam H. Q., Bigot Y. L., Delmas M., Avignon G., A new procedure for the destructuring of vegetable matter at atmospheric pressure by a catalyst/Solvent system of formic/acetic acid. Applied to the pulping of triticale straw. *Industrial Crops and Products* **2001**, 14, 139-144.
33. Watanabe T., Kaizu S., Koshijima T., Binding sites of carbohydrates moieties toward lignin in "lignin-carbohydrate complexes". *Chemical Letters* **1986**, 11, 1871-1874.
34. Watanabe T., Structural studies on the covalent bonds between lignin and carbohydrate in lignin-carbohydrate complexes by selective oxidation of the lignin with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone. *Wood Research* **1989**, 76, 59-123.
35. Grabber J. H., Ralph J., Lapierre C., Barrière Y., Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I Lignin-cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies* **2004**, 327, 455-465.
36. Jacquet G., Pollet B., Lapierre C. Mhamdi F. Rolando C., New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43, 2746-2751.
37. Jacquet G. Structure et réactivité des lignines de graminées et acides phénoliques associés. (Structure and reactivity of grass lignins and associated phenolic acids). Thèse de Doctorat de l'Université de Aix-Marseille III, **1997**, 181 p.
38. Iiyama K., Lam T. B. T., Stone B. A., Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology* **1994**, 104, 315-320.
39. Houtman C. J., Atalla R. H., Cellulose-lignin Interactions. *Plant Physiology* **1995**, 107, 977-984.
40. Besombes S., Mazeau, K., The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 2: seeking for evidence organization of lignin molecules at the interface with cellulose. *Plant Physiology and Biochemistry* **2005**, 43, 277-286.
41. Baeza J., Freer, J., Chemical characterization of wood and its components. In *Wood and Cellulosic Chemistry*, Hon, D. N. S.; Shiraishi, N., Ed Marcel Dekker: New York, **2001**, 275-284.
42. Habibi Y., Vignon M. R., Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 340, 1431-1436.
43. Ebringerová A., Structural Diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia* **2006**, 232, 1-12.
44. Gröndahl M., Gatenholm P., Role of acetyl substitution in hardwood xylan. *Polysaccharides* **2005**, 509-514.

45. Li J., Gellerstedt G., The contribution to kappa number from hexeuronic acid groups in pulp xylan. *Carbohydrate Research* **1997**, 302, 213-218.
46. Shatalov A. A., Pereira H., Impact of hexenuronic acids on xylanase-aided bio-bleaching of chemical pulps. *Bioresource Technology* **2009**.
47. Monties B., Catesson A. M., Roland J. C., Barnoud F., Joseleau J. P., Tollier M. T., Mercier C., Thibault J. F., Metche M., Lestang-Bremond G. D., Janin G., *Les Polymères végétaux - Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*. Ed Gauthier-Villars.; **1980**, 345 p.
48. Ligeró P., Villaverde J. J., de Vega A., Bao M., Delignification of *Eucalyptus globulus* saplings in two organosolv systems (formic and acetic acid) Preliminary analysis of dissolved lignins. *Industrial Crops and Products* **2008**, 27, 110-117.
49. Hergert H. L., *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. Young R.A, Akhtar M Ed.; Wiley: New York, **1998**, 5-67.
50. Dapia S., Santos V., Parajo J. C., Study of formic acid as an agent for biomass fractionation. *Biomass and Bioenergy* **2002**, 22, 213-221.
51. Sun J. X., Sun R. C., Sun X. F., Su Y. Q., Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research* **2004**, 339, 291-300.
52. Xu F., Sun J. X., Sun R. C., Fowler P., Baird M. S., Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products* **2006**, 23, 180-193.
53. Parkas J., Brunow G., Lundquist K., Quantitative lignin analysis based on permanganate oxidation. *BioResources* **2007**, 2, 169-178.
54. Green J. W., Wood cellulose. In *Methods of carbohydrate chemistry* R.L, W., Ed. Academic Press: New York, **1963**, 9-21.
55. Adams G. A., Arabinoglucuronoxylan, arabinoxylan, and xylan; purification using a copper complex and purification by fractional precipitation of acetates. In *Carbohydrate chemistry*, Press, A., Ed. New York, **1965**; Vol. V, 170-175.
56. Sigoillot C., Camarero S., Vidal T., Record E., Asther M., Perez-Boada M., Martinez M. J., Sigoillot J. C., Asther M., Colom J. F., Martinez A. T., Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology* **2005**, 115, 333-343.
57. Gharibian S., Etude d'enzymes et de réactifs biomimétiques pour l'industrie papetière. Thèse de Doctorat de l'Université de Grenoble 1, Saint-Martin-d'Hères **1993**, 193 p.
58. Kondo R., Harazono K., Sakai K., Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. *Applied and Environmental Microbiology* **1994**, 60, 4359-4363.
59. Iimori T., Miyawaki S., Machida M., Murakami K., Biobleaching of unbleached and oxygen-bleached hardwood kraft pulp by culture filtrate containing manganese peroxidase

- and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Wood Science* **1998**, 44, 451-456.
60. Gold M. H., Glenn J. K., Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* **1988**, 161, 258-264.
61. Edwards S. L., Raag R., Wariishi H., Gold M. H., Poulos T. L., Crystal structure of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90, 750-754.
62. Crestini C., Saladino R., Tagliatesta P., Boschi T., Biomimetic degradation of lignin and lignin model compounds by synthetic anionic and cationic water soluble manganese and iron porphyrins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **1999**, 7, 1897-1905.
63. Call H. P., Mücke I., History, overview and applications of mediated lignolytic systems especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *Journal of Biotechnology* **1997**, 53, 163-202.
64. Mayer A. M., Staples R. C., Laccase: new functions for an old enzymes. *Phytochemistry* **2002**, 60, 551-565.
65. Bertrand G., Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1985**, 120, 266-269.
66. Barreca A. M., Fabbrini M., Galli C., Gentili P., Ljunggren S., Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* **2003**, 26, 105-110.
67. Baiocco P., Barreca A. M., Fabbrini M., Galli C., Gentili P., Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, 191-197.
68. Bourbonnais R., Paice M. G., Reid I. D., Lanthier P., Yaguchi M., Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* **1995**, 61, 1876-1880.
69. Chakar F. S., Ragauskas A. J., Biobleaching of high lignin content kraft pulps via laccase-mediator systems. In *TAPPI Pulping Conference*, Montreal, Quebec, **1998**, 109-118.
70. Lund M., Felby C., Wet Strength improvement of unbleached kraft pulp through laccase catalyzed oxidation. *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, 28, 760-765.
71. Camarero S., Ibarra D., Martinez A. T., Romero J., Gutiérrez A., Rio J. C., Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, 40, 1264-1271.
72. Song R., Robert A., Bernadou J., Meunier B., Sulfonated and acetamidodisulfonated tetraarylporphyrins as biomimetic oxidation catalysts under aqueous conditions. *Inorganic Chimica Acta* **1998**, 272, 228-234.

