



HAL
open science

Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie. Les polysaccharides pariétaux: caractérisation et modification chimique

Youssef Habibi

► **To cite this version:**

Youssef Habibi. Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie. Les polysaccharides pariétaux: caractérisation et modification chimique. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2004. Français. NNT: . tel-00006273

HAL Id: tel-00006273

<https://theses.hal.science/tel-00006273>

Submitted on 15 Jun 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE JOSEPH
FOURIER – GRENOBLE I
SCIENCES & GEOGRAPHIE**

**UNIVERSITE CADI AYYAD
FACULTE DES SCIENCES
SEMLALIA – MARRAKECH**

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur

De l'Université Joseph Fourier

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

&

de l'Université Cadi Ayyad

(UFR : chimie des molécules organiques d'intérêt biologique et industriel)

Discipline : Chimie Organique

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE, ULTRASTRUCTURALE
ET CHIMIQUE DE LA FIGUE DE BARBARIE
LES POLYSACCHARIDES PARIÉTAUX : CARACTÉRISATION ET
MODIFICATION CHIMIQUE**

Par

Youssef HABIBI

Soutenue publiquement le 10 Mai 2004, devant la commission d'examen

Président

Mr C. BENNOUNA Professeur Université Cadi Ayyad, Marrakech

Examineurs

Mr M. AKSSIRA Professeur Université Hassan II, FST- Mohammedia

Mr M. BENICHOU Professeur Université Cadi Ayyad, Marrakech

Mr J. S. CONDORET Professeur Institut National Polytechnique, Toulouse

Mr J. P. JOSELEAU Professeur Université Joseph Fourier, Grenoble

Mr M. MAHROUZ Professeur Université Cadi Ayyad, Marrakech

Mr M. R. VIGNON Directeur de recherche CERMAV, Grenoble

Mr A. DAHBI Professeur (invité) Université Cadi Ayyad, Marrakech

Mr M. OUAHBI Ingénieur d'état (invité) Direction Provinciale d'Agriculture

Remerciements

"L'Homme est un Homme avec l'autre" selon Nietzsche. Cette citation prend tout son sens quand il s'agit de présenter en son nom le travail d'une équipe et l'aboutissement d'un effort intellectuel et technologique partagé. Je tiens à remercier ici tous ceux qui ont contribué, de très près comme d'un peu plus loin, à ce que le fruit mûrisse à la lumière des points de vue propres à chacun.

Je remercie le Directeur du Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales Monsieur Serge Perez de m'y avoir accueilli ainsi que pour sa sympathie à mon égard. Je souhaite exprimer ma plus sincère reconnaissance et toute ma sympathie à Madame Alberte Dessarts pour sa gentillesse.

Un remerciement chaleureux à Michel Vignon pour avoir su guider mes premiers coups de pinceaux sur la toile de la recherche tout en m'accordant la liberté d'œuvre chère à tout apprenti dans un projet aussi prenant et présentant autant de défis relatifs à un environnement multidisciplinaire. Si ce n'est qu'en "frottant sa cervelle à celle des autres" que l'on découvre le monde, je dois reconnaître que j'aurai beaucoup appris tant sur le plan scientifique que dans d'autres domaines, en confrontant mes points de vue à la vaste expérience de celui qui a été pour cela bien plus qu'un directeur de thèse. Je tiens aussi à remercier Mostafa Mahrouz pour son encadrement et sa coopération exemplaires.

Tous mes remerciements s'adressent aux lecteurs attentifs de ce manuscrit, le Pr Cahkib Bennouna, le Pr Jean Paul Joseleau, le Pr Mohamed Akssira, le Pr Jean Stéphane Condoret, le Pr Mohamed Benichou et le Pr Abderrahman Dahbi qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je suis très reconnaissant envers Henri Chanzy de s'être penché sur nos problèmes et d'avoir apporté au cours de nos discussions un éclairage extérieur plein d'intérêt à ces travaux. Je l'en remercie vivement.

Les conseils avisés et la pertinence d'analyse de Laurent Heux ont permis de faire avancer ce travail avec une rare efficacité. D'autant que ses compétences et son enthousiasme scientifiques ont été des sources permanentes de soutien et de motivation. Son approche des questions scientifiques restera pour moi un exemple. Je le remercie très chaleureusement.

Je témoigne toute ma gratitude à Jean-Luc Putaux pour tout ce qu'il m'a apporté lors de nos discussions. Son goût profond pour une science claire et rigoureuse et son dynamisme époustouflant m'ont beaucoup marqué.

Je remercie Alain Heyraud pour sa grande compétence, sa disponibilité et sa gentillesse qui m'ont, entre autres, permis de mener à bien et dans les meilleures conditions de nombreuses expériences.

Merci également à Danielle Dupeyre et Isabelle Paintrand qui m'ont offert généreusement leurs compétences en microscopie. Nos différents échanges ont été pour moi des plus agréables et des plus profitables. Je tiens à remercier Marie-France Marais pour son soutien performant aussi bien technique que moral.

Isabelle Jeacomine, Robert Nardin, Michel Trierweiler et Philippe Colin-Morel du service RMN, Claude Bosso et Stéphanie Beffy du service SM méritent toute ma reconnaissance. Ils n'ont ménagé ni leur temps ni leurs efforts pour me permettre d'effectuer dans les meilleures conditions des expériences de RMN et de

SM. Je suis très reconnaissant à Eric Buhler de m'avoir permis d'effectuer quelques essais en diffusion de la lumière.

Si je garde un excellent souvenir de mon séjour à Grenoble, c'est grâce à l'ambiance merveilleuse des deux inséparables et adorables dames Magali et Martine. Qu'elles soient remerciées pour leur aide et leur bonne humeur.

Un grand merci à tous les techniciens, thésards, post-docs et assimilés que j'ai rencontré au CERMAV au cours de ces trois années : David, Greg, Régis et Margua, Carole, Silvia, Martin, Sophie, Fabrizio, Olivier, Fred, Ludovic, Denilson, Marie-Pierre, Catherine, Aurélia, Samira, Mohamad, Christine, Claire, Sonia, Valérie C, Michel P, Annie, Patrick, Claude, Josiane, Michèle, Jean-Daniel, Alain R, François et Sylvie, Isabelle C... Nos discussions drôles et animées lors de déjeuners, de pause café ou thé, au cours des horaires normaux ou tard le soir sinon durant un week-end (pour les fous), dans la cafeteria, un couloir ou un bureau, participent grandement au délicieux souvenir que je conserve de cette période. J'ajouterai un grand merci à Silvia d'avoir été à mes côtés avec toute la patience qu'il fallait lors de mes premières touches au spectromètre RMN. Cela restera gravé pour toute ma vie.

Je suis aussi redevable à tous mes ami(e)s, Mohamed (Dakir), Aziz, Faiçel, Zakaria, Laila, Siham, Majda, Khadija, Aziza, Amal... avec qui j'ai réjouis mes années d'études à la faculté des Sciences Semlalia de Marrakech et qui sont un peu partout dans le monde.

Je remercie mes parents, mes frères et soeurs pour leur soutien sans faille depuis toujours. Leur contribution secrète n'en a pas moins été essentielle. Jamais je n'aurai réussi sans eux. J'ajouterai une mention spéciale, mais non des moindres, à mon grand frère Abdellatif, qui m'a toujours soutenu dans mes choix et qui a largement contribué à ma réussite. De par son soutien et son épaullement, aussi bien moral que matériel, il a transformé les moments les plus difficiles en moments d'extrême détente. J'espère qu'il trouvera en ce modeste travail une récompense de ce qu'il a fait, et sa devise permanente « Rien n'est difficile à condition de vouloir ».

Une mention particulière va à mon oncle « idole » Hadj Mustapha. Je veux lui témoigner toute gratitude et ma reconnaissance pour son soutien constant, ses conseils et ses marques d'encouragements pour lesquels il a été bien plus qu'un oncle.

Les appels téléphoniques pleins d'humour et les lettres d'encouragement de mon grand ami Mohamed Gourah et qui m'ont accompagné depuis mon départ à l'étranger, ajoutent un délicieux souvenir à ces années de recherche. Les aléas ont fait qu'une distance s'est insinuée entre nous, mais c'est pour avoir continué à montrer sa présence que je tiens particulièrement à le remercier de m'avoir toujours aidé à « remonter la pente ».

Le plus beau résultat de ces années de recherches a été obtenu un dimanche matin sous la forme d'un sourire d'une adorable fille. Merci Nathalie d'avoir été une merveilleuse source de réconfort pendant des moments délicats et merci d'avoir été à mes côtés pour partager des instants parfois difficiles mais souvent merveilleux. Mes remerciements vont également à toute ma belle famille pour son soutien, sa chaleur et sa sympathie.

Enfin, je tiens à remercier mon Youyou d'avoir été de bonne compagnie tout au long de ces années...

" La valeur d'un homme pour sa communauté dépend avant tout de la mesure dans laquelle ses sentiments, ses pensées, ses actes sont appliqués au développement de l'existence des autres hommes"

AVANT PROPOS

Nom et Prénom de l'auteur : HABIBI Youssef

Intitulé du travail : Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie : les polysaccharides pariétaux, caractérisation et modification chimique.

Noms et Prénoms des directeurs de recherche :

Dr. Michel R. VIGNON (CERMAV-UJF)

Pr. Mostafa MAHROUZ (FSSM-UCAM)

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-Grenoble, France) dans le cadre d'une thèse en co-tutelle entre l'Université Joseph Fourier et l'Université Cadi Ayyad avec le soutien financier du comité mixte franco marocain (Action Intégrée SVS/236/00).

Principales publications et communications auxquelles ce travail a donné lieu :

Publications :

1. Isolation and structure of D-xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. Youssef Habibi, Mostafa Mahrouz and Michel R. Vignon. *Carbohydrate Research*, 337 (17), 2002, 1593-1598.
2. Isolation and structure characterization of a (4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. Youssef Habibi, Mostafa Mahrouz and Michel R. Vignon. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, Vol. 22, No. 5, 2003, 323-329.
3. Structure features of pectic polysaccharides from the skins of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits: Part I. Youssef Habibi, Alain Heyraud, Mostafa Mahrouz and Michel R. Vignon. *Carbohydrate Research*, 339 (6), 2004, 1119-1127.
4. An arabinogalactan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruit. Youssef Habibi, Marie-France Marais, Mostafa Mahrouz and Michel R. Vignon. *Carbohydrate Research*, 339 (6), 2004, 1201-1205.
5. Isolation and structural characterization of protopectin from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. Youssef Habibi, Mostafa Mahrouz and Michel R. Vignon. *Carbohydrate Polymers*, soumise.
6. Structural feature of cell wall polysaccharides from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits: I- Arabinan-rich polysaccharides. Youssef Habibi, Mostafa Mahrouz and Michel R. Vignon. *Carbohydrate Polymers*, soumise.

7. Structural feature of cell wall polysaccharides from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits: II- xylan-rich polysaccharides. Youssef Habibi, Mostafa Mahrouz and Michel R. Vignon. En cours.

Communications :

1. Étude morphologique et investigation structurale des polysaccharides pariétaux de la pelure du figuier de barbarie *Opuntia ficus-indica*, Youssef Habibi, Danielle Dupeyre, Mostafa Mahrouz et Michel R. Vignon. *XX^{èmes} Journées de Chimie et Biochimie des Glucides*. Dourdan, 25-28 Mai 2004.

2. Morphological and chemical study of the seeds of *Opuntia ficus-indica*. Habibi Youssef, Danielle Dupeyre, Mahrouz Mostafa and Vignon Michel R. *13th European Microscopy Congress*, Belgium, 22-27 Août 2004.

3. Étude morphologique et analyse structurale des polysaccharides pariétaux de la pelure de la figue de barbarie. Youssef Habibi, Marie-France Marais, Mostafa Mahrouz et Michel R. Vignon. *Journées du Réseau Français des Pariois*, Le Croisic, 6- 7 Novembre 2003.

4. Étude morphologique et analyse chimique des graines de la figue de barbarie. Youssef Habibi, Marie-France Marais, Laurent Heux, Mostafa Mahrouz et Michel R. Vignon. *Journées du Réseau Français des Pariois*, Le Croisic, 6- 7 Novembre 2003.

5. Morphological and chemical study of the pericarp of the seeds of *Opuntia ficus-indica*. Habibi Youssef, Mahrouz Mostafa and Vignon Michel R. *EuroCarb12*, Grenoble, 6-12 Juillet 2003.

6. Apport de la RMN mono- et bidimensionnelle à l'élucidation structurale des polysaccharides pectiques isolés de la pelure des fruits du figuier de barbarie. Habibi Youssef, Mahrouz Mostafa et Vignon Michel R. *VI^{ème} Rencontre Rhône-Alpes de RMN*, Grenoble, 12 Juin 2003.

7. Extraction et caractérisation des xylanes des graines du figuier de barbarie *Opuntia ficus-indica*. Youssef Habibi, Mostafa Mahrouz and Michel R. Vignon. *XIX^{èmes} Journées de Chimie et Biochimie des Glucides*. Albé 20-24 mai 2002. Communication orale

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| Introduction générale | 1 |
| <u>CHAPITRE I: DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES</u> | |
| I. Généralités sur le figuier de barbarie | 3 |
| I.1. Le figuier de barbarie dans le monde végétal..... | 3 |
| I.2. Biologie du figuier de barbarie | 4 |
| I.3. Exigences écologiques du figuier de barbarie | 6 |
| I.3.1. Facteurs édapho-climatiques | 6 |
| I.3.2. Facteurs biotiques..... | 6 |
| I.4. La culture du figuier de barbarie au Maroc | 7 |
| I.5. Importance agro-économique du figuier de barbarie | 7 |
| I.5.1. Utilisation des fruits..... | 8 |
| I.5.2. Utilisation des raquettes | 8 |
| I.5.3. Utilisation des fleurs | 10 |
| II. Structure et composition polysaccharidique de la paroi végétale..... | 10 |
| II.1. Organisation de la paroi végétale | 10 |
| II.2. Les polysaccharides pariétaux..... | 11 |
| II.2.1. Les pectines..... | 11 |
| II.2.1.1. Galacturonanes (HG) | 12 |
| II.2.1.2. Rhamnogalacturonanes (RG)..... | 12 |
| II.2.1.3. Xylogalacturonanes | 13 |
| II.2.1.4. Arabinanes | 13 |
| II.2.1.5. Galactanes | 14 |
| II.2.1.6. Arabinogalactanes | 14 |
| II.2.2. Les hémicelluloses..... | 15 |
| II.2.2.1. Xyloglucanes | 15 |
| II.2.2.2. Xylanes | 16 |
| II.2.2.3. Mannanes..... | 17 |
| II.2.3. La cellulose..... | 18 |
| II.2.3.1. Structure moléculaire | 18 |