73. Dolphin D., Traylor T. C., Xie L. Y., Polyhaloporphyrins: Unusual ligands for metals and metal-catalyzed oxidations. *Accounts of Chemical Research* **1997**, 30, 251-259.
74. Crestini C., Pastorini A., Tagliatesta P., Metalloporphyrins immobilized on montmorillonite as biomimetic catalysts in the oxidation of lignin model compounds. *Journal of Catalysis A: Chemical* **2004**, 208, 195-202.
75. d'Alessandro N., Tonucci L., Bressan M., Dragani L. K., Morvillo A., Rapid and selective oxidation of metallosulphthalocyanines prior to their usefulness as precatalysts in oxidation reactions. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2003**, 1807-1814.
76. Cui F., Dolphin D., Metallophthalocyanines as possible lignin peroxidase models. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **1995**, 3, 471-477.
77. Sanchez M., Hadasch A., Fell R. T., Meunier B., Key role of the phosphate buffer in the H₂O₂ oxidation of aromatic pollutants catalyzed by iron tetrasulphthalocyanine. *Journal of Catalysis* **2001**, 202, 177-186.
78. Sorokin A., Fraise L., Rabion A., Meunier B., Metallophthalocyanine-catalyzed oxidation of catechols by H₂O₂ and its surrogates. *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical* **1997**, 117, 103-114.
79. Stergiou D. V., Veltsistas, P. G., Prodromidis M. I., An electrochemical study of lignin films degradation: Proof-of-concept for an impedimetric ozone sensor. *Sensors and Actuators B* **2008**, 129, 903-908.
80. Pipon G., Chirat C., Lachenal D., *Utilisation de l'ozone pour détruire les groupements chromophores présents dans une pâte papetière chimique mi-blanchie et atteindre des niveaux de blancheur élevés*; Rapport d'activité du Laboratoire de Génie des Procédés Papetiers - UMR 5518: Grenoble, **2006**.
81. Denim V. A., Shereshevets V. V., Monakov J. B., Reactivity of lignin and problems of its oxidative destruction with peroxide reagents. *Russian Chemical Reviews* **1999**, 68, 937-956.
82. Lyse T. E. A Study on ozone modification of lignin in alkali-fiberized wood. Lawrence, Thèse de Doctorat, Appleton, Wisconsin, **1979**, 212 p.
83. Hwang K.-O., Lucia L. A., Fundamental insights into the oxidation of lignocellulosics obtained from singlet oxygen photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2004**, 168, 205-209.
84. Crestini C., D'Auria M., Singlet oxygen in the photodegradation of lignin models. *Tetrahedron* **1997**, 53, 7877-7888.
85. Tanaka K., Canalag R. C. R., Hisanaga T., Photocatalysed degradation of lignin on TiO₂. *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical* **1999**, 138, 287-294.
86. Antunes C. S. A., Bietti M., Salamone M., Scione N., Early stage in the TiO₂-photocatalyzed degradation of simple phenolic and non-phenolic model compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* **2004**, 163, 453-462.

87. Kansal S. K., Singh M., Sud D., Studies on TiO₂/ZnO photocatalysed degradation of lignin. *Journal of Hazardous Materials*, **2008**, 153, 412-417.
88. DeRosa M. C., Crutchley R. J., Photosensitized singlet oxygen and its application. *Coordination chemistry Reviews* **2002**, 233-234, 351-371.
89. Kluson P., Drobek M., Kalaji A., Krysa J., Rakusan J., Singlet oxygen photogeneration efficiencies of a series of phthalocyanines in well-defined spectral regions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* **2008**, 199, 267-273.
90. Crestini C., Pro P., Neri V., Saladino R., Methyltrioxorhenium: a new catalyst for the activation of hydrogen peroxide to the oxydation of lignin and lignin model compounds. *Bioorganic and Medecinal Chemistry* **2005**, 13, 2569-2578.
91. Crestini C., Caponi M. C., Argyropoulos D. S., Saladino R., Immobilized methyltrioxo rhenium (MTO)/H₂O₂ systems for the oxidation of lignin and lignin model compounds. *Bioorganic and Medecinal Chemistry* **2006**, 14, 5292-5302.
92. Timell T. E., Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology* **1965**, 1, 45-70.
93. Reicher F., Correa J. B. C., Gorin P. A. J., Location of *O*-acetyl groups in the acidic-D-xylan of *mimosa scabrella (bracatinga)*. A study of *O*-acetyl group migration. *Carbohydrate Research* **1984**, 135, 129-140.
94. Teleman A., Tenkanen M., Jacobs A., Dahlman O., Characterization of *O*-acetyl-(4-*O*-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. *Carbohydrate Research* **2002**, 337, 373-377.
95. Rutenberg M. W., Herbst W. M., Extraction of hemicellulose from corn bran. Brevet US 2801955 19570806, **1957**.
96. Joseleau J. P., Les hémicelluloses. Ed. Bordas: **1980**, 87-121.
97. Mares D. J., Stone B. A., Wheat endosperm, II, Properties of the wall components and studies on their organization in the wall. *Australian Journal of Biological Sciences* **1973**, 26, 813-830.
98. Shimizu K., Chemistry of hemicelluloses. In *Wood and cellulosic chemistry*, Hon D.N.S., S. N., Ed. Marcel Dekker: New York, **1991**, 177-214.
99. Bochicchio R., Reicher F., Are hemicelluloses from *Podocarpus lambertii* typical of gymnosperms? *Carbohydrate Polymers* **2003**, 53, 127-136.
100. Browning B. L., *Methods of wood chemistry*. Ed Wiley: **1967**, Vol. II, 495 p.
101. Johansson M. H., Samuelson O., Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation. *Wood Science and Technology* **1977**, 11, 251-263.
102. Hansson J. A., Hartley N., Alkaline degradation of xylns from birch and pine. *Svensk Papperstidning* **1968**, 71, 358-365.

103. Lai Y. Z., Chemical degradation. In *Wood and cellulosic chemistry*, 2nd Edition ., Ed. Marcel Dekker: New York, **2001**, 443-512.
104. Khan A. W., Lamb K. A., Overend R. P., Comparison of natural hemicellulose and chemically acetylated xylan as substrates for the determination of acetyl-xylan esterase activity in *Aspergilli*. *Enzyme and Microbial Technology* **1990**, 12, 127-131.
105. Teleman A., Lundqvist J., Tjenneld F., Stalbrand H., Dahlman O., Characterization of acetylated 4-*O*-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **2000**, 329, 807-815.
106. Hromádková Z., Kováčiková J., Ebringerová A., Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan. *Industrial Crops and Products* **1999**, 9, 101-109.
107. Yang R., Xu S., Wang Z., Yang W., Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. *LWT* **2005**, 38, 677-682.
108. Korte H. E., Offermann W. Puls J., Characterization and preparation of substituted xylo-oligosaccharides from steamed birchwood. *Holzforschung* **1991**, 45, 419-424.
109. Sun X. F., Sun R. C., Fowler P., Baird M. S., Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 860-870.
110. Krawczyk H., Persson T., Andersson A., Jönsson A. J., Isolation of hemicelluloses from barley husks. *Food and Bioproducts Processing* **2008**, 86, 31-36.
111. Toma M., Vinatoru M., Paniwnyk L., Mason T. J., Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* **2001**, 8, 137-142.
112. Vinatoru M., Toma M., Radu O., Filip P. I., Lazurca D. Mason T. J., The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry* **1997**, 4, 135-139.
113. Bendicho C., Lavilla I., Ultrasound extractions. *Encyclopedia of Separation Science*, Ed I.D. Wilson, Academic Press: **2000**, 1448-1454.
114. Hromádková Z., Ebringerová A., Valachovic P., Comparison of classical and ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *Ultrasonics Sonochemistry* **1999**, 5, 163-168.
115. Hromádková Z., Ebringerová, A., Ultrasonic extraction of plant materials-investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls. *Ultrasonics Sonochemistry* **2003**, 10, 127-133.
116. Hromádková Z., Kost'álová H., Ebringerová A., Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran. *Ultrasonics Sonochemistry* **2008**, 15, 1062-1068.
117. Sparr-Eskilsson C., Björklund E., Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* **2000**, 902, 227-250.

118. Jacobs A., Lundqvist J., Stalbrand H., Tjerneld F., Dahlman O., Characterization of water-soluble hemicelluloses from spruce and aspen employing SEC/MALDI mass spectroscopy. *Carbohydrate Research* **2002**, 337, 711-717.
119. Jacobs A., Palm M., Zacchi G., Dahlman O., Isolation and characterization of water-soluble hemicelluloses from flax shive. *Carbohydrate Research* **2003**, 338, 1869-1876.
120. Dubois M., Gille K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **1986**, 28, 350-356.
121. Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., Method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **1973**, 54, 484-489.
122. Montreuil J., Spik G., Chosson A., Segard E., Sheppler N., Methods of study of the structure of glycoproteins. *Journal de Pharmacie de Belgique* **1963**, 18, 529-546.
123. Somogyi M., Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* **1952**, 195, 19-23.
124. Lever M., New reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem* **1972**, 47, 273-279.
125. Blakeney A. B., Harris P. J., Henry R. J., Stones B. A., Characterization of neutral acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* **1983**, 113, 219-299.
126. Chambers R. E., Clamp J. R., An assessment of methanolysis and other factors used in analysis of carbohydrate-containing material. *Biochemical Journal* **1971**, 125, 1009-1018.
127. Huang Y. Z., Indrarti L., Azuma J., Okamura K., Simultaneous determination of xylose and uronic acid in beech xylan by methanolysis. *Mokuzai Gakkaishi* **1992**, 38, 1168-1171.
128. Kamerling J. P., Gerwing G. J., Vliegthant J. F. G., Clamp J. R., Characterization by gas-liquid chromatography mass spectroscopy of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochemical Journal* **1975**, 151, 491-495.
129. Bleton J., Mejanelle P., Sansoulet J., Goursaud S., Tchaplal A., Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums. *Journal of Chromatography A* **1996**, 720, 27-49.
130. Biermann C. J., Introduction to analysis of carbohydrates by gas-liquid chromatography (GLC). In *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Biermann C.J., McGinnis G. D., Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 1-17.
131. Englmaier P., Carbohydrate trifluoroacetates. In *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 127-141.
132. Black G. E., Fox A., Recent progress in the analysis of sugar monomers from complex matrixes using chromatography in conjunction with mass spectrometry or stand-alone tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1996**, 720, 51-60.

133. McGinnis G. D., High performance liquid chromatography (HPLC) of carbohydrates. In *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 19-26.
134. Neeser J. R., Schweiser T. F., Analysis of carbohydrates as *O*-alkyloxime derivatives by gas-liquid chromatography (GLC). In *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, Ed. CRC Press: Boca Raton, **1989**, 143-155.
135. Michalski J. C., Analysis of monosaccharides by GLC and by HPLC. In *Methods on glycoconjugates*, Verbert, A. E., Ed. Harwood Academic Press: Chur, Switzerland, **1986**, 31-38.
136. Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spick G., Strecker G., *Glycoproteins*. Chaplin M.F and Kennedy Ed.; IRL Press: Oxford, Washington D.C, **1986**, 143-204.
137. Gröndahl M., Telemann A., Gatenholm P., Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood. *Carbohydrate Research* **2003**, 52, 359-366.
138. Van Hazendonk J. M., Reinerink E. J. M., Waard P. D., Dam J. E. G. V., Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax. *Carbohydrate Research* **1996**, 291, 141-154.
139. Evtuguin D. V., Tomas J. L., Silva A. M. S., Neto V. P., Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research* **2003**, 338, 597-604.
140. Barbat A., Développement d'une nouvelle approche d'extraction de xylanes de châtaignier assistée par micro-ondes, Diplôme d'Etudes Approfondies de l'Université de Limoges, **2006**, 27 p.
141. Gonçalves V. M. F., Evtuguin D. V., Domingues M. R. M., Structural characterization of the acetylated heteroxylan from the natural hybrid *Paulownia elongata/ Paulownia fortunei*. *Carbohydrate Research* **2008**, 343, 256-266.
142. Bonnin E., Renard C., Thibault J. F., Ducroo P., Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisations alimentaires. In *Enzymes en agroalimentaire*, V., L.-G., Ed. Techniques et documentation Lavoisier: Paris, **1997**, 169-197.
143. Nishitani K., Nevins D. J., Glucuronoxylan xylanohydrolase a unique xylanase with the requirement for appendant glucuronosyl units. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 6539-6543.
144. Siika-Aho M., Tenkanen M., Buchert J., Puls J., Viikari L., An alpha-glucuronidase from *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, 16, 813-819.
145. Biely P., MacKenzie C. R., Puls J., Schneider H., Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Bio/Technology* **1986**, 4, 731-733.
146. Spàniková S., Biely P., Glucuronyl esterase- novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Letters* **2006**, 580, 4597-4601.

147. BeMiller J. N., Acid-catalysed hydrolysis of glycosides. *Advances in Carbohydrates Chemistry* **1967**, 22, 25-108.
148. Ciancia M., Cerezo A. S., Autohydrolysis of polysaccharides. *Ciencia e cultura* **1993**, 45, 54-61.
149. McCleary 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. *Carbohydrate Research* **1967**, 5, 493-495.
150. Lawson C. J., McCleary 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. *Biochemical Journal* **1969**, 115, 947-958.
151. Lindberg B., Lonngren J., Thompson J. L., Degradation of polysaccharides containing uronic acid residues. *Carbohydrate Research* **1973**, 28, 351-357.
152. Karas M., Hillenkamp F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 2299-2301.
153. Fournet B., Apports de la spectrométrie de masse à l'étude d'oligosaccharides et de glycoconjugués. *Les cahiers Imabio, Spectrométrie de masse CNRS* **1991**, 1, 47-58.
154. Garozzo D., Spina E., Cozzolino R., Cescutti P., Fett W. F., Studies on the primary structure of short polysaccharides using SEC MALDI mass spectroscopy. *Carbohydrate Research* **2000**, 323, 139-146.
155. Cheng G., Fan X., Liu G., Liu Y., Determination of molecular weight of polyethylene glycol using size-exclusion chromatography with multi-angle laser light scattering and acid-base titration. *Polymer Testing* **2009**, 28, 145-149.
156. Ebringerová A., Sroková I., Talàba P., Kacuràková M., Hromàdková Z., Amphiphilic beechwood glucuronoxylan derivatives. *Journal of Applied Polymer Science* **1998**, 67, 1523-1530.
157. Ebringerová A., Heinze, T., Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties. *Macromolecular Rapid Communication* **2000**, 21, 542-556.
158. Gabriellii I., Gatenholm P., Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *Journal of Applied Polymer Science* **1998**, 69, 1661-1667.
159. Gabriellii I., Gatenholm P., Glasser W. G., Jain R. K., Kenne L., Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 43, 367-374.
160. Soderqvist-Lindblad M., Ranucci E., Albertsson A. C., Biodegradable polymers from renewable sources. New hemicellulose-based hydrogels. *Macromolecular Rapid Communications* **2001**, 22, 962-967.
161. Lloyd L. L., Kennedy J. F., Methacanon P., Paterson M., Knill C. J., Carbohydrate polymers as wound management aids. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 37, 315-322.