| | |
|--|-----------|
| II.2.3.2. Structure supramoléculaire | 19 |
| II.2.3.3. Morphologie de la cellulose native | 21 |
| II.2.3.4. Organisation des microfibrilles au sein de la paroi cellulaire | 23 |
| III. Rappels sur les méthodes d'extraction des polysaccharides pariétaux..... | 24 |
| III.1. Purification des parois cellulaires..... | 24 |
| III.2. Extractions des polysaccharides | 25 |
| III.2.1. Extraction des pectines..... | 25 |
| III.2.2. Extraction des hémicelluloses | 26 |
| III.2.3. Purification de la cellulose-blanchiment | 27 |
| III.3. Les réactions de dégradation..... | 27 |
| III.3.1. Les pectines..... | 27 |
| III.3.2. Les hémicelluloses | 28 |
| III.3.3. La cellulose | 29 |
| <u>CHAPITRE II: ETUDE DE LA GRAINE DE LA FIGUE DE BARBARIE</u> | |
| I. Introduction | 30 |
| II. Etude préliminaire | 31 |
| II.1. Isolement | 31 |
| II.2. Composition chimique | 32 |
| II.3. Conclusion..... | 33 |
| III. Etude morphologique | 33 |
| IV. Etude du péricarpe..... | 36 |
| IV.1. Composition en sucres | 36 |
| IV.2. Extractions séquentielles des polysaccharides non cellulosiques..... | 37 |
| IV.3. Bilan d'extraction et analyse des produits | 39 |
| IV.4. Purification et caractérisation des différentes xylnes | 41 |
| IV.4.1. Purification des différentes xylnes..... | 41 |
| IV.4.2. Dosage de sucres | 41 |
| IV.4.3. Analyse par méthylation | 42 |
| IV.4.4. Analyse par RMN en solution | 43 |
| IV.4.5. Détermination des masses molaires..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| IV.4.6. Etude par RMN du solide | 53 |
| IV.4.7. Conclusion..... | 58 |
| IV.5. Purification et caractérisation des fibres cellulosesques..... | 61 |
| IV.5.1. Purification | 61 |
| IV.5.1.1. Dosage des sucres | 62 |
| IV.5.1.2. Microscopie | 62 |
| IV.5.1.3. Diffraction des rayons-X | 63 |
| IV.5.1.4. Conclusion..... | 65 |
| IV.5.2. Individualisation et purification..... | 65 |
| IV.5.3. Caractérisation des fibres purifiées..... | 68 |
| IV.5.3.1. Le degré de polymérisation | 68 |
| IV.5.3.1. Cristallinité..... | 69 |
| IV.5.3.2. Etude par RMN du solide | 69 |
| a. Caractérisation préliminaire..... | 70 |
| b. Proportion α/β et taux de cristallinité..... | 71 |
| IV.5.4. Caractérisation au cours du traitement | 74 |
| IV.5.5. Conclusion..... | 77 |
| V. Etude de l'endosperme..... | 77 |
| V.1. Composition en sucres de l'endosperme | 78 |
| V.2. Extraction et caractérisation de l'amidon de l'endosperme..... | 78 |
| V.3. Extraction et caractérisation des polysaccharides pariétaux..... | 80 |
| V.3.1. Purification des parois cellulaires..... | 80 |
| V.3.2. Extraction des polysaccharides pariétaux | 80 |
| V.3.3. Rendements et caractérisation des extraits | 81 |
| V.4. Fractionnement et purification des différentes fractions..... | 82 |
| V.4.1. Fractionnement | 82 |
| V.4.2. Purification..... | 84 |
| V.5. Etude des différentes fractions purifiées | 84 |
| V.5.1. Dosage des sucres | 84 |
| V.5.2. Analyse par méthylation..... | 85 |
| V.5.2.1. La fraction WSF1..... | 86 |

| | |
|--|------------|
| V.5.2.2. La fraction CSF3..... | 87 |
| V.5.2.3. La fraction CASF1..... | 88 |
| V.5.2.4. La fraction CASF3..... | 88 |
| V.5.2.5. La fraction HAPF..... | 89 |
| V.5.3. Étude par spectroscopie RMN..... | 89 |
| V.5.3.1. La fraction WSF1..... | 89 |
| V.5.3.2. La fraction CSF3..... | 93 |
| V.5.3.3. La fraction CASF1..... | 94 |
| V.5.3.4. La fraction CASF3..... | 96 |
| V.5.3.5. La fraction HAPF..... | 97 |
| V.6. Conclusion..... | 98 |
| VI. Conclusion générale..... | 99 |
| <u>CHAPITRE III: ÉTUDE DE LA PELURE DE LA FIGUE DE BARBARIE</u> | |
| I. Introduction..... | 101 |
| II. Étude préliminaire..... | 102 |
| II.1. Récolte et échantillonnage..... | 102 |
| II.2. Composition chimique..... | 102 |
| II.3. Conclusion..... | 103 |
| III. Étude morphologie..... | 104 |
| IV. Extraction des polysaccharides pariétaux..... | 107 |
| IV.1. Extraction séquentielle des polysaccharides..... | 108 |
| IV.1.1. Extraction du mucilage..... | 108 |
| IV.1.2. Extraction des polysaccharides pectiques..... | 109 |
| IV.1.3. Extraction des hémicelluloses..... | 110 |
| IV.1.4. Blanchiment de la paroi cellulaire..... | 111 |
| IV.2. Efficacité des extractions..... | 111 |
| IV.2.1. Par spectroscopie infrarouge..... | 112 |
| IV.2.2. Par analyse chimique..... | 114 |
| IV.2.3. Conclusion..... | 114 |
| IV.3. Bilans et rendements des extractions..... | 115 |

| | |
|--|------------|
| IV.4. Caractérisation des différents extraits..... | 116 |
| V. Etude du mucilage..... | 117 |
| V.1. Fractionnement et purification du mucilage..... | 118 |
| V.1.1. Fractionnement | 118 |
| V.1.2. Purification..... | 119 |
| V.2. Caractérisation de la fraction majoritaire purifiée (MP1)..... | 120 |
| V.2.1. Dosage des sucres | 120 |
| V.2.2. Analyse par méthylation..... | 121 |
| V.2.3. Analyse par spectroscopie RMN | 123 |
| V.3. Conclusion..... | 125 |
| VI. Etude de la fraction pectique..... | 126 |
| VI.1. Fractionnement et purification des polysaccharides pectiques | 127 |
| VI.1.1. Fractionnement | 127 |
| VI.1.2. Purification | 129 |
| VI.2. Caractérisation des fractions pectiques | 130 |
| VI.2.1. Dosage des sucres..... | 130 |
| VI.2.2. Analyse par méthylation | 132 |
| VI.2.2.1. La fraction WSP3 | 133 |
| VI.2.2.2. La fraction CSP3 | 134 |
| VI.2.2.3. La fraction ASP1 | 134 |
| VI.2.2.4. La fraction ASP2..... | 135 |
| VI.2.2.5. La fraction ASP3..... | 135 |
| VI.2.3. Etude par spectroscopie RMN | 136 |
| VI.2.3.1. La fraction WSP3 | 136 |
| VI.2.3.2. La fraction CSP3 | 140 |
| VI.2.3.3. La fraction ASP1 | 143 |
| VI.2.3.4. La fraction ASP2..... | 143 |
| VI.2.3.5. La fraction ASP3..... | 145 |
| VI.3. Conclusion | 147 |
| VII. Etude des hémicelluloses | 150 |

| | |
|---|------------|
| VII.1. Fractionnement et purification | 150 |
| VII.1.1. Fractionnement..... | 150 |
| VII.1.2. Purification..... | 152 |
| VII.2. Caractérisation | 152 |
| VII.2.1. Dosage de sucres | 152 |
| VII.2.2. Etude par spectroscopie RMN..... | 153 |
| V.II.3. Conclusion..... | 155 |
| VIII. Etude de la fraction cellulosique | 156 |
| VIII.1. Microscopie | 157 |
| VIII.2. Individualisation | 158 |
| VIII.3. Caractérisation des microfibrilles de cellulose..... | 160 |
| VIII.3.1. En suspension..... | 160 |
| VIII.3.1. Degré de polymérisation | 161 |
| VIII.3.2. Cristallinité..... | 161 |
| VIII.3.2.1. Diffraction des rayons- X..... | 161 |
| VIII.3.2.2. Spectroscopie RMN du solide..... | 162 |
| VIII.3.3. Conclusion..... | 163 |
| IX. Conclusion générale | 164 |
| <u>CHAPITRE IV: MODIFICATION CHIMIQUE DE LA CELLULOSE</u> | |
| I. Introduction | 165 |
| II. Première partie : oxydation sélective de la cellulose..... | 166 |
| II.1. Généralités sur l'oxydation des alcools..... | 166 |
| II.1.1. Les radicaux nitroxydes et leurs sels d'oxoammonium | 166 |
| II.1.1.1. Structure..... | 166 |
| II.1.1.2. Stabilité..... | 167 |
| II.1.1.3. Réactivité..... | 167 |
| II.1.2. Oxydation des alcools par les sels d'oxoammonium..... | 168 |
| II.1.3. Oxydation des hydroxyles de la cellulose | 169 |
| II.1.4. Synthèse de l'acide polyglucuronique | 170 |
| II.2. Préparation et caractérisation de la cellulose III | 171 |

| | |
|---|------------|
| II.2.2. Préparation de la cellulose III..... | 171 |
| II.2.3. Caractérisation de la cellulose III..... | 172 |
| II.2.3.1. Par diffraction des rayons X..... | 172 |
| II.2.3.2. Par RMN solide..... | 173 |
| II.3. Oxydation de la cellulose | 175 |
| II.3.1. Comparaison des deux allomorphes I et III de la cellulose | 175 |
| II.3.1.1. Rendements des réactions | 175 |
| II.3.1.2. Cinétique de la réaction | 176 |
| II.3.1.3. Conclusion | 177 |
| II.3.2. Optimisation de l'oxydation de la cellulose III..... | 178 |
| II.3.2.1. Influence de la température | 178 |
| II.3.2.2. Influence de la quantité de NaBr..... | 179 |
| II.3.2.3. Influence de la quantité du TEMPO..... | 181 |
| II.3.2.4. Influence de la durée de la réaction | 184 |
| II.4. Conclusion..... | 184 |
| III. Deuxième partie : couplage de la cellulose oxydée..... | 185 |
| III.1. Les polymères stimulables..... | 185 |
| III.1.1. Définition | 185 |
| III.1.2. Exemples de polymère thermosensibles | 186 |
| III.1.3. Le poly(N-isopropylacrylamide)..... | 186 |
| III.2. Méthodes de couplage peptidiques..... | 187 |
| III.3. Synthèse et caractérisation du PNIPAM..... | 189 |
| III.3.1. Synthèse | 189 |
| III.3.2. Caractérisation | 190 |
| III.3.2.1. Par RMN | 190 |
| III.3.2.2. Par spectrométrie de masse..... | 193 |
| III.4. Essai de couplage de la cellulose oxydée..... | 194 |
| IV. Conclusion générale..... | 199 |
| <u>CONCLUSION</u> | |
| Conclusion..... | 200 |

CHAPITRE V: MATÉRIELS ET MÉTHODES

| | |
|--|------------|
| I. Matériaux utilisés | 202 |
| I.1. Le figuier de barbarie | 202 |
| I.2. Les échantillons de cellulose | 202 |
| I.2.1. Cellulose de tunicier | 202 |
| I.2.1.1. Les tuniciers | 202 |
| I.2.1.2. Extraction de la cellulose de tunicier..... | 202 |
| I.2.2. Cellulose de parenchyme | 203 |
| II. Analyse élémentaire | 203 |
| II.1. La siccité..... | 203 |
| II.2. Taux de cendres..... | 203 |
| II.3. Protéines | 203 |
| II.4. Lignine sulfurique (méthode de Klason) | 204 |
| II.4. Graisse et cires | 204 |
| III. Dosage des sucres | 204 |
| III.1. Sucres neutres..... | 204 |
| III.2. Réduction des polysaccharides..... | 205 |
| III.3. Méthylation des polysaccharides..... | 206 |
| III.4. Dosage des sucres acides | 207 |
| III.4.1 Dosage colorimétrique | 207 |
| III.4.2. Dosage conductimétrique..... | 208 |
| IV. Hydrolyse enzymatique | 208 |
| V. Purification des xylanes insolubles..... | 208 |
| VI. Modification chimique de la cellulose : modes opératoires | 209 |
| VI.1. Traitement à l'ammoniac | 209 |
| VI.2. Oxydation | 209 |
| VI.4. Couplage peptidique..... | 210 |
| VI.4.1. Synthèse des oligoNIPAM | 210 |
| VI.4.2. Couplage..... | 210 |

| | |
|--|------------|
| VII. Les méthodes microscopiques | 210 |
| VII.1. Préparation des échantillons | 210 |
| VII.1.1. Les coupes semi et ultrafines | 210 |
| VII.1.2. Fixation au glutaraldéhyde | 211 |
| VII.1.3. Séchage par la méthode point critique | 211 |
| VII.2. Microscopie optique | 212 |
| VII.2.1. Biréfringence | 212 |
| VII.2.2. Contraste de Normaski | 212 |
| VII.3. Microscopie électronique à balayage | 212 |
| VII.4. Microscopie électronique à transmission | 213 |
| VII.4.1. Observation directe | 213 |
| VII.4.2. Coloration négative | 213 |
| VII.4.3. Ombrage W/Ta | 213 |
| VIII. Méthodes chromatographiques | 213 |
| VIII.1. Chromatographie d'échanges d'ions | 213 |
| VIII.2. Chromatographie de perméation sur gel | 214 |
| IX. Infrarouge | 215 |
| X. Homogénéisateur Manton-Gaulin | 215 |
| XII. Détermination des masses molaires | 216 |
| XII.1. Analyse par HPSEC | 216 |
| XII.2. Analyse par viscosité | 216 |
| XII.3. Analyse par diffusion de la lumière | 217 |
| XIII. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN | 220 |
| XIII.1. En phase liquide (haute résolution) | 220 |
| XIII.1.1. RMN monodimensionnelle (1D) | 220 |
| XIII.1.2. RMN bidimensionnelle (2D) | 221 |
| XIII.2. En phase solide CP/MAS | 222 |
| Références bibliographiques | 223 |
| Liste des figures et tableaux | 231 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AU : Acides Uroniques

Glc: Glucose

Xyl: Xylose

Ara: Arabinose

Gal (Gal-6,6'-d₂): Galactose (Galactose 6,6' deutérié)

Rha: Rhamnose

Fuc: Fucose

Man: Mannose

GalA: Acide galacturonique

GlcA: Acide glucuronique

4-O-Me-GlcA: Acide 4-O-Me-glucuronique

TEMPO: radical 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle

NaOCl: hypochlorite de sodium

NHS: N-hydroxysuccinimide

EDAC: N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide

TFA: Acide trifluoroacétique

DMSO (DMSO-d₆): Diméthylsulfoxyde (Diméthylsulfoxyde deutérié)

D₂O : l'eau deutériée (lourde)

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

NaCl: Chlorure de sodium

HCl: Acide chlorhydrique

NaBH₄ (NaBD₄) : Borohydrure de sodium (Borohydrure de sodium deutérié)

NIPAM: N-isopropylacrylamide

AESH : 2-aminoéthanthiol hydrochloride

AIBN : 2,2'-azobis(2-méthyl-propionitrile)

DP: Degré de polymérisation

M_w : Masse molaire moyenne en nombre

CED : Cupriéthylènediamine

HPSEC: High Performance Size Exclusion Chromatography

MEB: Microscope électronique à balayage

MET: Microscope électronique à transmission

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

FID: Détecteur à ionisation de flamme

RMN: Résonance magnétique nucléaire

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

COSY : COrrrelated SpectroscopY

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

CP/MAS: Cross-Polarization/Magic-Angle Spinning

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Plusieurs pays, y compris le Maroc sont soumis, depuis plus d'un quart de siècle, à une sévère sécheresse aux conséquences néfastes sur l'agriculture et l'activité économique de ces pays. Cette sécheresse est devenue une donnée structurelle qu'il faudra désormais affronter par l'adaptation de l'agriculture pour devenir moins dépendante des aléas climatiques. C'est l'un des objectifs du concept de développement intégré et durable fixé par les nations unies (programme des nations unies pour le développement PNUD) en collaboration avec la FAO et qui vise l'augmentation des potentialités agricoles de ces zones arides. Parmi les espèces culturales résistantes au stress hydrique et tolérantes aux sols pauvres, le cactus excelle. En effet cette plante "miracle" a permis la mise en valeur des terres marginales et des zones arides et semi-arides qui n'étaient pas cultivées jusqu'alors. Son adaptation à divers climats et sols a permis à la plante de répondre efficacement lorsqu'elle est utilisée dans la lutte contre l'érosion et la régénération des espèces naturelles. Elle possède en outre une production en biomasse très efficace.