162. El-Ashmawy A. E., Mobarak, F., El-Kaliobi, S., Hemicelluloses as additives in papermaking.III. Effects of hemicelluloses isolated from plant raw materials compared to the effect of those isolated from pulps on paper properties. *Cellulose Chemistry and Technology* **1976**, 10, 637-640.
163. Hensel A., Schmidgall J., Kreis W., The plant cell wall - A potential source for pharmacologically active polysaccharides. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **1998**, 73, 37-43.
164. Ebringerová A., Hromádková Z., Alfödi J., Hribalová V., The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: extractability, structure and properties. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 37, 231-239.
165. Ebringerová A., Kardosová A., Hromádková Z., Maloviková A., Hribalová V., Immunodulatory activity of acidic xylans in relation to their structural and molecular properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **2002**, 30, 1-6.
166. Kardosová A., Ebringerová A., Alfödi J., Nosál'ová G., Matáková T., Hribalová V., Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 57, 165-176.
167. Nabarlantz D., Montané D., Kardosová A., Bekesová, S., Hribalová V., Ebringerová A., Almond shell xylo-oligosaccharides exhibiting immunostimulatory activity. *Carbohydrate Research* **2007**, 342, 1122-1128.
168. Samuelsen A. B., Lund I., Djahromi J. M., Paulsen B. S., Wold J. K., Knutsen S. H., Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers* **1999**, 38, 133-143.
169. Capek P., Machova E., Turjan J., Scavenging and antioxidant activities of immunomodulating polysaccharides isolated from *Salvia officinalis* L. *International Journal of Biological Macromolecules* **2009**, 44, 75-80.
170. Kardosová A., Machová E., Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia* **2006**, 77, 367-373.
171. Ebringerová A., Hromádková Z., Kost'alová Z., Sasinková V., Chemical valorization of agricultural by-products: isolation and characterization of xylan-based antioxidants from almond shell biomass. *BioResources* **2008**, 3, 60-70
172. Rao R. S. P., Muralikrishna G., Water soluble arabinoxylans from rice and ragi: Changes upon malting and their consequences on antioxidant activity. *Phytochemistry* **2006**, 67, 91-99
173. Kardosová A., Maloviková A., Pätoprsty V., Nosál'ová G., Matáková T., Structural characterization and antitussive activity of a glucuronoxylan from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 47, 27-33.
174. Cipriani T. R., Mellinger C. R., Souza L. M. D., Baggio C. H., Freitas C. S., Marques M. C. A., Gorin P. A. J., Sasaki G. L., Iacomini M., Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 74, 274-278.

175. Stone A. L., Melton D. J., Lewis M. S., Structure-function relations of heparin-mimetic sulfated xylan oligosaccharides : inhibition of Human Immunodeficiency Virus-1 infectivity *in vitro*. *Glycoconjugate Journal* **1998**, 15, 697-712.
176. Yoshida T., Kang B. W., Hattori K., Mimura T., Kaneko Y., Nakashima H., Premanathan M., Aragaki R., Yamamoto N., Uryu T., Anti-HIV activity of sulfonated arabinofuranan and xylofuranan. *Carbohydrate Polymers* **2001**, 44, 141-150.
177. Chanliaud E., Extraction, caractérisation, et propriétés fonctionnelles des hétéroxylanes de son de maïs. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris VII, Paris IX, et E.N.S.I.A, **1995**, 129 p.
178. Garcia R. B., Nagashima Jr T., Praxedes A. K. C., Raffin F. N., Moura T. F. A. L., Do Egito E. S. T., Preparation of micro and nanoparticules from corn cobs xylan. *Polymer Bulletin* **2001**, 46, 371-379.
179. Silva A. K. A., Silva E. L. D., Oliveira E. E., Nagashima Jr T., Soares L. A. L., Medeiros A. C., Araújo J. H., Araújo I. B., Carriço A. S., Egito E. S. T., Synthesis and characterization of xylan-coated magnetite microparticules. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 334, 42-47.
180. Fredon E., Obtention de films plastiques hydrophobes à partir de polysaccharides contenus dans des co-produits agricoles. Thèse de Doctorat de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, **2001**, 173 p.
181. Ruiz G., Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, **2005**, 230 p.
182. Joly N., Synthèse et caractérisation de nouveaux films plastiques obtenus par acylation et réticulation de la cellulose. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, **2003**, 200 p.
183. Hansen N. M. L., Plackett D., Sustainable Films and Coatings from Hemicelluloses: A Review. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1493-1505.
184. Höije A., Gröndahl M., Tommeraas K., Gatenholm P., Isolation and characterization of physical and material properties of arabinoxylans from barley husks. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 61, 266-275.
185. Sternemalm E., Höije A., Gatenholm P., Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films. *Carbohydrate Research* **2008**, 343, 753-757.
186. Kayserilioglu B. S., Bakir U., Yilmaz L., Akkas N., Use of xylan, an agricultural by product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. *Bioresources Technology* **2003**, 87, 239-246.
187. Vasquez M. J., Alonso J. L., Dominguez H., Parajo J. C., Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology* **2000**, 11, 387-393.
188. Moure A., Gullon P., Dominguez H., Parajo J. C., Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry* **2006**, 41, 1913-1923.

189. Christakopoulos P., Katapodis P., Kalogeris E., Kekos D., Macris B. J., Stamatis H., Skaltsa H., Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases *International Journal of Biological Macromolecules* **2003**, 31, 171-175.
190. Vazquez M. J., Alonso J. L., Dominguez H., Parajo J. C., Enhancing the potential of oligosaccharides from corncob autohydrolysis as prebiotic food ingredients. *Industrial Crops and Products* **2006**, 24, 152-159.
191. Ando H., Ohba H., Sakaki T., Takamine K., Kamino Y., Moriwaki S., Bakalova R., Uemura Y., Hatate Y., Hot-compressed-water decomposed products from bamboo manifest a selective cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia cells. *Toxicology in Vitro* **2004**, 18, 765-771.
192. Grittenden R. G., Playne M. J., Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* **1996**, 7, 353-361.
193. Ebringerová A., Hromádková Z., Xylans of industrial and biomedical importance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **1999**, 16, 325-346.
194. Stone A. L., Melton D. J., Lewis M. S., Structure-function relations of heparin-mimetic sulfated xylan oligosaccharides: inhibition of Human Immunodeficiency Virus-1 infectivity *in vitro*. *Glycoconjugate Journal* **1998**, 15, 697-712.
195. Brisson S., Rigal L., Manolas C. Gaset A., Les hémicelluloses de plantes annuelles, une source d'ingrédients fonctionnels et de matériaux pour de nouvelles valorisations non-alimentaires des grandes productions agricoles. In *Valorisations non-alimentaires des grandes productions agricoles*, Editions, I., Ed. Nantes, **1994**, 231 p.
196. Ren J. L., Peng F., Sun R. C., Kennedy J. F., Influence of hemicellulosic derivatives on the sulfate kraft pulp strength. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 75, 338-342.
197. Ren J. L., Peng F., Sun R. C., Preparation and characterization of hemicellulosic derivatives containing carbamoylethyl and carbamoylethyl groups. *Carbohydrate Research* **2008**, 343, 2776-2782.
198. Schiwikal K., Heinze T., Dialkylaminoethyl xylans: polysaccharide ethers with pH-sensitive solubility. *Polymer Bulletin* **2007**, 59, 161-167.
199. Vincendon M., Xylan derivatives: aromatic carbamates. *Makromolekulare Chemie* **1993**, 194, 321-328.
200. Tabata K., Ito W., Kojima T., Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* fries. *Carbohydrate Research* **1981**, 89, 121-135.
201. Yanaki T., Ito W., Tabata K., Kojima T., Norisuye T., Takano, N., Fujita H., Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. *Biophysical Chemistry* **1983**, 17, 337-342.
202. Kitamura S., Hori A., Kurita K., Takeo K., Hara C., Itoh W., Tabata K., Elgsaeter A., Stokke B. J., An antitumor, branched (1-3)- β -D-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus* *Carbohydrate Research* **1994**, 263, 111-121.

203. Zhang M., Zhang L., Cheung P. C. K., Ooi V. E. C., Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers* **2004**, 56, 123-128.
204. Hashi M., Takeshita T., Antitumor effect of 4-*O*-methylglucuronoxylan on solid tumor in mice. *Agricultural Biology and Chemistry* **1979**, 43, 951-959.
205. Hashi M., Takeshita T., Host-mediated antitumor effect of 4-*O*-methylglucuronoxylan. *Agricultural Biology and Chemistry* **1979**, 43, 961-967.
206. Moine C., Krausz P., Chaleix V., Sainte-Catherine O., Kraemer M., Gloaguen V., Structural Characterization and cytotoxic properties of a 4-*O*-Methylglucuronoxylan from *Castanea Sativa*. *Journal of Natural Products* **2007**, 70, 60-66.
207. Barbat A., Gloaguen V., Moine C., Sainte-Catherine O., Kraemer M., Rogniaux H., Ropartz D., Krausz P., Structural characterization and cytotoxic properties of a 4-*O*-methylglucuronoxylan from *Castanea sativa*. 2. Evidence of a structure-activity relationship. *Journal of Natural Products* **2008**, 71, 1404-1409.
208. Popa V. I., Hemicelluloses. In *Polysaccharides in Medicinal Applications*, **1996**, 107-124.
209. Grillaud M., Bandon D., Nancy J., Delbos Y., Vaysse F., Les polyols en odontologie pédiatrique: intérêt du xylitol. *Archives de pédiatrie* **2005**, 12, 1180-1186.
210. Gandini A., Belgacem M. N., Furans in Polymer Chemistry. *Progress in Polymer Science* **1997**, 22, 1203-1379.
211. Gandini A., Belgacem M. N., Le furfural et les polymères furaniques. *L'Actualité Chimique* **2002**, 258-259, 56-61.
212. Cavezza A., Boulle C., Guéguiniat A., Pichaud P., Trouille S., Ricard L., Dalko-Csiba M., Synthesis of Pro-XylaneTM: A new biologically active C-glycoside in aqueous media. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 845-849.
213. Laverdan G. Vers une valorisation chimique des coproduits forestiers. Place de l'innovation dans la filière bois. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, **2007**, 150 p.
214. Moine C., Gloaguen V., Gloaguen J., 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. *Journal of Environmental Science and Health B* **2004**, 39, 627-40.
215. Benhaddou-Zerrouki R., Christen J., Granet R., Krausz P., Laverdan G., Process modification of wood and wood by-products for obtaining plastic materials. Brevet FR2879120 (A1) **2006**.
216. Grondahl M., Eriksson L., Gatenholm P., Material properties of plasticized hardwood xylans for potential application as oxygen barrier films. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1528-1535.

217. Bailey R. W., Quantitative studies of ruminant digestion II, Loss of ingested plant carbohydrates from the reticulo-rumen. *New Zealand Journal Of Agricultural Research* **1967**, 10, 15-32.
218. Carpita N. C., Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. *Phytochemistry* **1984**, 23, 1089-1093.
219. Sun R. C., Tomkinson J., Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydrate Polymers* **2002**, 50, 263-271.
220. Vodenicarová M., Drimalová G., Hromadková Z., Maloviková A., Ebringerová A., Xyloglucan degradation using different radiations sources: A comparative study. *Ultrasonics Sonochemistry* **2006**, 13, 157-164.
221. Crawford R. L., Crawford D. L., Recent advances in studies of the mechanisms of microbial degradation of lignins. *Enzyme and Microbial Technology* **1984**, 6, 434-442.
222. Pereira, H., Dosage des tanins de *Quercus suber* L. *Anais Inst. Sup. Agronomia XL* **1981**, 9-15.
223. Srebotnik E., Hammel K. E., Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology* **2000**, 81, 179-188.
224. Klein-Koerkamp C., Granet R., Zerrouki R., Villandier N., Jérôme F., Barrault J., Krausz P., Efficient oxidative modification of polysaccharide in water using H₂O₂ activated by iron sulfophthalocyanine *Carbohydrate Polymers* **2009**.
225. Weber J. H., Bush D. H., Complexes Derived from Strong Field Ligands. XIX. Magnetic properties of transition metal derivatives of 4, 4', 4'', 4'''-tetrasulfophthalocyanine. *Inorganic Chemistry* **1965**, 4, 469-471.
226. Hadash A., Sorokin A., Rabion A., Meunier B., Sequential addition of H₂O₂, pH and solvent effects as key factors in the oxidation of 2,4,6-trichlorophenol catalyzed by iron tetrasulfophthalocyanine. *New Journal of Chemistry* **1998**, 22, 45-51.
227. Pasiuk-Bronikowska W., Krajewska M., Flis-Kabulska I., Transformations of manganese tetrasulfophthalocyanines in oxydative conditions. *Polyhedron* **1998**, 18, 561-570.
228. Kachkarova-Sorokina S. L., Gallezot P., Sorokin A. B., A novel clean catalytic method for waste-free modification of polysaccharides by oxidation. *Chemical Communication* **2004**, 24, 2844-2845.
229. Pommerening K., Rein H., Bertram D., Müller R., Estimation of dialdehyde groups in 2,3-dialdehyde bead-cellulose. *Carbohydrate Research* **1992**, 233, 219-233.
230. Kluson P., Drobek M., Strasak T., Krysa J., Karaskova M., Rakusan J., Sulfonated phthalocyanines as effective oxidation photocatalysts for visible and UV light regions. *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical* **2007**, 272, 213-219.

231. d'Alessandro N., Tonucci L., Morvillo A., Dragani L. K., Deo M. D. Bressan M., Thermal stability and photostability of water solutions of sulfophthalocyanines of Ru(III), Cu(II), Ni(II), Fe(II) and Co(II). *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, 690, 2133-2141.
232. Gloaguen V., Krausz P., Plant polysaccharides: A biologically active class of molecules. *SOFW Journal* **2004**, 130, 9, 20-26.
233. Jacobs A., Larsson P. T., Dahlman O., Distribution of uronic acids in xylans from various species of soft- and hardwood as determined by MALDI mass spectrometry. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 979-990.
234. Dahlman O., Jacobs A., Sjöberg J., Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose* **2003**, 10, 325-334.
235. Takahashi N., Koshijima T., Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Science and Technology* **1988**, 22, 231-241.
236. Pilo-Veloso D., de Nascimento E. A., Morais S. A. L., Isolation and structural analysis of lignins. *Quimica Nova* **1993**, 16, 435-448.
237. Marga F., Fressac V., Morvan H., Rapid gas liquid chromatography microanalysis of carbohydrates in woody plant tissues. *Journal of Trace and Microprobe Techniques* **1995**, 13, 473-478.
238. Cescutti P., Toffanin R., Pollesello P., Sutherland I. W., Structural determination of the acidic exopolysaccharide produced by a *Pseudomonas sp.* strain 1.15. *Carbohydrate Research* **1999**, 315, 159-168.
239. Malliri A., Symons M., Hennigan R. F., Hurlstone A. F., Lamb R. F., Wheeler T., Ozanne B. W., The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangements, motility, and in vitro invasion of A431 Cells *The Journal of Cell Biology* **1998**, 143, 1087-1099.
240. Melnyk O., Shuman M. A., Kim K. J., Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Research* **1996**, 56, 921-924.
241. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65, 55-63.