Des plantations intensives ont vu le jour ces dernières années au Maroc, et une très grande variabilité génétique a été créée au sein du cactus marocain. Cette variabilité pourrait ainsi être considérée comme une richesse économique supplémentaire à laquelle il est d'ores et déjà temps d'accorder plus d'importance à l'instar de certains pays comme le Mexique, l'Italie, l'Espagne, l'Afrique du Sud, la Tunisie...

D'autant plus que cette culture est prodigieuse, son extension remarquable et son intégration dans les programmes de développement devraient être accompagnée d'une réflexion sur les possibilités de sa transformation en vue de diversifier les débouchés et de valoriser la production. Le développement de nouveaux débouchés, en marge des dérivés classés traditionnels, revêt donc une importance croissante en particulier pour son fruit « la figue de barbarie ». C'est dans ce cadre que nos laboratoires : Centre de Recherches sur les macromolécules végétales (CERMAV) et l'unité de chimie agroalimentaire du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (LCOA) avec l'aval du comité mixte franco-marocain (Action Intégrée SVS 236/00) ont engagé un projet de recherche mettant l'accent sur la valorisation alimentaire et non alimentaire des cladodes, graines et fruits du figuier de barbarie.

Actuellement, des boissons alcoolisées, des nectars, des jus, des confitures,...etc sont élaborés à partir de la pulpe de la figue de barbarie. Leur préparation entraîne une

production importante de sous produits qu'il faut essayer de valoriser, à savoir : les graines et la pelure des fruits. Ce sont ces deux composantes qui ont fait l'objectif de ce travail.

Parmi les trois grandes classes de substances organiques que l'on rencontre dans le monde végétal, protéines, lipides et hydrates de carbones, nous nous sommes intéressés à ces derniers. La présente étude comprendra donc trois volets principaux. D'abord une étude bibliographie qui portera sur la connaissance de quelques aspects du figuier de barbarie, puis une analyse des données relatives aux différents polysaccharides pariétaux, leurs structures, les techniques d'extraction et de purification. Le deuxième volet, qui comprendra deux chapitres, sera consacré à l'extraction, la purification et l'étude des polysaccharides pariétaux des graines dans le deuxième chapitre et de la pelure dans le troisième. Enfin, le dernier volet traitera de la modification chimique de la cellulose.

CHAPITRE I

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralités sur le figuier de barbarie

I.1. Le figuier de barbarie dans le monde végétal

Le règne végétal, de par sa richesse et sa diversité, peut être classé en deux grandes catégories: les plantes vasculaires et les plantes non vasculaires. Les plantes vasculaires peuvent être, à leur tour, subdivisées en deux grands groupes : les cryptogames vasculaires (plantes sans fleurs) et les phanérogames (plantes à fleurs). Dans les phanérogames on distingue deux classes : les plantes gymnospermes (à graines nues comme le ginkgo, les conifères, etc) et les angiospermes (à graines renfermées dans un fruit) [1].

Les angiospermes regroupent la majeure partie des plantes, soit environ 250 000 espèces répandues sur toute la terre, mais peu abondantes en milieu aquatique. Elles se divisent en monocotylédones (céréales, plantes bulbeuses, palmiers, orchidées, etc) et dicotylédones, de loin les plus nombreuses, comprenant les arbres feuillus et la plupart des plantes potagères et industrielles (Figure I.1) [2].

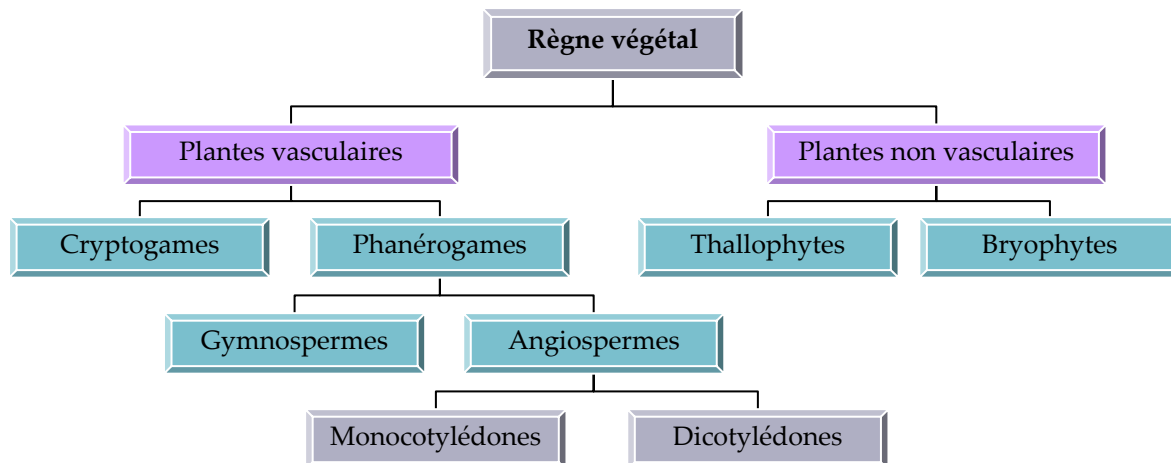


Figure I.1 : Organisation du monde végétal

Les cactacées sont des angiospermes dicotylédones dialypétales caliciflores de l'ordre des caryophyllacées [3]. Elles font partie des plantes xérophytes et succulentes. Les xérophytes sont des plantes qui ont réussi à développer une aptitude à se contenter de peu d'eau et qui peuvent donc survivre à de très longues périodes de sécheresse, telles que celles que l'on rencontre dans les régions arides et péri-désertiques. Ces adaptations se présentent sous diverses formes morphologiques et physiologiques. L'une d'entre elles réside dans la faculté d'emmagasiner de l'eau dans des tissus végétatifs qui prennent un aspect spongieux.

Ce phénomène est appelé "succulence" (*succus* = sève). Les cactacées se distinguent des autres plantes succulentes par l'absence de latex lors d'une blessure [4].

Le genre *Opuntia* est le plus important et le plus répandu de la famille des cactacées. Il comprend environ 300 espèces réparties en quatre sous-genres, dont trois sont largement présents au Maroc [5] :

- *Brasiliopuntia* : tronc non articulé, articles cylindriques et aplatis (une seule espèce au Maroc : *Opuntia brasiliensis*).
- *Cylindropuntia* : articles cylindriques portant des épines (4 espèces au Maroc).
- *Platyopuntia* : articles aplatis en raquettes, feuilles petites et caduques, épines non gainées (au moins 21 espèces au Maroc).

L'*Opuntia ficus-indica*, plus connue sous le nom de figuier de barbarie, appartient au dernier sous genre de l'*Opuntia*.

I.2. Biologie du figuier de barbarie

Le figuier de barbarie est une plante originaire des régions arides et semi-arides du Mexique, qui a été introduite en Afrique du Nord vers le 16^{ème} siècle. C'est une plante robuste qui peut mesurer jusqu'à 5 mètres de hauteur (Figure I.2-a), avec un tronc épais et ligneux. Ses articles aplatis en forme de raquettes (cladodes) (Figure I.2-b) de couleur vert mat, ayant une longueur de 30 à 50 cm et une largeur de 15 à 30 cm, sont couverts de petites aréoles, d'épines et de glochides blancs. Ses fleurs, marginales sur le sommet des cladodes, sont hermaphrodites, de couleur jaune et deviennent rougeâtres à l'approche de la sénescence de la plante (Figure I.2-c). Ses fruits sont des baies charnues ovoïdes ou piriformes pourvues d'épines (Figure I.2-d). Ils sont généralement verdâtres ou jaunes à maturité. La pulpe est toujours juteuse, de couleur jaune-orangé, rouge ou pourpre, parsemée de nombreuses petites graines.





Figure I. 2 : Le figuier de barbarie : a) la plante, b) les cladodes, c) les fleurs, d) le fruit,

Sur le plan physiologique, l'*Opuntia ficus-indica* est une plante de type CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*). Elle a la particularité de fixer le dioxyde de carbone et de libérer l'oxygène pendant la nuit et de fermer ses stomates pendant le jour. Ce dispositif permet une moindre perte d'eau par évapo-transpiration pendant les heures les plus chaudes. La pénétration de l'air par les stomates ouverts s'effectue pendant la nuit, et c'est à ce moment là, que le dioxyde de carbone est fixé dans les tissus de chloroplaste par le phosphoénolpyruvate (PEP), résultant du métabolisme des hydrates de carbone *via* la glycolyse, pour donner l'oxaloacétate. Cet élément est à son tour transformé en malate pour être stocké dans la vacuole. Pendant le jour, le malate se décompose en pyruvate et libère le dioxyde de carbone et l'eau directement au niveau des tissus chlorophylliens qui s'en servent pour la suite de la photosynthèse selon le cycle de Calvin (Figure I.3). C'est une différence fondamentale avec les plantes ordinaires (mésophytes), pour qui la photosynthèse s'effectue le jour à partir du dioxyde de carbone fraîchement importé de l'atmosphère [6, 7].

Traditionnellement, le figuier de Barbarie est multiplié végétativement par bouturage de raquettes. Les jeunes plantes peuvent entrer en floraison à partir de la 2ème ou de la 3ème année. La durée et la période du cycle annuel dépendent de la variété et de la zone géographique [8].

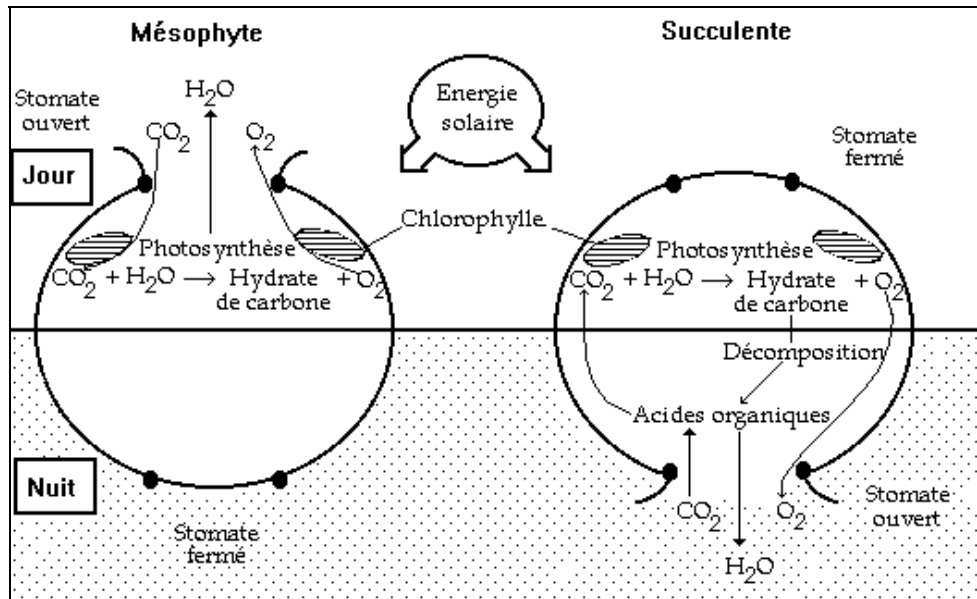


Figure I. 3 : Cycle photosynthétique des plantes de type CAM

I.3. Exigences écologiques du figuier de barbarie

I.3.1. Facteurs édapho-climatiques

Le figuier de barbarie possède une grande adaptation aux conditions les plus hostiles (aridité du climat, salinité des sols, terrains de faible potentiel agricole). Son extension est limitée surtout par les basses températures hivernales, son seuil de tolérance étant de -10°C [9].

Le cactus s'accommode mal des sols hydromorphes et asphyxiants. Les sols préférés sont les sols légers, sablonneux-limoneux. Il s'agit de sols légèrement pauvres en matière organique (0.1-1.8 %), ayant des pH légèrement acides (5.1-6.7). Pour plusieurs espèces *Opuntia* le pH du sol est un facteur limitant, mais l'*Opuntia ficus-indica* est rencontré même sur des sols calcaires [9].

I.3.2. Facteurs biotiques

De nombreux parasites et maladies sont rencontrés dans le cactus [10]:

- La rouille (*Phyllostica opuntiae*): uridinée qui se manifeste par de petites taches de couleur jaune-rouille, circulaires, pouvant s'étendre en plaques irrégulières d'un blanc sale ou cendré. Ce sont surtout les cladodes de deux ans qui, une fois attaquées, n'émettent que peu de cladodes, et finissent par se dessécher. Maladie des zones humides, elle est efficacement combattue par des traitements à base de cuivre et l'ablation des raquettes parasitées.

- Le mildiou des cactus (*Phytophthora cactorum* Schr., *P. omnivera* De Bary): les symptômes de la maladie se présentent sous forme de cloques soulevant l'épiderme, d'état chlorotique prononcé et de taches brunâtres qui envahissent les fruits et les raquettes. La sensibilité à la maladie est variable en fonction des variétés.
- La cératite (*Ceratitis capitata* Weid): une mouche méditerranéenne des fruits qui peut occasionner des dégâts importants dans les plantations mal entretenues.
- Les cochenilles: bien que généralement polyphages, certaines espèces de cochenilles sont des parasites spécifiques et inféodées à l'espèce *Opuntia*. Certains cultivars inermes de cactées sont résistants aux cochenilles.

I.4. La culture du figuier de barbarie au Maroc

A l'exception des zones sahariennes et montagneuses, le figuier de barbarie est largement représenté dans le paysage rural marocain, en plantations plus ou moins régulières, autour des villages ou en haies limitant les parcelles de cultures ou les vergers. Sa répartition géographique est assez vaste puisqu'on le trouve aussi bien dans les régions côtières depuis Sidi Ifni jusqu'à Tanger que dans les régions continentales.

Les espèces *Opuntia* les plus répandues au Maroc sont : *Opuntia cylindrica*, *Opuntia mieckleyi*, *Opuntia vulgaris*, *Opuntia schumannii*, *Opuntia megacantha*, *Opuntia maxima* et *Opuntia ficus-indica* [5].

Les régions du centre et le bassin de Tensift sont parmi les régions où des plantations régulières et sur de grandes étendues ont été installées dans le cadre des opérations de lutte contre l'érosion. Dans le sud marocain, on le rencontre à des altitudes allant de 0 à 1000 mètres. Dans la région de Moulay Idriss, près de Meknès, à des altitudes de 500 à 800 mètres, des plantations de cactus destinées à la production de fruits connaissent une extension constante. A Béni Smir près de Oued Zem, une collection de cactus a été établie dès 1944 sur une superficie de 500 hectares.

I.5. Importance agro-économique du figuier de barbarie

L'adaptation du figuier de barbarie aux conditions désertiques et semi-désertiques lui permet de constituer une culture à intérêts écologiques et socio-économiques indéniables. En effet, il constitue un bouclier contre la désertification et l'érosion des sols. Il est également cultivé pour la régénération des terres. Il ne demande pas de pratiques culturales spécialisées

ni d'apport de fertilisants. Mais malgré ses attraits naturels, peu d'intérêt a été accordé à cette espèce jusqu'aux années 70. Avec le développement des marchés des fruits exotiques dans plusieurs pays, les efforts se sont multipliés pour en faire une culture industrielle, soit en tant que culture fourragère, soit en tant que culture maraîchère. La production de fruits reste cependant l'aspect le plus recherché et le plus développé [11].

I.5.1. Utilisation des fruits

Les fruits du figuier de barbarie sont plus au moins gros (30 à 150 g), bacciformes ou piriformes (4-9 cm), verdâtres et deviennent jaune à rouge à maturité, à pulpe molle juteuse, sucrée, contenant dans un mucilage de nombreuses petites graines.

Ils sont en général consommés frais, très rafraîchissants et nutritifs. Ils se caractérisent par rapport aux autres fruits par un pH relativement élevé (pH \approx 5.6). La totalité des sucres présents dans le fruit est constituée de glucose et de fructose dans un rapport de 18:1. Ce rapport est considéré comme une spécificité de la figue de barbarie si on le compare à celui des autres fruits (rapport de 1 :1 dans les oranges par exemple). La teneur totale en acides aminés libres (257 mg/100g) est largement supérieure à la teneur moyenne des autres fruits à l'exception des raisins de table et des agrumes qui contiennent une teneur identique [12, 13].

Tableau I. 1 : Composition de la figue de barbarie *Opuntia ficus-indica* [14]

| Constituants | Fruit (%) | pulpe et graine (%) | pulpe sans graine (%) |
|----------------------|-----------|---------------------|-----------------------|
| eau | 80.0 | 84.5 | 83.6 |
| protéines | 1.0 | 1.3 | 0.8 |
| lipides totaux | 0.7 | 1.3 | 0.3 |
| glucides disponibles | 14.8 | 8.0 | 10.8 |
| fibres brutes | 2.3 | 4.4 | 3.6 |

Récemment, dans certains pays (Italie, Mexique, Chili...), le fruit est conditionné industriellement et stabilisé par différentes méthodes (froid, séchage, chaleur) ou transformé en jus, miel (miel de tuna), boissons alcoolisés, confiture, colorant alimentaire (pourpre de barbarie) [11, 15, 16].

I.5.2. Utilisation des raquettes

- *Production fourragère*

Le cactus est considéré comme une réserve fourragère sur pied ; il peut constituer un appoint alimentaire pour les périodes de transition en été et en automne et lors des années de sécheresse [17]. En effet, sa production en matière sèche varie de 12 à 16 tonnes/ha en fonction des régions. En terrain irrigué, cette production peut atteindre 30 tonnes/ha ce qui fait du cactus l'espèce la plus productive des zones arides : 1,37kg/m²/an pour le cactus et 0,71kg/m²/an en moyenne pour d'autres espèces [18]. Une fertilisation azotée et phosphorique améliore sa valeur nutritive et sa productivité en biomasse [19].

Cependant ce fourrage est pauvre en protéines et en lipides. Il présente un rapport calcium/phosphore élevé et il est riche en glucides, en eau et en vitamines. Il a ainsi une valeur fourragère moyenne de 0.06 à 0.08 UF*/kg de raquettes [17, 20].

Tableau I. 2 : Comparaison de la composition des cladodes avec d'autres aliments [8]

| Nature du fourrage | Matière sèche (%) | Matière azotée (%) | Hydrate de carbone (%) | Matière grasse (%) |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| Foin de luzerne | 91.4 | 10.6 | 39.0 | 0.9 |
| Atiplex | 23.3 | 2.8 | 5.9 | 0.1 |
| Maïs ensilé | 26.3 | 1.1 | 15.0 | 0.7 |
| Pulpes de betterave sucrière | 9.4 | 0.2 | 6.4 | 0.1 |
| Cladodes de l' <i>Opuntia</i> | 10.4 | 0.6 | 5.8 | 0.1 |

- *Production maraîchère*

Les jeunes pousses d'*Opuntia*, appelées "Nopalitos" sont consommées comme légume au Mexique et dans le sud des Etats Unis. Elles sont riches en vitamine C et en Calcium et leur valeur nutritive est proche de celle de la laitue et des épinards [15, 21].

- *Utilisations médicinales*

En Australie et en Afrique du Sud, l'effet hypoglycémique des "Nopalitos" est utilisé dans le traitement des diabètes non dépendants de l'insuline. Le mucilage isolé des raquettes permet de réduire le cholestérol total dans le sang. Les femelles des cochenilles *Dactylopius coccus costa* ou *Dactylopius opuntiae cockerell*, qui prolifèrent sur des raquettes de l'*Opuntia ficus-indica*, sont utilisées pour la production d'un colorant de couleur rouge « le carmin » ou l'acide carminique. Ce colorant (E-120) est très utilisé par les industries alimentaires, cosmétiques et médicinales. Récemment au Mexique et en Afrique du Sud, des producteurs

* UF (Unité Fourragère) = 1820Kcal

ont adopté des systèmes de production intensifs en micro-tunnels pour la culture de ces cochenilles [22].

I.5.3. Utilisation des fleurs

Avec un calendrier apicole qui dure 7 mois (mars-septembre), l'activité des abeilles a lieu sur les fleurs de *l'Opuntia ficus-indica* pendant 3 mois (avril-juin), ce qui permet de développer l'apiculture en parallèle. Les rendements des ruches sont de 1 à 4 litres de miel. Les fleurs sont aussi utilisées à des fins médicinales. En effet, les capsules des corolles des fleurs séchées sont utilisées comme remède du dysfonctionnement de la prostate (hypertrophie bénigne de la prostate), et aussi comme régulateur diurétique [23]. En Sicile, le thé préparé avec les fleurs de *l'Opuntia ficus-indica* est utilisé comme traitement contre les douleurs rénales [24].

II. Structure et composition polysaccharidique de la paroi végétale

II.1. Organisation de la paroi végétale

La paroi végétale est un empilement de plusieurs couches constituées de cellulose, d'hémicelluloses, de pectines et/ou de lignine dont les proportions dépendent de l'organisme producteur du tissu. Cette paroi pecto-cellulosique confère à la cellule des propriétés biomécaniques de rigidité et d'élasticité, qui peuvent apparaître contradictoires. En effet, d'une part la structure est rigide permettant le maintien de l'organisme et d'autre part l'enveloppe est souple et extensible assurant la croissance des cellules.

La couche la plus externe composant la paroi est appelée la lamelle mitoyenne, elle est de nature amorphe et assure la cohésion intercellulaire. Elle est constituée principalement de pectines. Les niveaux les plus internes, appelés parois primaire et secondaire, sont formés d'un réseau de microfibrilles de cellulose enrobées dans une matrice amorphe constituée d'hémicelluloses et de pectines [25].

L'organisation de ces différents polysaccharides au sein de la paroi des plantes supérieures a suscité beaucoup d'intérêt et plusieurs modèles ont été proposés. Chez les dicotylédones, *Carpita* et *Gibaut* ont proposé un modèle illustrant l'organisation des polysaccharides autour des microfibrilles de cellulose (Figure I.4) [26]. Il s'agit d'un composite constitué de microfibrilles entrecroisées dans une trame de polysaccharides et de

protéines dont la cohésion est assurée par des liaisons hydrogène et par des interactions de type Van-der Waals.

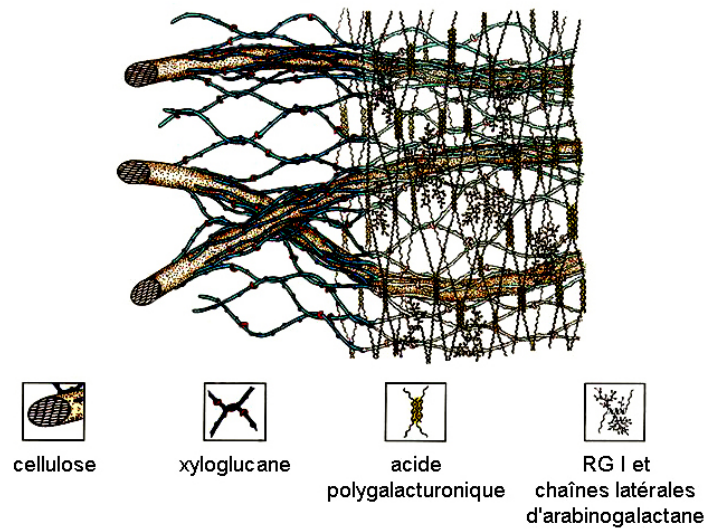


Figure I. 4 : Modèle de la paroi primaire montrant l'organisation des polysaccharides pariétaux chez les dicotylédones (modèle proposé par *Carpita et Gibaut*)

II.2. Les polysaccharides pariétaux

La paroi végétale est donc principalement constituée de plusieurs macromolécules étroitement liées entre elles. On distingue, généralement, trois composés majoritaires :

- les pectines
- les hémicelluloses
- la cellulose

II.2.1. Les pectines

Les propriétés gélifiantes de certaines substances contenues dans les fruits, sont utilisées depuis longtemps dans la fabrication des confitures. En 1825, Bracanot isole la molécule qu'il décrit comme responsable de la gélification. Elle fut nommée pectine, du grec *pectos* : rigide. L'analyse de cette "pectine" a permis de constater qu'il ne s'agissait pas d'une molécule mais d'un groupe de substances présentant une grande hétérogénéité. On les appela alors "substances pectiques" ou "pectines". Il s'agit en fait d'un groupe de polysaccharides complexes présents dans la plupart des végétaux supérieurs. Ces pectines, situées dans la paroi primaire, jouent un rôle structural important dans le maintien de l'architecture cellulaire et participent également au métabolisme végétal, notamment au niveau de l'expansion et de la défense cellulaire [27, 28].

L'hydrolyse acide totale d'une pectine fournit rarement plus de 5 sucres réducteurs, à savoir l'acide D-galacturonique, le L-rhamnose, le D-galactose, le L-arabinose, le D-xylose, et moins fréquemment, le L-fucose, l'acide D-glucuronique, et quelques fois des sucres rares comme le 2-O-méthyl-D-xylose ou le 2-O-méthyl-L-fucose.

Les pectines ont pour structure de base un enchaînement linéaire d'unités acide D-galacturonique (galacturonanes), qui peut être interrompu par des enchaînements alternés de résidus rhamnose et acide D-galacturonique (rhamnogalacturonanes). Ces derniers enchaînements peuvent être ramifiées par des chaînes latérales riches en unités arabinose et galactose (arabinanes, galactanes et arabinogalactanes). Les zones à taux élevé de sucres neutres sont appelées « zones chevelues », alors que les zones constituées uniquement d'unités acide galacturonique sont dites « zones lisses » [29-34].

Les auteurs classent alors sous le nom de pectines aussi bien les acides pectiques que leurs esters méthyliques (pectines) ou leur sels « pectates », ainsi que les polysaccharides neutres qui constituent les ramifications.

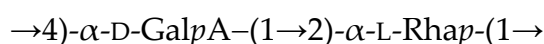
II.2.1.1. Galacturonanes (HG)

Galacturonanes ou homogalacturonanes (HG), ce sont des polymères linéaires constitués d'unités acide D-galacturonique reliées entre elles par des liaisons osidiques α -(1→4), plus ou moins estérifiées (méthylés) et/ou partiellement acétylés en O-2 ou O-3.



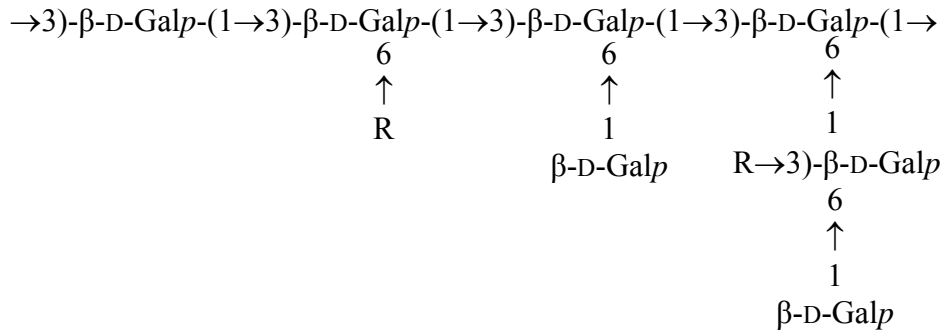
II.2.1.2. Rhamnogalacturonanes (RG)

On en distingue deux types : les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) dans lesquels les unités acide galacturonique sont intercalées par des résidus de rhamnose. L'unité de répétition disaccharidique est donc :



Entre 20 et 80 % des résidus rhamnose peuvent être ramifiés en O-4 par des chaînes latérales plus au moins longues d'arabinanes, de galactanes ou d'arabinogalactanes. Le type et le degré du substituant varie en fonction du tissu végétal et de son stade de croissance [30].

Les rhamnogalaturonanes de type II (RG-II) ont une structure beaucoup plus complexe et forment une famille de polysaccharides pectiques moins fréquente. En effet, leur squelette



R= L-Rhap ; L-Araf ; D-GlcpA ; 4-Me-O-D-GlcA

II.2.2. Les hémicelluloses

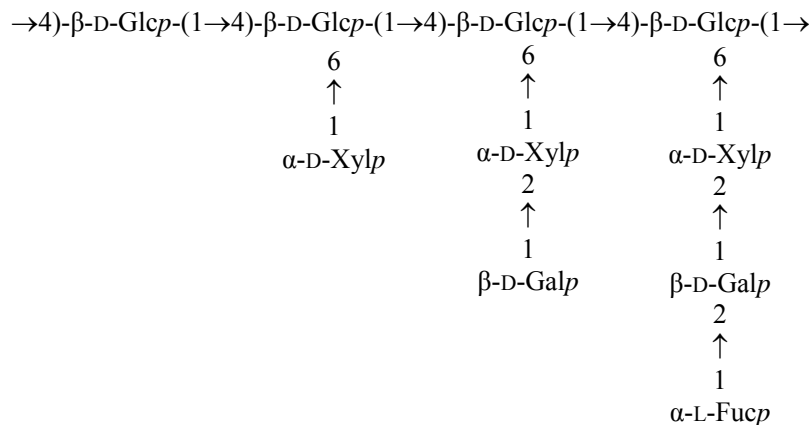
Les hémicelluloses sont des polysaccharides amorphes, constitués de sucres neutres (xylose, arabinose, galactose, glucose, mannose) et d'acides uroniques (acide glucuronique, acide 4-O-méthyl-glucuronique).

La variabilité de ces composés selon l'origine, le tissu ou le type cellulaire et selon le stade de maturité des tissus, génère une grande polydiversité structurale. On les classe alors en [47]:

- homopolysaccharides : glucanes, xylanes, mannanes...
- hétéropolysaccharides : xyloglucanes, arabinoxylanes, glucomannanes, glucuronoxylanes, glucuronoarabinoxylanes...