Annexes

Annexe 1

Méthode de calcul de la concentration en oses neutres et en 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 Spick¹²². A l'aide des solutions d'oses neutres (Xyl) et d'acides uroniques (GlcA) témoins, on détermine la pente de chaque droite étalon :

- Dosage au phénol : pente= α pour le Xyl
Pente= β pour le GlcA
- Dosage au MHDP : pente= α' pour le Xyl
Pente= β' pour le GlcA

A partir de ces pentes et en fonction des densités optiques (D.O) obtenues selon les dosages, les concentrations en acides uroniques (AU) et en oses neutres (ON) sont déterminées grâce aux formules suivantes :

- $D.O_{\text{phénol}} = \alpha [ON] + \beta [AU]$
- $D.O_{\text{MHDP}} = \alpha' [ON] + \beta' [AU]$

On a alors :

- $[ON] = [D.O_{\text{phénol}} - \beta [AU]] / \alpha$
- $[AU] = [D.O_{\text{MHDP}} - \alpha' D.O_{\text{phénol}}] / [(\alpha \beta' - \alpha' \beta) / \alpha]$

Annexe 2

Méthode de calcul de la quantité d'acide acétique pour le dosage par le kit enzymatique
(Boehringer Mannheim/R-Test Combination 148 261)

Calculation

According to the general equation for calculating the concentration:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]

d = light path [cm]

ϵ = extinction coefficient of NADH at:

340 nm = 6.3 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hg 365 nm = 3.4 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hg 334 nm = 6.18 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

It follows for acetic acid:

$$c = \frac{3.230 \times 60.05}{\epsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{1.940}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [g acetic acid/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

When analyzing solid and semi-solid samples which are weighed out for sample preparation, the result is to be calculated from the amount weighed:

$$\text{Content}_{\text{acetic acid}} = \frac{c_{\text{acetic acid}} \text{ [g/l sample solution]}}{\text{weight}_{\text{sample}} \text{ in g/l sample solution}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

**Conduite de Projet de recherche. Un nouveau chapitre de la
thèse**

Cadre général et enjeux de la thèse

Présentation succincte du sujet de thèse

Titre : « Extraction et valorisation biologique de polysaccharides de châtaignier »

Lors de mon travail de thèse, je me suis consacrée dans un premier temps, à extraire des polysaccharides c'est à dire des molécules de la famille des « sucres » à partir de bois de châtaignier en recourant à des méthodes de chimie verte d'extraction (solvants moins agressifs, non chlorés, prétraitements physiques...). Les molécules ont ensuite été caractérisées chimiquement (dosages colorimétriques, chromatographie haute et basse pression, en phase gaz, RMN, spectrométrie de masse...) afin d'évaluer l'incidence des traitements mis en place sur la structure des ces molécules. Enfin, ces molécules, des xylanes dans mon cas, ont été testées en oncologie moléculaire et cellulaire sur des cellules cancéreuses afin d'en déterminer l'activité. Une étude structure/activité a également été menée afin de comprendre l'étroite corrélation qui lie la structure chimique d'une molécule à son activité sur un système biologique donné.

Contexte de la thèse

L'industrie du bois très présente notamment dans le Limousin génère de nombreux co-produits qui ne sont pas toujours valorisés et qui pourtant sont riches en molécules essentiellement polysaccharidiques dont la particularité est d'être inépuisables puisque renouvelables. Il s'agissait ici de proposer de nouvelles voies d'extraction de ces molécules à haute valeur ajoutée. Pour cela des protocoles recourant aux enzymes ont été développés ainsi que l'utilisation de catalyseurs préalablement synthétisés. Par ailleurs, nous avons eu recours à des techniques d'extraction physiques comme les micro-ondes ou les ultrasons et limité l'utilisation de solvants. Outre un intérêt académique lié à l'étude de l'effet des divers traitements sur la structure des polysaccharides, ce sujet, en proposant de nouvelles pistes de valorisation biologique des glucuronoxylanes de bois, présente aussi un intérêt appliqué qui pourra être directement transposé aux entreprises régionales du secteur de la cosmétique et de la pharmacie.

Le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles est une unité pluridisciplinaire spécialisée, entre autres, dans la chimie des glucides. Un premier axe de recherche concerne la synthèse de molécules à visée thérapeutique, telles que les porphyrines utilisées en tant que photosensibilisateurs en photothérapie dynamique des cancers, et des analogues de nucléosides, des molécules développées en tant qu'antiviraux, anticancéreux et antibiotiques. Ce laboratoire s'intéresse également aux voies de valorisation des fractions cellulosiques et hémicellulosiques de co-produits agricoles et forestiers. Mon sujet de thèse est l'un des premiers à faire la jonction entre ces deux thématiques. En effet il s'agit bien de valoriser la fraction hémicellulosique (essentiellement composée de xylanes) de sciures de bois de châtaignier mais pour extraire ces molécules une étape préalable de dégradation des lignines, macromolécules qui assurent la rigidité du bois, est nécessaire. Lors de cette étape nous avons introduit des catalyseurs tels les phtalocyanines ou les porphyrines synthétisées bénéficiant ainsi de l'expérience du LCSN dans ce domaine. De tels protocoles n'ont à notre connaissance pas été reproduit sur une matrice végétale complexe telle que la sciure de bois.

Au cours de ce travail de thèse, de nombreuses compétences scientifiques et savoir-faire ont été mis à ma disposition, tels les protocoles d'extraction de polysaccharides végétaux et les méthodes d'analyses de ces molécules notamment en chromatographie en phase gaz. J'ai ainsi bénéficié de l'expérience et du travail des chercheurs et des doctorants du laboratoire en terme de glycobiologie et de chimie des glucides sur lesquels je me suis appuyée pour mener et faire avancer mon projet de thèse.

Mon intérêt s'est porté sur les polysaccharides végétaux car ce sont des molécules de structures très diversifiées, renouvelables et présentant de nombreuses perspectives en termes d'applications et de propriétés biologiques. De plus ce sont des molécules d'avenir et peuvent devenir de réelles alternatives à des produits issus de l'industrie pétrolière. Cette thèse s'inscrit logiquement à la fois dans la suite de mon DEA qui portait sur de nouvelles méthodologies d'extraction de xylanes mais aussi dans le projet qu'a le LCSN depuis quelques années déjà de valoriser les co-produits issus de la filière bois. Ce travail portait au départ sur l'extraction de xylanes alternatives à la méthode alcaline. Mais face à certaines difficultés, nous avons recentré nos recherches sur de nouvelles méthodes de délignification, les lignines étant des macromolécules intimement liées aux xylanes et qui empêchent leur extraction.

Gestion, évolution et coût du projet

Préparation et cadrage du projet

Tout projet qui se crée nécessite en amont une préparation mais également une évaluation des risques afin de limiter les échecs. Dans le cadre de ma thèse, la préparation a consisté en la recherche d'un financement qui s'est matérialisé sous la forme d'une bourse régionale. Des premières expériences réalisées lors du stage de master recherche ont permis de voir ce qui pourraient fonctionner et ainsi de donner un premier cadre à la thèse. Les nombreuses discussions avec mes encadrants le Docteur Vincent Gloaguen et le Professeur Pierre Krausz mais aussi avec les autres membres du laboratoire ont permis d'évaluer les risques mais également d'envisager une stratégie visant à limiter ces derniers au maximum.