II.2.2.1. Xyloglucanes

Les xyloglucanes constituent la famille prédominante des hémicelluloses chez les dicotylédones. Leur chaîne principale est formée de résidus glucose liés β -(1 \rightarrow 4). Sur cette chaîne principale sont greffées des chaînes latérales contenant soit uniquement des résidus xylose, soit un disaccharide [xylose \rightarrow galactose] soit encore un trisaccharide [xylose \rightarrow galactose \rightarrow fucose] [48].



II.2.2.2. Xylanes

Les xylanes sont les polysaccharides non-cellulosiques les plus abondants dans la majorité des angiospermes où ils représentent 20 à 30% du poids sec des tissus. Ils sont principalement considérés comme constituants de la paroi secondaire où ils servent de matrice amorphe entre les fibrilles de cellulose. Ils sont aussi rencontrés dans les plantes monocotylédones, surtout dans la paroi primaire des cellules cultivées *in vitro* (rosier, érable...) [49].

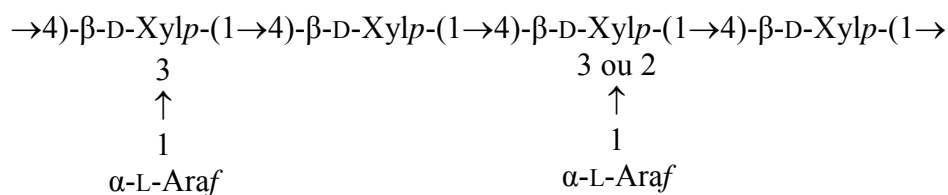
Il s'agit d'un polymère linéaire formé d'unités D-xylopyranose liées essentiellement β -(1→4), et moins fréquemment β -(1→3), avec des branchements plus ou moins réguliers. Ces chaînes latérales contiennent souvent de l'arabinose (arabinoxylanes) et/ou de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique ou de l'acide glucuronique en quantité plus ou moins importante (glucuronoarabinoxylanes, glucuronoxylanes).

Dans les xylanes extraites des algues, les résidus D-xylopyranose peuvent être soit complètement liées en β -(1→4), soit complètement liées en β -(1→3) ou à la fois liées en β -(1→4) et en β -(1→3).

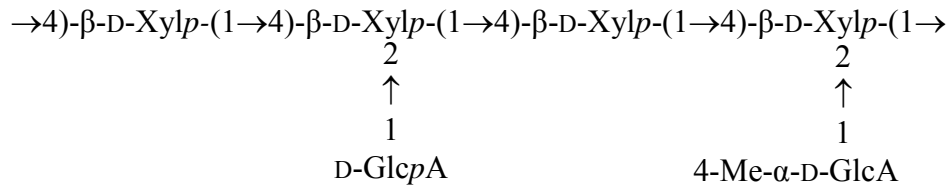
Chez les végétaux, les xylanes sont exclusivement liées β -(1→4) et peuvent être classées en xylanes neutres formées uniquement de résidus de sucres neutres, ou xylanes acides renfermant, en plus des oses neutres, des acides uroniques.

Les homoxylanes neutres constituées uniquement de résidus xylose sont de loin les plus rares. Elles peuvent être linéaires ou plus ou moins ramifiées par des résidus xylopyranose pour la plupart des xylanes des angiospermes.

Néanmoins les xylanes neutres renferment généralement de l'arabinose en plus du xylose, elles sont alors nommées arabinoxylanes. Le résidu α -L-arabinofuranose est lié à la chaîne principale par des liaisons osidiques (1→3) ou par des liaisons (1→3) et (1→2) dans les arabinoxylanes hautement substituées. Elles ont été trouvées dans la plupart des endospermes des céréales [50].

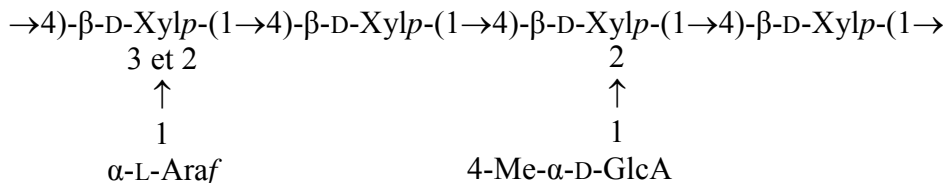


Les xylanes acides renferment soit de l'acide glucuronique soit de l'acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique, mais rarement les deux à la fois. Les résidus d'acide uronique sont liés en position O-2 aux unités xylose du squelette principal. Des xylanes substituées seulement avec de l'acide glucuronique sont moins courantes dans le règne végétal au contraire des xylanes contenant uniquement de l'acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique. Ces dernières on les trouve dans la plupart des dicotylédones avec des teneurs en acide très variables [50].



Les xylanes acides peuvent renfermer d'autres résidus notamment des unités arabinofuranose. Chez les gymnospermes par exemple, les xylanes portent généralement des résidus acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique et arabinose. Elles peuvent aussi contenir à la fois les deux acides glucuroniques et des résidus d'arabinoses [50].

Par ailleurs toutes ces familles de xylanes peuvent être partiellement acétylées en O-2 et/ou O-3.



II.2.2.3. Mannanes

Les mannanes font partie des hémicelluloses que l'on rencontre dans la paroi végétale. Elles sont considérées comme des hydrates de carbone de réserve dans les endospermes des graines. Il s'agit d'un squelette principal constitué d'un enchaînement d'unités β -(1 \rightarrow 4)-D-mannose, avec quelques branchements et/ou des groupes acétyles en position O-2 ou/et O-3 [45].



Les caractéristiques des spectres de diffraction de rayons X ont suggéré que la chaîne des mannanes possède une conformation semblable à celle de la cellulose, le système cristallin étant le système orthorhombique avec deux chaînes par maille. Cette forme native des mannanes, mannanes I, peut être convertie, d'une façon analogue à la transformation de la cellulose I en cellulose II, en une deuxième forme polymorphique, mannanes II, par un

l'hydrogène porté par le groupement OH du carbone C-3 d'un cycle et l'oxygène du cycle adjacent (O-5). Il peut également y avoir une interaction entre l'hydrogène porté par le groupement OH primaire du carbone C-6 et l'oxygène de l'hydroxyle du carbone 2 du cycle adjacent. La principale des liaisons intermoléculaires apparaît entre l'hydrogène de l'hydroxyle primaire OH-6 et l'oxygène en position O-3.

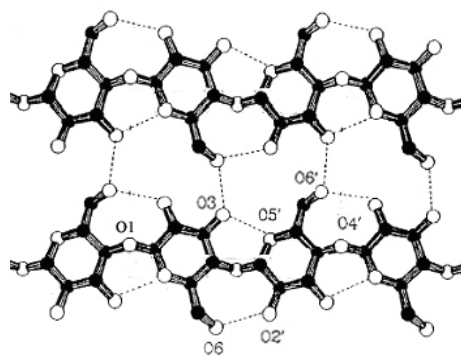


Figure I. 6 : Visualisation des liaisons hydrogène inter et intramoléculaires de la cellulose

Le nombre d'unités glucose constituant une chaîne de cellulose, appelé degré de polymérisation DP, dépend beaucoup de l'origine et du traitement subi par la cellulose au cours de sa purification. Il peut varier de quelques centaines à des milliers d'unités glucose. Néanmoins la masse de la cellulose n'est pas connue avec précision étant donné son insolubilité dans la plupart des solvants usuels et donc des réactions de dégradation qui peuvent intervenir au cours de sa solubilisation.

Tableau I. 3 : Degré de polymérisation de la cellulose de différentes sources

| Origine de la cellulose | DP | Référence |
|------------------------------------|---------------|-----------|
| Fibres de coton (paroi primaire) | 2000 à 6000 | [54] |
| Fibres de coton (paroi secondaire) | 13000 à 14000 | [54] |
| Lin, Chanvre, Ramie | 10000 | [55] |
| Bois de Bouleau | 10000 | [55] |
| Bois de l'Épicéa | 8000 | [55] |
| Pulpe de Betterave (parenchyme) | 800-750 | [56] |

II.2.3.2. Structure supramoléculaire

Du point de vue structural, la cellulose est un polymère en conformation très ordonnée. Par contre, dans la nature on ne trouve jamais de molécules de cellulose isolées

mais plutôt des empilements latéraux de plusieurs chaînes stabilisées par des liaisons hydrogène intermoléculaires. La régularité spatiale des sites impliqués dans ces liaisons et leur grand nombre confère à la cellulose un caractère fibrillaire et partiellement cristallin. Le coeur de ces microfibrilles est très cristallin tandis que les chaînes de surface constituent les zones dites paracristallines ou amorphes.

Sur la base des caractéristiques des spectres de diffraction des rayons X, on distingue principalement quatre états polymorphiques de la cellulose, désignés par cellulose I, cellulose II, cellulose III, cellulose IV [57].

La cellulose native correspond, généralement, à la forme nommée cellulose I qui est à son tour constituée, dans des proportions variables selon son origine, de deux phases cristallines :

- L'allomorphe I_{α} qui cristallise dans un système triclinique avec une chaîne par maille,
- L'allomorphe I_{β} qui cristallise dans un système monoclinique avec deux chaînes par maille.

La cellulose I, dans ses deux formes α et β , est caractérisée par un arrangement parallèle des chaînes moléculaires. C'est une forme thermodynamiquement métastable, qui peut être transformée en différentes autres formes cristallines par des traitements chimiques appropriés. Certaines de ces transformations sont irréversibles. Au sein même de la cellulose I, la phase I_{β} est plus stable que la phase I_{α} ce qui entraîne une conversion $I_{\alpha} \rightarrow I_{\beta}$ irréversible [58-60].

La transformation de la cellulose I en cellulose II se fait de façon irréversible par traitement dans une solution de soude. Ce procédé est appelé mercerisation du nom de son inventeur en 1844, Mercer. Cette forme cristalline diffère de la cellulose I d'une part par l'arrangement anti-parallèle des chaînes de cellulose dans la maille cristalline ce qui permet l'établissement d'un plus grand nombre de liaisons hydrogène et d'autre part par la présence de ces liaisons dans la diagonale de la maille [61].

Les autres allomorphes sont obtenus par traitements chimiques ou thermiques de la cellulose I ou II. En traitant avec de l'ammoniac liquide ou avec des amines la cellulose I ou la cellulose II, on obtient respectivement la cellulose III_I ou III_{II} [62]. La conversion de la cellulose I en cellulose III est totalement réversible. En effet en chauffant l'allomorphe III à 160° on obtient à nouveau la cellulose I. Paradoxalement la cellulose III est l'allomorphe le

plus stable thermodynamiquement mais on ne le trouve pas dans la nature. A contrario, l'allomorphe IV que l'on rencontre à l'état natif dans les parois primaires de certaines plantes, est considéré comme étant une forme désordonnée de la cellulose I [63, 64]. Il est obtenu aussi, de façon irréversible, en portant à haute température dans le glycérol la cellulose III.

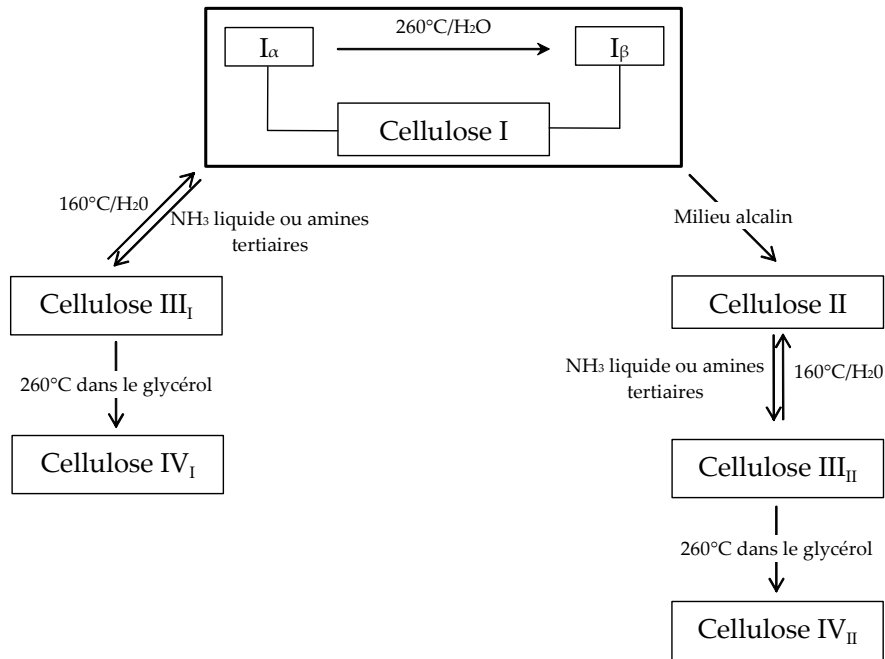


Figure I. 7 : Relation entre les différents allomorphes de la cellulose

Tableau I. 4 : Paramètres de la maille cristalline des différents allomorphes de la cellulose

| Polymorphe | maille | a (nm) | b (nm) | c (nm) | γ (°) | Références |
|---------------|--------------|--------|--------|--------|-----------------------------------|------------|
| I $_{\alpha}$ | triclinique | 0.593 | 0.674 | 1.036 | $\alpha=67, \beta=117, \gamma=99$ | [65] |
| I $_{\beta}$ | monoclinique | 0.801 | 0.817 | 1.036 | 97.3 | [65, 66] |
| II | monoclinique | 0.801 | 0.904 | 1.036 | 117.1 | [61] |
| III | monoclinique | 1.025 | 0.778 | 1.034 | 122.4 | [67] |
| IV | monoclinique | 0.801 | 0.812 | 1.034 | 120 | [68] |

II.2.3.3. Morphologie de la cellulose native

A l'état natif, la cellulose fait partie d'un édifice architectural complexe qui varie en fonction de l'organisme considéré. Les chaînes individuelles de cellulose sont associées en microfibrilles, elles-mêmes associées en fibrilles. Malgré l'essor considérable de l'état des connaissances sur la composition et la structure de la cellulose, sa structure cristalline et sa

morphologie font encore l'objet de controverses. Jusqu'aux années 30 du siècle précédent, elle a été considérée comme un assemblage en micelles constituées de particules dont la cohésion est assurée par une matrice adhésive d'hémicelluloses [69]. Cette hypothèse a été améliorée en considérant que cet assemblage est plutôt constitué de briques cristallines d'une centaine d'unités glucose. Néanmoins l'existence des zones amorphes est restée sans interprétation jusqu'à ce que l'on établisse le modèle de franges micellaires où les micelles sont considérées comme des régions ordonnées (cristallines) distribuées statistiquement dans une masse de chaînes alignées (amorphes) [69].

Actuellement et sur la base des observations en microscope électronique, il est admis que la microfibrille est l'élément structural de base [70]. Celle-ci est un assemblage de chaînes de molécules agencées parallèlement et stabilisées par les liaisons hydrogène. Le diamètre de la microfibrille varie, selon l'origine de la cellulose, de 2 nm à 20 nm pour une longueur qui peut atteindre plusieurs dizaines de microns.

Par ailleurs, l'arrangement des chaînes à l'intérieur même de la microfibrille a suscité de nombreuses discussions et plusieurs modèles ont été proposés (Figure I.8).

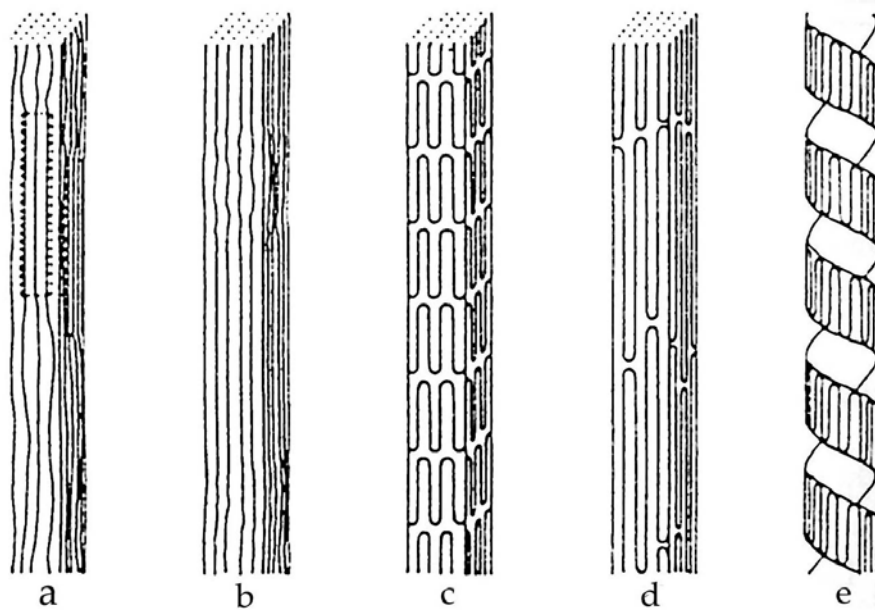


Figure I. 8 : Arrangement des chaînes de cellulose selon les différents modèles

a : frange micellaires (kratky et coll. [71]) ;

b : frange chaînes étendues avec alternance de zones paracristallines et cristallines (Hess [72]) ;

c : arrangement de chaînes repliées (Dolmetsh et coll. 1961[73]) ;

d : conformation en chaînes entremêlées (Marx figni et coll.[74]) ;

e : arrangement en serpentins de chaînes repliées (St John Manley 1964 [75])

Parmi ces modèles, deux ont été principalement retenus. Dans le premier, les chaînes de cellulose sont considérées comme complètement étirées tandis que dans le deuxième elles sont considérées plutôt repliées. Cependant, les études récentes, surtout par diffraction des rayons X aux petites angles et microscopie électronique, ont conduit à l'adoption du premier modèle. Celui-ci a été confirmé par la suite par des travaux sur la polarité des chaînes au sein des microfibrilles [76, 77].

II.2.3.4. Organisation des microfibrilles au sein de la paroi cellulaire

Les cellules végétales possèdent une paroi cellulosique rigide qui double leur membrane plasmique, ce qui leur permet de résister aux changements de pression osmotique. Les microfibrilles de cellulose sont donc les éléments constitutifs de base de cet édifice architectural. Il s'agit d'une structure complexe dont la composition et l'organisation diffèrent en fonction des espèces et des activités physiologiques de la cellule. On distingue deux types de parois : la paroi primaire et la paroi secondaire.

La paroi primaire est mise en place lors de la division cellulaire et marque ainsi la croissance et l'extension cellulaire. Les microfibrilles de cellulose constitutives de cette paroi primaire n'ont pas d'orientation préférentielle et sont enrobées dans une matrice de polysaccharides pectiques et hémicellulosiques, ce qui confère à cette assise une architecture fibrillaire relativement lâche.

Après la croissance et la différenciation des cellules et lorsque celles-ci atteignent leur taille définitive, une paroi secondaire souvent lignifiée et dépourvue de pectines est déposée et marque l'arrêt de toute modification de la forme de la cellule. Au contraire de la paroi primaire, la paroi secondaire contient une forte proportion de microfibrilles de cellulose. Elle est d'une grande rigidité étant donné la compacité et la cristallinité du réseau microfibrillaire constitutif. Ces microfibrilles sont disposées de façon régulière en hélices par rapport à l'axe de la cellule, et disposées en strates successives et concentriques (S1, S2 et S3) pour lesquelles le sens d'enroulement des hélices peut changer d'une strate à l'autre (Figure I.9). Dans la strate S1, elles sont hachurées en croisillons sans orientation particulière. Dans S2 elles sont orientées d'un léger angle par rapport à l'axe de la cellule tandis que dans S3 elles forment une hélice plate dans la direction transversale de la cellule.

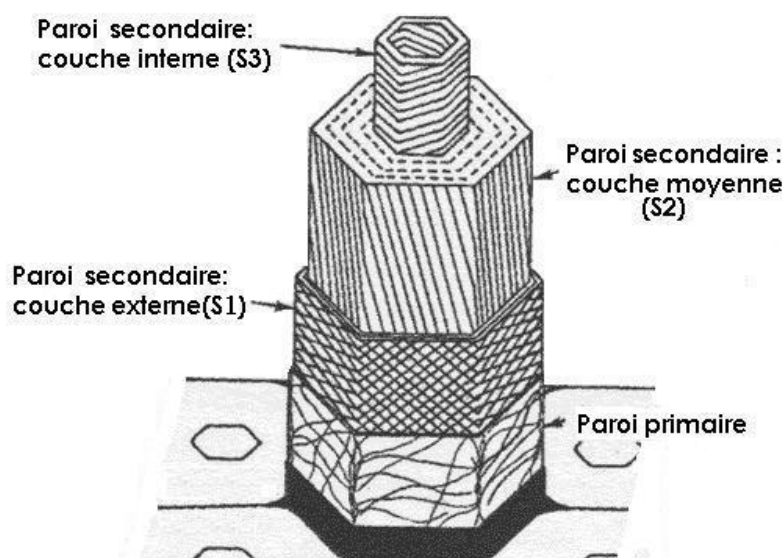


Figure I. 9 : Représentation schématique de la paroi cellulaire

III. Rappels sur les méthodes d'extraction des polysaccharides pariétaux

L'analyse des polysaccharides à partir d'une matrice végétale complexe nécessite une étape préliminaire obligatoire d'extraction. Le choix des conditions opératoires de la méthode d'extraction est essentiel pour garantir la fiabilité des résultats ultérieurs. Certes, l'extraction doit répondre à trois critères fondamentaux : être quantitative, sélective et non altérante. S'il est difficile pour une seule méthode de concilier ces trois exigences, l'important est d'en connaître les limites. La nature et la composition chimique primaire de la matrice orientent ainsi ce choix, et on distingue en général deux types de matériaux végétaux. Les matériaux constitués de cellules à paroi primaire, généralement du parenchyme, qui sont très riches en pectines, et les matériaux composés de cellules à paroi secondaire habituellement dénués de pectines mais riches en hémicelluloses et lignine.

III.1. Purification des parois cellulaires

L'étape d'extraction des polysaccharides à partir d'un végétal est précédée d'une étape de purification des parois cellulaires. Elle consiste à éliminer par des étapes d'extraction appropriées mécaniques, chimiques ou parfois enzymatiques, les substances qui incrustent les polysaccharides pariétaux. Les méthodes proposées tiennent compte de la nature chimique de ces substances ainsi que de la morphologie de la paroi (primaire ou secondaire).

Parmi ces contaminants, les substances de nature lipidique ou phénoliques (cires, tanins, polyphénols) sont généralement les constituants que l'on rencontre le plus souvent dans les diverses parois végétales. Elles sont éliminées par des successions d'extraction à l'aide de solvants organiques. La nature, à la fois apolaire et polaire de ce mélange de substances, nécessite l'utilisation de solvants apolaires et polaires. Généralement ce sont des mélanges d'alcools, éthanol en particulier, et des solvants apolaires (toluène, benzène, acétone...) qui sont utilisés.

Malgré sa nature polysaccharidique, l'amidon rencontré dans certains tissus de parenchyme (pomme de terre par exemple) ou dans l'endosperme des graines est considéré comme un contaminant si l'on s'intéresse à l'étude des polysaccharides pariétaux. C'est une forme de réserve énergétique généralement stockée dans les leucoplastes des cellules et ne faisant pas parti des constituants de la paroi cellulaire. Son élimination est obtenue par des broyages mécaniques et tamisages pour les matériaux riches en amidon ou par des extractions ou des digestions enzymatiques dans le cas contraire.

III.2. Extractions des polysaccharides

III.2.1. Extraction des pectines

Le schéma classique d'extraction des pectines se compose de plusieurs étapes permettant l'extraction des différents groupes de polysaccharides pectiques [78-80]. Il se présente comme suit :

- Les pectines fortement méthylées, acides pectiques ou leurs sels pectates ont une grande affinité à l'eau, elles sont donc extractibles par l'eau à chaud généralement à des températures inférieures à 80°C. Des milieux tamponnés sont également utilisés.
- Les pectines faiblement méthylées, acides pectiniques ou pectinates qui sont présentes dans la paroi complexées par des ions calcium, sont extractibles par un agent chélatant du calcium (oxalate d'ammonium, éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), 1,2-cyclohexane diamine tétra-acétique (CDTA), hexamatphosphate...). Ces composés forment avec les pectines des pectates aisément solubles dans l'eau à chaud.
- Les protopectines insolubles dans l'eau et non extraites avec un agent chélatant étant donné leur forte association à la matrice végétale (surtout aux hémicelluloses et protéines), sont extraites par un acide dilué à chaud ou une base diluée à froid. Parmi les

acides organiques ou minéraux utilisés, on peut citer l'acide tartrique, l'acide sulfurique, l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique. La soude est la base la plus couramment utilisée, mais, elle peut être remplacée par d'autres bases (KOH, Na₂CO₃...) ayant un faible pouvoir extractif. En effet, au cours de l'extraction à la soude, on peut solubiliser également les hémicelluloses.

III.2.2. Extraction des hémicelluloses

D'une manière générale, l'extraction des hémicelluloses qui sont majoritaires dans les dicotylédones est réalisée par des solutions alcalines. Elle peut être cependant réalisée avec des solvants organiques, le plus souvent le DMSO. Elle peut être conduite selon deux modes fondamentaux d'extraction qui dépendent de la nature du matériel végétal et tiennent essentiellement à la présence plus au moins grande de la lignine [81].

- Sans délignification préalable : appliquée surtout à des matériaux peu lignifiés en l'occurrence les parois primaires,
- Après délignification : plus au moins soluble en milieu alcalin, la lignine risquerait de contaminer les extraits polysaccharidiques. C'est pourquoi, les matériaux fortement lignifiés (parois secondaires) nécessitent un traitement délignifiant au préalable.

A l'état natif, les hémicelluloses sont plus au moins acétylés en position O-2 ou O-3 et intimement liés aux autres polysaccharides pariétaux par des liaisons hydrogène. Ainsi, lors des extractions alcalines, les hémicelluloses deviennent solubles à la fois suite à la saponification de ces esters et suite aux réactions de rupture de ces liaisons. Les concentrations en alkali peuvent varier de 1 à 24 %.

L'extraction de certains groupes d'hémicelluloses nécessite l'ajout dans le milieu d'autres réactifs. Par exemple, l'ajout des ions borates favorise l'extraction des glucomannanes. Le borate forme avec les groupements hydroxyles OH-2 et OH-3 en cis du mannose des complexes qui vont être plus solubles en milieu alcalin [49, 82].

Ces extractions alcalines peuvent être aussi combinées à des traitements thermiques à la vapeur dont le but de rendre les hémicelluloses pariétaux plus accessibles.

III.2.3. Purification de la cellulose-blanchiment

Dans la littérature, on parle rarement de l'extraction de la cellulose mais plutôt de purification de la cellulose ou encore d'une façon plus explicite de l'enrichissement en cellulose. Cet enrichissement résulte de l'élimination de tous les contaminants qui peuvent exister tant phénoliques que pectiques ou hémicellulosiques par les méthodes décrites ci-dessus.

Généralement, la lignine est le contaminant résiduel qui reste fortement associée à la cellulose après l'élimination des pectines et des hémicelluloses. Elle est éliminée ou transformée à l'aide d'agents oxydants communément appelés agents de blanchiment. Les réactifs de blanchiment les plus utilisés ont été pendant longtemps des réactifs chlorés. Le chlorite de sodium est le dérivé chloré le plus utilisé au moins à l'échelle du laboratoire. Il a été utilisé pour la première fois par Jayme [83] puis développé par Wise *et al.* [84]. C'est un traitement doux non altérant réalisé en milieu tamponné et à 70°C. Mais en raison de contraintes environnementales, les agents chlorés sont progressivement abandonnés au profit d'agents de blanchiment plus écologiques tels que l'ozone ou l'eau oxygénée.

III.3. Les réactions de dégradation

Au sein de la paroi, la cohésion entre les polysaccharides est assurée à la fois par des liaisons hydrogène et des interactions de type Van-der Waals. Les différentes extractions doivent donc être réalisées dans des conditions à la fois fortes qui permettent la rupture de ces liaisons, et suffisamment douces pour éviter toute dégradation ou modification. Néanmoins, les polysaccharides sont exposés au cours des extractions à différentes réactions de dégradation en fonction de la nature du polysaccharide et des conditions opératoires.

III.3.1. Les pectines

Au cours des différentes extractions, les pectines peuvent subir deux grands types de réactions de dégradation selon la température et le pH du milieu [85, 86]:

- La dé-estérification

Elle résulte de l'hydrolyse, en milieu alcalin même à basse température, des esters méthyliques portés par les groupements carboxyliques ou des groupements acétyles portés par les hydroxyles OH-3 et/ou OH-4 (Figure I.10).

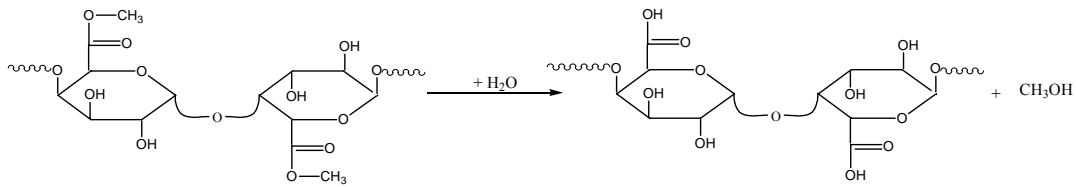


Figure I. 10 : La dé-estérification des pectines

- La dépolymérisation

Elle s'effectue par hydrolyse acide à haute température des liaisons osidique libérant ainsi de l'acide galacturonique, du méthanol, du gaz carbonique, de l'acide 5-formyl furanoïque et du furfural. En milieu basique et à haute température, la dépolymérisation peut être provoquée par une réaction de β -élimination résultante d'une trans-élimination du proton H-5 à caractère acide (Figure I.11).

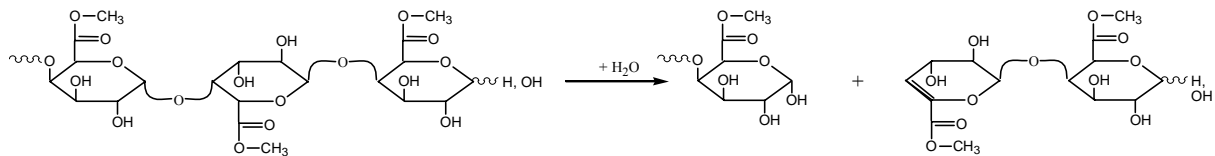


Figure I. 11 : La dépolymérisation des pectines par β -élimination

III.3.2. Les hémicelluloses

- La dépolymérisation

Comme pour les polysaccharides pectiques, en milieu fortement acide les hémicelluloses sont dégradés suite à des réactions d'hydrolyse des liaisons osidiques. En milieu fortement alcalin un phénomène de peeling à partir de l'extrémité réductrice peut, de la même façon que pour la cellulose, avoir lieu et se poursuivre par la β élimination récurrente (voir plus loin). Ce peeling peut être stoppé par ajout d'un réducteur tel que le brohydrure de sodium qui réduit les fonctions aldéhydes des unités terminales réductrices [49, 82, 87].