Conduite du projet

Ce projet de thèse s'est déroulé entre octobre 2006 et juillet 2009 au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN, EA 1069) de l'Université de Limoges. Des points d'avancement réguliers avec mes encadrants ont eu lieu sans périodicité définie tandis que des réunions de laboratoire furent programmées au cours desquels les différents doctorants et stagiaires exposent leurs travaux, permettant ainsi une discussion constructive avec tous les autres acteurs du LCSN. Dans la première phase de mon travail, j'ai extrait et caractérisé structurellement des polysaccharides de différentes essences selon des méthodologies bien identifiées au laboratoire, ce qui m'a permis d'acquérir dès le début de la thèse les bases de l'extraction de biomolécules. Par la suite, une collaboration avec le Professeur Kraemer et Mme Sainte-Catherine du laboratoire d'Oncologie Moléculaire et Cellulaire de l'université de Paris XIII, a permis d'étudier l'activité cytotoxique de ces molécules sur des systèmes biologiques. En parallèle de nouvelles méthodologies d'extraction des polysaccharides impliquant des traitements physiques ont été expérimentées sans succès avec pour objectif de limiter le recours à des solvants polluants. Nous nous sommes alors réorientés vers l'établissement de nouveaux protocoles de délignification, étape préalable à l'extraction de nos polysaccharides d'intérêt. Dans un premier temps, je me suis appuyée sur ses connaissances en termes de biochimie pour développer un protocole enzymatique, protocole qui a nécessité la mise en place d'un plan d'expériences afin d'optimiser les paramètres de réaction. Les résultats n'étant pas à la hauteur de nos espérances, j'ai poursuivi ce travail par la synthèse de composés tels les phtalocyanines et les porphyrines mimant l'activité des enzymes précédemment utilisées mais moins sensibles à la température et au

pH. Pour cela, je me suis appuyée sur la solide expérience du Dr Vincent Sol pour la synthèse de ces molécules, utilisées pour l'étape de délignification des sciures, qu'elle soit chimique ou photochimique. Enfin, dans une dernière partie de ma thèse, je me suis intéressée aux propriétés antioxydantes des xylanes extraits selon les méthodologies innovantes détaillées auparavant. N'ayant pas toujours, les compétences, les savoir-faire et le matériel adéquat à certaines spécialités, tels les tests biologiques *in vitro* ou l'analyse en masse des produits, ce travail de thèse a bénéficié de collaborations avec différents partenaires résumées dans le tableau ci-dessous :

Laboratoire	Participation
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) UPRES EA 1069, Limoges	Laboratoire d'accueil
Laboratoire d'Oncologie Moléculaire et Cellulaire EA 3410, Paris XIII	Tests biologiques <i>in vitro</i> sur une lignée cancéreuse
RIO plateforme "Biopolymères-Interactions-Biologie Structurale UR 1268, INRA de Nantes	Spectres de masse MALDI des oligosaccharides
Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique CNRS UMR 7613, Paris VI	Spectres de masse des phtalocyanines et des porphyrines

Evaluation et prise en charge du coût du projet

Une évaluation du coût de la thèse a été faite en tenant compte des moyens en personnel, (selon leurs catégories et en y incluant les charges sociales), en matériel acheté qu'il soit du consommable ou du matériel d'investissement, les éventuelles prestations extérieures et les coûts d'infrastructure liés notamment au fonctionnement ou aux bâtiments (Tableau). Pour tout cela, le coût de ma thèse est estimé à près de 100 000 euros, 70% étant absorbés dans les ressources humaines. Le deuxième poste de dépense est l'ensemble des consommables (solvants, produits...) suivi de près par les infrastructures et le gros matériel. L'origine des ressources provient de la région et du fond social européen pour ma bourse en particulier mais aussi pour certains contrats de recherche obtenus par le laboratoire. Le ministère de la Recherche, en payant les enseignants-chercheurs du laboratoire mais aussi par des contrats est l'autre principal contributeur pour la charge financière de ma thèse. La réalisation de ce travail d'estimation des coûts et des charges m'a permis de réaliser qu'il n'était pas si aisé de prendre en compte tous les coûts que nécessite un projet et que parmi ces charges, les salaires sont ceux les plus importants.

	Détails		Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
	Salaire brut	Charges				
Ressources humaines						
Doctorant année 1	1165	0	12	1165	1	13980
Doctorant année 2	1254	0	12	1254	1	15048
Doctorant année 3 (charges = 30% du salaire brut)	1658,25	500	12	2158,25	1	25899
Encadrant 1 (charges = 40% du salaire brut)	3300	1320	36	166320	1/20	8316
Prime Encadrement	3360		3	3360	1/3	1120
Encadrant 2 (charges = 40% du salaire brut)	5200	2080	36	262080	1/50	5242
Prime Encadrement	6350		3	6350	1/8	794
Sous traitantes						500
Sous-total ressources humaines						70900
Consommables						
Fournitures expérimentale						
Dont verrerie						570
Dont solvants						370
Dont produits						6500
Dont bouteilles de gaz						700
Autres fournitures expérimentales						1600
Fournitures de bureau						30
Sous-total ressources consommables						9770
Infrastructures (entretien, loyer des locaux, électricité, eau , chauffage, secrétariat...)						8800
Matériel (amortissements)						
Matériel d'expérimentation						5500
Ordinateur de bureau et logiciel						1550
Sous-total ressources matériel						7050
Déplacements						
Congrès en France						350
Congrès à l'étranger						550
Sous-total ressources déplacements						900
Formation						
1ère année						170
2ème année						110
3ème année						300
Sous-total ressources formation						580
Documentation et communication						
Affranchissements, internet, téléphone						50
Communication impressions						150
Documentation (périodiques, livres...)						30
Sous-total ressources Documentation et communication						230
Total						98230

Compétences et savoir-faire

Au cours de ma thèse, j'ai développé de nombreuses expertises scientifiques liées à mon sujet de thèse notamment sur l'extraction, la valorisation et la modification de polysaccharides. En termes de compétences techniques, la maîtrise des techniques d'analyses des glucides, qui recourent à la HPLC, la RMN, la spectrométrie de masse, l'IR, les dosages colorimétriques et iodométriques. Cependant ces techniques d'analyse ne sont pas propres à mon domaine et peuvent être valorisées dans d'autres contextes. En termes pratique, en plus des techniques d'extraction de biomolécules de plantes, je possède également des bases de synthèse organique, mon sujet de thèse étant pluridisciplinaire, au croisement de la chimie organique, la biochimie et la biologie végétale. J'ai ainsi acquis des connaissances théoriques et pratiques en phytochimie et en enzymologie, connaissances que je n'avais pas eu l'occasion d'acquérir au cours de mon cursus universitaire.

J'ai également acquis une expérience pédagogique, sous la forme de vacations en troisième année de thèse. J'ai ainsi non seulement encadré des travaux pratiques pour des étudiants de licence mais j'ai mis au point certains de ces TP avec l'aide d'une technicienne. Ce travail, nécessitant beaucoup de temps et de créativité a été très formateur. Au près des étudiants, j'ai du apprendre à expliquer et réexpliquer différemment ainsi qu'à adapter ma communication et à parfois vulgariser pour mieux faire passer les informations. Ce fut également le cas lorsque j'ai eu à encadrer des étudiants de Licence et de Master. J'ai participé à la définition de leur sujet et de leurs objectifs à atteindre, à leur suivi jusqu'à la soutenance et à la correction de leur mémoire. Pour cela, des compétences pédagogiques ainsi qu'une certaine autorité furent nécessaires.