- L'oxydation

Lors de la délignification, qui nécessite généralement des traitements par des agents oxydants ou réducteurs, les extrémités réductrices ainsi que les hydroxyles vicinaux (2 et 3) des hexoses peuvent être oxydés. Ces oxydations peuvent entraîner des chutes importantes des masses moléculaires. L'ajout de sels de manganèse au cours de la délignification limite cette dépolymérisation [49, 82, 87].

III.3.3. La cellulose

Comme tous les polyosides, la cellulose est susceptible de se dégrader au cours des traitements chimiques. Mais d'une manière générale les réactions de dégradation de la cellulose sont toujours limitées et plus lentes que sur les autres polysaccharides en raison de son caractère cristallin qui lui confère une certaine inaccessibilité. Ainsi, en milieu acide, la cellulose subit une hydrolyse des liaisons osidiques essentiellement dans les zones amorphes. Cette hydrolyse dépend de la concentration en acide, de la température et de la durée du traitement. En milieu alcalin, la cellulose peut aussi être dégradée ou transformée en fonction de la concentration en soude et de la température. La plus grande dégradation observée sur la cellulose en milieu alcalin est le peeling. Il s'agit d'une élimination progressive d'unités anhydroglucose à partir de l'extrémité réductrice des chaînes de cellulose. Le mécanisme de cette dégradation a été élucidé par Kenner *et coll* (Figure I.12) [88].

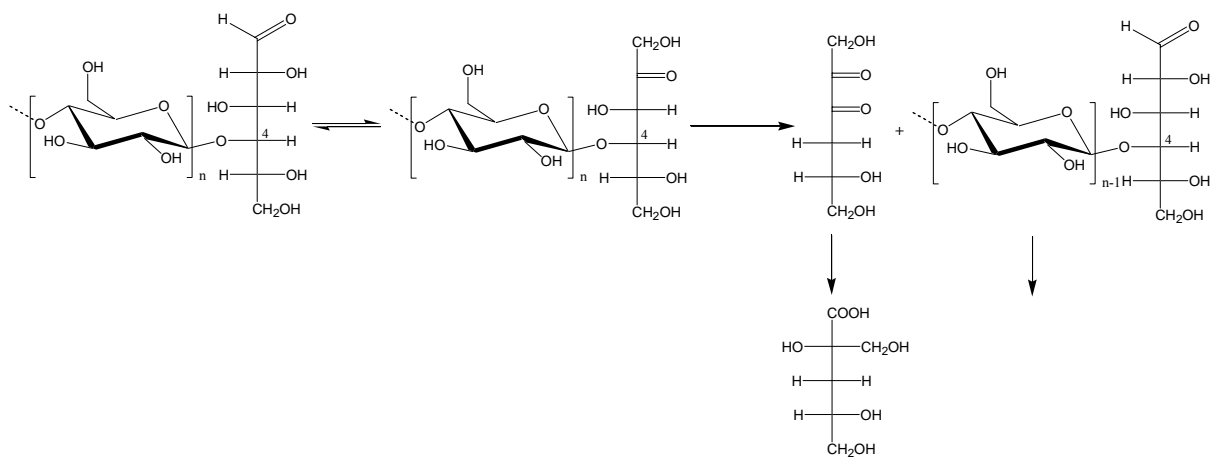


Figure I. 12 : Le mécanisme de peeling de la cellulose [88]

CHAPITRE II

ETUDE DE LA GRAINE DE LA FIGUE

DE BARBARIE

I. Introduction

Les graines du figuier de barbarie ont suscité ces dernières années beaucoup d'intérêt à l'instar des autres pépins en particulier ceux des raisins et les études se sont multipliées pour caractériser leur constituants afin d'évaluer surtout leur valeur nutritive [89]. D'après Uchoa *et coll.* les réserves protéiques de la graine sont des albumines [90]. Cependant, l'attention s'est focalisée surtout sur les huiles contenues dans ces graines et qui étaient pour nous aussi un de nos objectifs au début de cette étude. Nos résultats préliminaires (résultats non publiés) ainsi que d'autres études sur l'huile de la graine du figuier de barbarie ont montré qu'elle appartient à la catégorie des huiles « polyinsaturées » comme la plupart des huiles végétales. Elle est composée, du point de vue acides gras, majoritairement d'acide linoléique et d'acide oléique, et elle présente ainsi de par sa composition une grande similitude avec l'huile de maïs [91-96]. Par contre sa particularité réside dans sa richesse en matière insaponifiable (stérois et tocophérols). Cette caractéristique pourrait être un bon atout pour son exploitation dans le domaine de la cosmétologie étant donné les effets bénéfiques de ces substances sur l'élasticité de la peau, le métabolisme cellulaire et la restauration de la structure cutanée. Ceci explique d'ailleurs la demande actuelle accrue de cette huile sur le marché. Néanmoins à l'exception de l'utilisation des huiles, aucune exploitation industrielle n'est connue à ce jour.

L'extraction de ces huiles génère un tourteau qui constitue jusqu'à 90% du poids sec de la matière première. Ce résidu est très riche en fibres cellulosiques et a donc suscité notre intérêt. Les données bibliographiques disponibles relatives aux fibres cellulosiques des graines de la figue de barbarie ou aux autres polysaccharides constitutifs sont très rares, voire inexistantes. Les rares auteurs ayant fourni des données mentionnent surtout des dosages quantitatifs de la cellulose, des hémicelluloses et des autres constituants [97].

Pour juger de l'opportunité de toute éventuelle exploitation industrielle des graines du figuier de barbarie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation chimique de leurs polysaccharides pariétaux.

II. Etude préliminaire

II.1. Isolement

Les graines utilisées ont été récupérées à partir des fruits du figuier de barbarie issus d'un cultivar pilote à proximité de Marrakech. Ces fruits ont été récoltés en fin de maturité et ils ont été soigneusement sélectionnés. Les fruits, dont le poids oscille entre 80 et 120g, ont été épluchés afin de récupérer la pulpe du fruit. Cette pulpe est parsemée de plusieurs petites graines (pépins) qui sont empilées de façon assez régulière. La cohésion entre les graines est assurée par le mucilage et les fibres contenus dans la pulpe (Figure II.1). Afin d'isoler ces graines, la pulpe a été mixée pendant cinq minutes dans un mixeur et les graines, suffisamment dures pour résister à ce mixage, sont facilement séparées du jus après un passage à travers un tamis. Elles ont, par la suite, été lavées abondamment à l'eau puis séchées dans une étuve ventilée et chauffée à 35°C.

Les graines ainsi récupérées sont très dures, de forme plate, plus au moins réniformes ou lenticulaires. Le tableau II.1 regroupe les données sur le poids des fruits et les pourcentages respectifs des graines.

Il a été démontré que le pourcentage et le nombre de graines par fruit varie en fonction de plusieurs facteurs dont la variété, la physiologie et l'environnement de culture. Donc, ce pourcentage des graines par rapport au poids total des fruits peut varier d'un cultivar à l'autre. Pour notre cas, le nombre de graines varie entre 50 et 75 graines par fruit, donc il oscille entre 6 et 8% par rapport au poids frais des fruits, ce qui correspond à 30- 40% par rapport au poids sec des fruits. Ces résultats sont en tout accord avec ceux publiés par Barbera *et coll* [98].

Tableau II. 1 : Récapitulatif du poids, siccité et pourcentage en graines des fruits

| Échantillon | Poids du fruit (g) | Poids sec du fruit (g) | Pourcentage en graines * |
|-------------|--------------------|------------------------|--------------------------|
| Lot 1 | 85.46 | 15.38 | 40 % |
| Lot 2 | 75.25 | 15.05 | 33 % |
| Lot 3 | 75.60 | 15.12 | 32 % |
| moyenne | 78.77 | 15.18 | 35 % |

* par rapport au poids sec

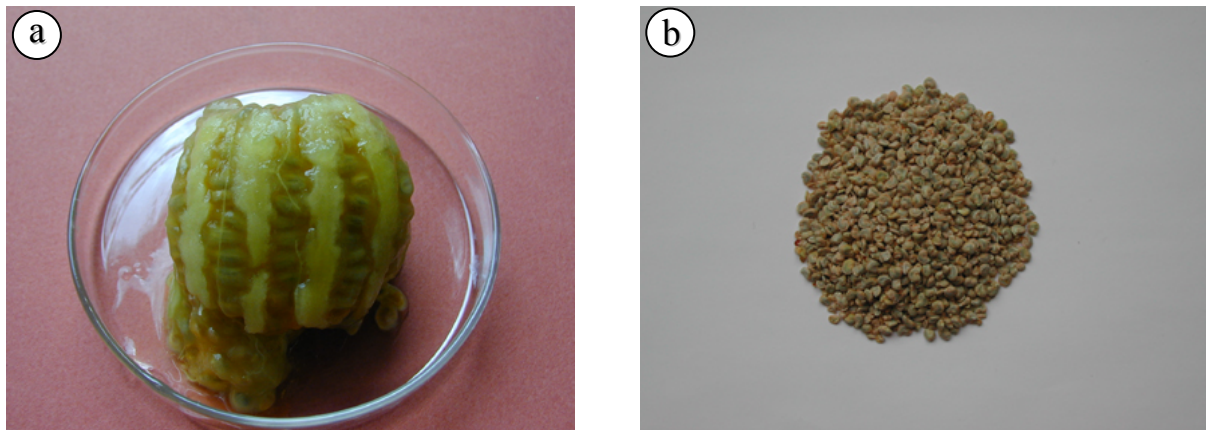


Figure II. 1 : (a) : pulpe du fruit du figuier de barbarie parsemée de plusieurs graines, (b) : graines isolées du fruit du figuier de barbarie

II.2. Composition chimique

L'analyse élémentaire a été menée à partir des graines entières du figuier de barbarie qui ont été broyées, par plusieurs passages dans un moulin à céréales muni de meules en pierre (type SAMAP). Ce broyeur est équipé d'un système de ventilation qui permet d'éviter tout échauffement susceptible d'affecter la cristallinité des fibres cellulose. Dans un premier temps, nous avons déterminé la quantité d'huile contenue dans les graines, les pourcentages en matière minérale, en protéines, le taux de lignine. Dans un deuxième temps nous avons réalisé un dosage de sucres neutres. Nous regroupons les résultats obtenus dans le tableau II.2.

Tableau II. 2 : Composition chimique des graines du figuier de barbarie

| Constituants | Pourcentage* | | | | | |
|-------------------------------------|--------------|-----|------|-----|-----|------|
| Eau | 5-6 % | | | | | |
| Huile | 7-8.5 % | | | | | |
| Minéraux (cendres) | 1.3 % | | | | | |
| Lignine Klason | 18 % | | | | | |
| Protéines (N*6,25) | 11-12% | | | | | |
| Cellulose | 30 % | | | | | |
| Autres polysaccharides | 27 % | | | | | |
| Sucres neutres et acides : * | | | | | | |
| AU | Rha | Ara | Xyl | Man | Gal | Glu |
| 1.1 | 0.6 | 3.1 | 23.8 | 1.0 | 1.0 | 35.6 |

* en poids par rapport à la matière sèche

II.3. Conclusion

L'analyse préliminaire de la graine du figuier de barbarie a révélé qu'elle est lignifiée et renferme en quantité considérable des protéines et des huiles. Les éléments minéraux (cendres) sont en faibles quantités (1.3%). Nous pouvons aussi constater, à la vue de ces résultats, que la graine de la figue de barbarie contient une quantité importante de polysaccharides. Le dosage des sucres neutres révèle une majorité de glucose et de xylose provenant de la cellulose et des hémicellulose riches en xylose tels que xyloglucanes et/ou xylanes. Par contre nous n'avons détecté que des traces de mannose ce qui est inattendu car ce sucre est considéré comme un élément nutritif lors de la germination des graines. Il est stocké sous forme de mannanes ou galactomannanes dans l'endosperme des graines dans la plupart des angiospermes.

III. Etude morphologique

Une étude morphologique a été réalisée afin d'établir la constitution et l'organisation des tissus cellulaires qui forment la graine. L'étude a été réalisée sur des coupes semi-fines et ultra-fines réalisées à l'aide d'un ultramicrotome MTX RMC (voir partie expérimentale).

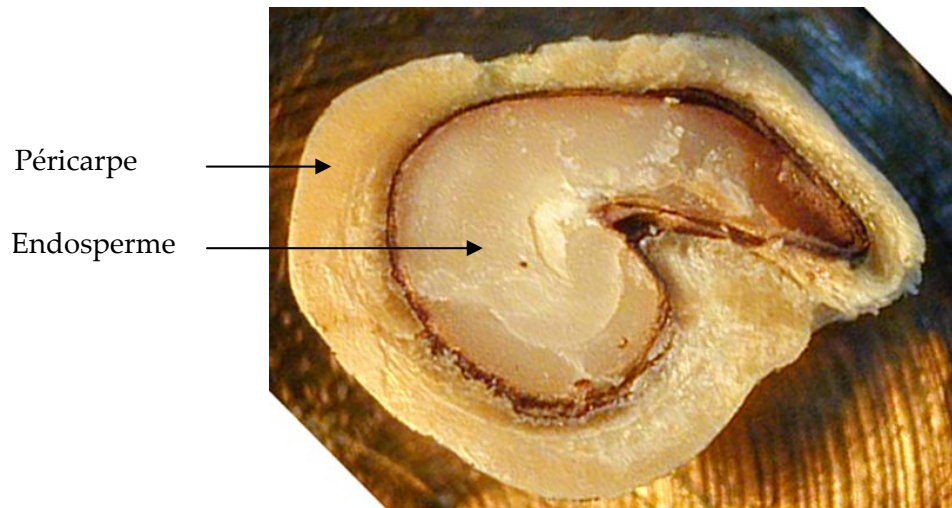


Figure II. 2 : Coupe transversale de la graine de la figue de barbarie (M. Optique)

L'observation au microscope optique d'une coupe transversale de la graine montre qu'elle est constituée de deux parties distinctes (Figure II.2) : une enveloppe (péricarpe) et un noyau (endosperme). L'analyse morphologique a été réalisée par microscopie électronique à balayage et à transmission.

- L'endosperme : Il est constitué de cellules de parenchyme de réserve à paroi très fine renfermant de nombreux leucoplastes qui forment de petits grains d'amidon (Figure

II.3-a). Entre les tissus riches en amidon s'intercale une couche de gluten (couche à aleurone) qui donne au noyau son aspect visqueux. L'ensemble de ces cellules est enrobé dans une paroi cellulaire épaisse en forme de tuile inversée (Figure II.3-b).