Le projet de thèse m'a permis de développer une certaine aisance à l'oral que je n'avais pas précédemment. En effet dans la recherche la communication est très importante et au cours de leur thèse, les doctorants sont amenés à présenter leurs travaux oralement mais aussi sous formes de posters lors de congrès nationaux ou internationaux comme cela fut mon cas. Il peut s'agir aussi d'articles, alors rédigés en anglais, qui paraissent dans des revues internationales. Un bon niveau d'anglais, des capacités de synthèse et/ou vulgarisation et de linguistiques sont alors requises lors de ces exercices.

En ce qui concerne le côté administratif, j'ai appris comment fonctionnait un laboratoire, j'ai acquis aussi des connaissances dans la gestion des stocks qui nécessite de

l'anticipation et de la concertation avec les autres membres du laboratoire au sujet des besoins de chacun en consommables notamment. Pour l'investissement dans du gros matériel, j'ai établi des devis en faisant les meilleurs compromis entre le coût et les performances souhaités pour les appareils voulus. Lors de problèmes de délais de livraison avec les fournisseurs, il a fallu les contacter et négocier avec eux, faisant appel à des qualités de diplomatie.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu à travailler en équipe soit avec des personnes extérieures au laboratoire ce qui m'a permis de me créer un réseau professionnel (cf tableau présentant les diverses collaborations), soit avec des personnes du laboratoire. De plus, la plupart des appareils d'expérimentation sont uniques et le nombre de hottes est quant à lui limitée mais plusieurs personnes en ont besoin et l'utilisent pour leurs travaux. Pour que le laboratoire fonctionne correctement, un minimum d'organisation est requis d'où la création de plannings où chacun s'inscrit en fonction de ses besoins. Ainsi, j'ai parfois du faire preuve de conciliation et de négociation, soit pour céder un de mes créneaux soit pour en obtenir un de quelqu'un d'autre. Ayant de bonnes qualités relationnelles, j'ai pu sans problème m'intégrer au laboratoire.

Une autre compétence acquise pendant cette thèse est la gestion du temps très importante lors du déroulement de tout projet. Les premiers mois ont consisté à faire de la bibliographie mais très vite les expérimentations ont du commencer pour ne pas prendre de retard. Tout au long du projet de thèse, des objectifs de résultats à atteindre ont été échelonnés et pour cela j'ai du m'imposer parfois un planning bien précis. Le défi le plus difficile étant de rendre la thèse dans les temps et que nous nous étions donnés afin de pouvoir soutenir la thèse mi-juillet, ce qui a exigé de ma part une grande capacité de travail et une adaptabilité de mes horaires en fonction du travail à effectuer.

Les formations dispensées par l'école doctorale ont permis d'élargir mon champ de compétences "non scientifiques". Ainsi le module INECO m'a permis de mieux me familiariser avec le monde de l'entreprise en comprenant son mode de fonctionnement et ses mécanismes. La formation "premiers secours" m'a permis d'acquérir les gestes qui sauvent lors de situations bien précises et m'a permis de m'initier à la prévention.

D'un point de vue plus personnel, j'ai pu au cours de ces trois années développer mes autres qualités en plus de celles déjà détaillées précédemment, notamment de rigueur avec la volonté d'utiliser un plan d'expériences qui permet de définir les paramètres qui ont le plus

d'influence sur la réaction pour les optimiser. Mes qualités de persévérance ont été mises à l'épreuve pour surmonter les premières difficultés et les échecs rencontrés au cours de ce projet. Mon autonomie m'a permis de gérer ma thèse comme je le souhaitais en explorant des domaines comme l'enzymologie ou la synthèse de porphyrines en tant que catalyseur. Dans le cadre de ma thèse, il m'a fallu aussi réunir des capacités d'analyse pour interpréter les résultats obtenus qui n'étaient pas toujours ceux attendus. Enfin, lors de la rédaction du mémoire, j'ai fait preuve de synthèse et d'organisation pour pouvoir établir un plan cohérent qui puisse faciliter le travail des futurs rapporteurs. Ce doctorat m'a permis aussi d'acquérir une certaine maturité, du professionnalisme et une meilleure confiance en moi et en mes qualités.

Résultats, impacts de la thèse

Les recherches effectuées au cours de ces trois années de doctorat ont permis de rendre compte de la complexité de la paroi cellulaire végétale et des nombreux difficultés engendrées. Moyennant quelques optimisations et améliorations l'un des protocoles mis en place au cours de ce travail pourrait être expérimenté à plus grande échelle. Les modifications structurales des molécules extraites découlant de l'utilisation de ces protocoles ouvrent également d'autres voies de valorisation des co-produits de la filière bois. Enfin, les propriétés biologiques découvertes sur ces polysaccharides nous permettent d'envisager des applications à plus long-terme en pharmacologie ou dans l'industrie cosmétique.

Concernant mes perspectives d'avenir, mon premier souhait serait de partir à l'étranger afin d'effectuer un stage post-doctoral, qu'il soit d'ailleurs sur les polysaccharides ou sur une toute autre thématique, me permettant dans ce cas précis d'élargir mon domaine de compétence et d'expertise scientifique. Lors de ma thèse, la vie dans un laboratoire ainsi que la gestion d'un projet de recherche en équipe m'ont conforté dans mon choix de poursuivre une carrière dans la recherche scientifique, qu'elle soit publique ou privée.

RESUME

Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylanes de bois de châtaignier-Développement de nouveaux procédés de délignification.

Les sciures de bois de châtaignier sont naturellement riches en polysaccharides d'intérêt industriel parmi lesquels les xylanes. L'obtention de telles molécules nécessite cependant la mise en œuvre de traitements chimiques agressifs qui freinent leur valorisation à grande échelle. Dans un contexte de Chimie verte, différentes stratégies de délignification chimique et biochimique de sciure de bois de châtaignier et d'extraction dans, et par l'eau, de xylanes ont été développées. La délignification enzymatique par les laccases s'est avérée décevante contrairement à celle développée à partir de molécules tétrapyrroliques tels que les phtalocyanines ou les porphyrines de fer en milieu *peroxydé* dont nos résultats démontrent l'intérêt de la mise en œuvre. La structure, ainsi que les propriétés biologiques en oncologie moléculaire et cellulaire du 4-*O*-méthylglucuronoxylane de châtaignier ont par la suite été caractérisées, nous permettant de préciser une relation structure-activité.

Mots-clés : xylanes, hémicelluloses, extraction, structure, valorisation, lignines, enzymes, phtalocyanine, porphyrine, propriétés biologiques

SUMMARY

Extraction, chemical characterization and biological valorization of glucuronoxylans from chestnut wood -Development of new delignification processes.

Chestnut sawdust is rich in polysaccharides of industrial interest, including xylans. Experimental procedures for the extraction of these molecules usually make use of aggressive chemical treatments that hamper their large scale valorization. In a context of Green Chemistry, several chemical and biochemical delignification processes of chestnut sawdust have been developed, followed by water-extraction of xylans. Enzymatic delignification by laccases was found disappointing contrary to protocols taking advantage of radical reactions generated by phthalocyanine or iron porphyrin in presence of hydrogen peroxide. Characterization of the chemical structure along with studies of antitumoural properties led us to find a structure-activity relationship for a 4-*O*-methylglucuronoxylan from chestnut tree.

Keywords: xylans, hemicelluloses, extraction, structure, valorization, lignins, enzymes, phthalocyanine, porphyrin, biological properties