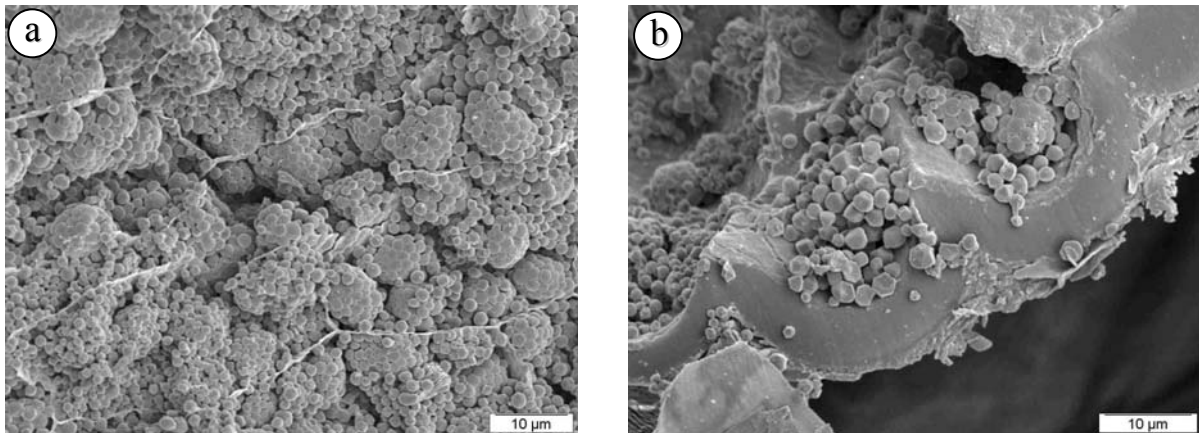


Figure II. 3 : Endosperme de la graine de la figue de barbarie (MEB)

- Le péricarpe : On peut distinguer deux types de cellules : en majorité des cellules longues très compactes en forme de fibres fusiformes et quelques vaisseaux spiralés. Les fibres sont communément appelées fibres de sclérenchyme (Figure II.4-a). Ce tissu de soutien est largement répandu dans les téguments des graines, noyaux des fruits, cellules pierreuses, épines et aiguillons des tiges et des feuilles. Les couches régulières de cellulose, qui garnissent leur paroi épaisse, présentent un arrangement hélicoïdal (Figure II.4-b, c). Cela donne une grande rigidité ou une grande souplesse aux organes végétaux. En effet ils sont très rigides quand ils sont lignifiés (dans la plupart des cas). On parle alors de fibres dures. Ils sont très élastiques quand ils ne sont pas lignifiés. C'est le cas de fibres molles qui sont assimilées à des cellules de collenchyme. On rencontre également, à des emplacements bien précis au niveau du péricarpe de la graine, des vaisseaux conducteurs spiralés en simple hélice (Figure II.5) [99, 100].

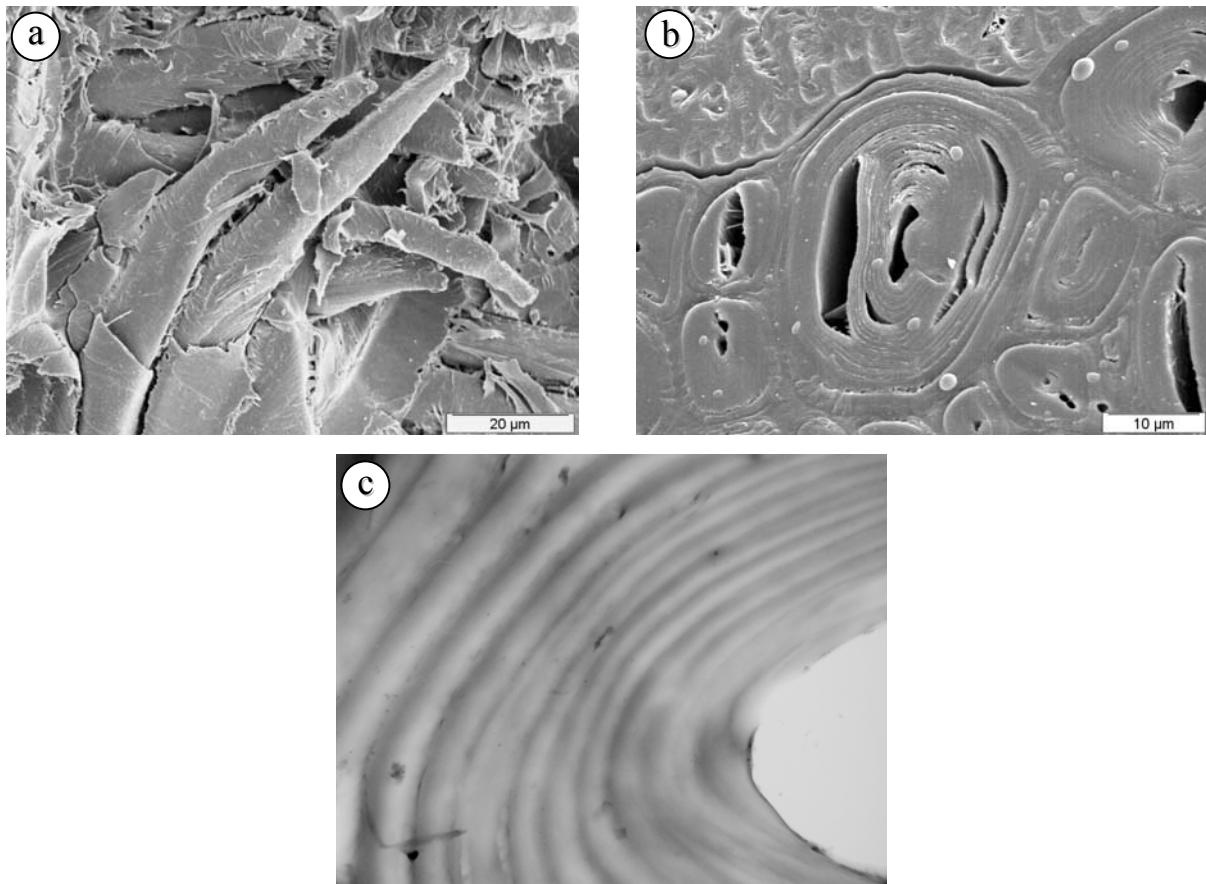


Figure II. 4 : Fibres de sclérenchyme fusiformes (spindle) (a), organisées en strates hélicoïdales de cellulose (b) (MEB) (c) faces externes des hélices (MET)

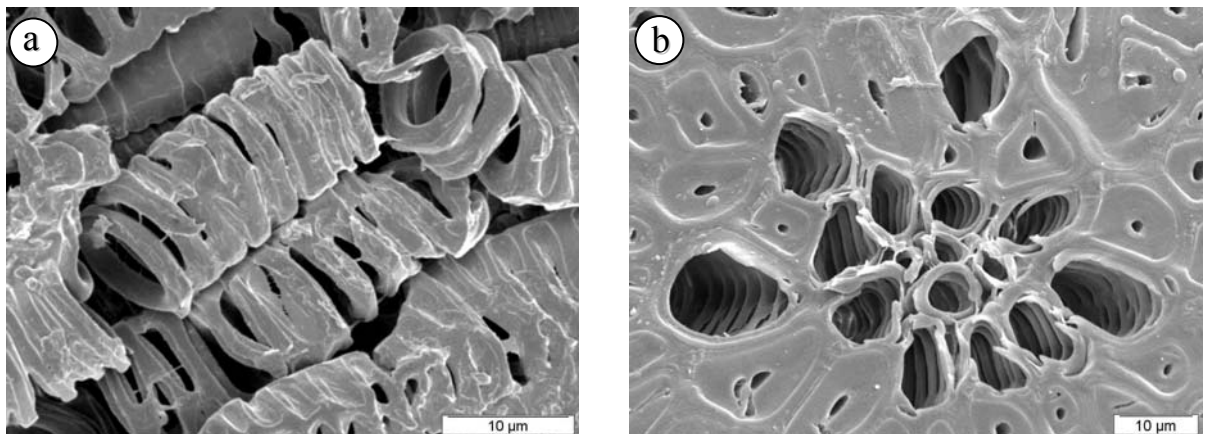


Figure II. 5 : Vue transversale (a) et longitudinale (b) des vaisseaux conducteurs spiralés en simple hélice (MEB).

Conclusion

L'étude morphologique nous a permis de préciser l'organisation des tissus au sein des deux parties de la graine. L'endosperme est constitué principalement de granules d'amidon enrobés dans une paroi cellulaire parenchymateuse en forme de tuile. Le péricarpe est constitué de fibres de sclérenchyme dont les microfibrilles de cellulose sont disposées en

couches successives concentriques. Cette organisation concentrique a déjà été rencontrée dans un certain nombre de végétaux.

IV. Etude du péricarpe

Le péricarpe de la graine de la figue de barbarie représente jusqu'à 90% du poids total de la graine. Il est formé principalement, comme il a été montré lors de l'étude morphologique, de fibres de sclérenchyme. Ce tissu de soutien est largement répandu dans les graines des angiospermes. Il s'agit de cellules à parois secondaires inextensibles lignifiées et habituellement dépourvues de pectines. Le ciment pectique est alors remplacé par des dépôts d'hémicelluloses composés, dans la plupart des cas, de xyloglucanes ou de xylanes. Ce composite naturel est souvent très compact formant une charpente végétale très dure comme c'est le cas du péricarpe de la graine de la figue de barbarie que nous nous proposons d'étudier dans cette partie de ce travail.

Nous avons étudié l'extraction, la purification et la caractérisation des hémicelluloses pariétaux et du résidu constitué de fibres cellulosiques. Les résultats obtenus nous ont permis d'élaborer des hypothèses concernant l'organisation de ces polysaccharides dans la paroi.

IV.1. Composition en sucres

Les parois cellulaires sont constituées principalement de polysaccharides. L'hydrolyse acide permet de déterminer la composition en oses neutres et acides renfermés dans le péricarpe de la graine de la figue de barbarie. Le tableau II.3 regroupe les résultats obtenus et à titre comparatif nous avons reporté la composition de la graine entière.

Tableau II. 3 : Composition en oses neutres et acides de la graine de la figue de barbarie entière et de son péricarpe

| Echantillon | Sucres neutres et acides (% massique) | | | | | | |
|----------------|---------------------------------------|-----|-----|------|-----|-----|------|
| | AU | Rha | Ara | Xyl | Man | Gal | Glu |
| Graine entière | 1.1 | 0.6 | 3.1 | 23.8 | 1.0 | 1.0 | 35.6 |
| Péricarpe | 2.6 | - | 1.1 | 46.2 | - | - | 33.7 |

Au regard de ces résultats, il apparaît que le péricarpe est constitué majoritairement de xylose et de glucose, les autres sucres n'étant présent qu'à l'état de traces. Le péricarpe est donc constitué essentiellement de cellulose et d'hémicelluloses.

IV.2. Extractions séquentielles des polysaccharides non cellulosiques

Nous avons vu précédemment que le péricarpe de la graine de la figue de barbarie est constitué d'hémicelluloses et de cellulose. L'organisation de ces polysaccharides dans la paroi végétale est assurée essentiellement par un réseau de liaisons hydrogène entre les différents polymères. Leur séparation est donc réalisée par des traitements permettant de rompre ces liaisons. L'extraction par voie alcaline constitue la meilleure méthode d'extraction qui entraîne la rupture des liaisons hydrogène et des interactions ioniques, ainsi que la dégradation de liaisons covalentes de type esters. C'est pour cela que nous avons choisi l'extraction des polysaccharides non cellulosique du péricarpe de la graine de la figue de barbarie par des solutions alcalines. Ces extractions peuvent être réalisées avec des solutions de soude ou de potasse de concentrations croissantes. La soude permet de mieux solubiliser les hémicelluloses que la potasse, d'où son choix dans notre schéma d'extraction.

Le péricarpe de la graine de la figue de barbarie a été dégraissé à l'aide d'un mélange azéotropique Toluène-Ethanol (38 :62 v/v) puis traité à l'eau chaude. Il a subi ensuite une séquence de six extractions alcalines avec des solutions de soude de concentrations croissantes (allant de 0.5 à 3 M) à 80°C. Chaque étape de la séquence a été conduite pendant deux cycles de deux heures chacun et en présence d'un agent réducteur (NaBH_4). Cet agent est classiquement utilisé pour diminuer les risques de peeling des polysaccharides au cours des extractions alcalines. Les extractions ont été réalisées avec une agitation mécanique (Figure II.6).

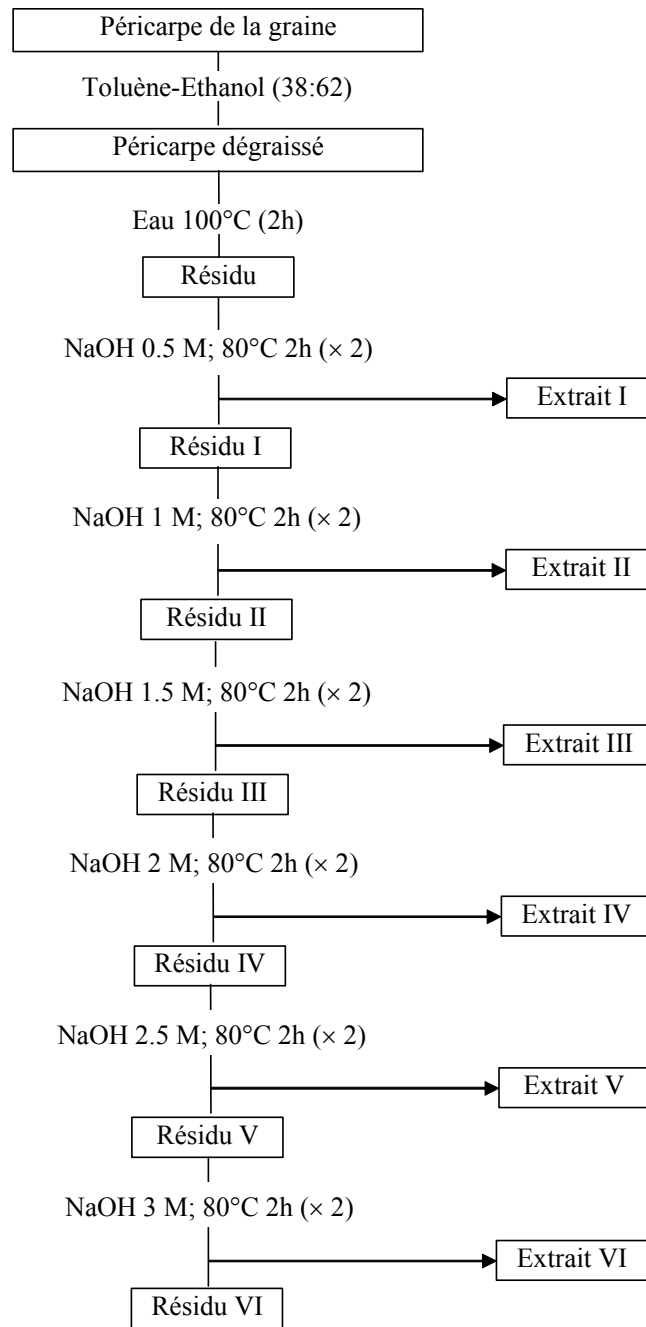


Figure II. 6 : Schéma d'extraction des polysaccharides du péricarpe de la graine de la figue de barbarie

Les extraits sont séparés des résidus d'extraction par filtration sur une toile de nylon (porosité 100µm) puis neutralisés après retour à température ambiante, à l'aide d'une solution aqueuse d'acide acétique 50% (v/v) puis conservés à 4°C toute une nuit. Les précipités formés sont récupérés par centrifugation (11200g) puis dialysés contre l'eau distillée et lyophilisés. Les surnageants sont précipités à leur tour par ajout d'éthanol 96% jusqu'à un rapport final 1:4 (solution : éthanol). Les précipités formés sont récupérés par centrifugation, dialysés puis finalement lyophilisés (Figure II.7).

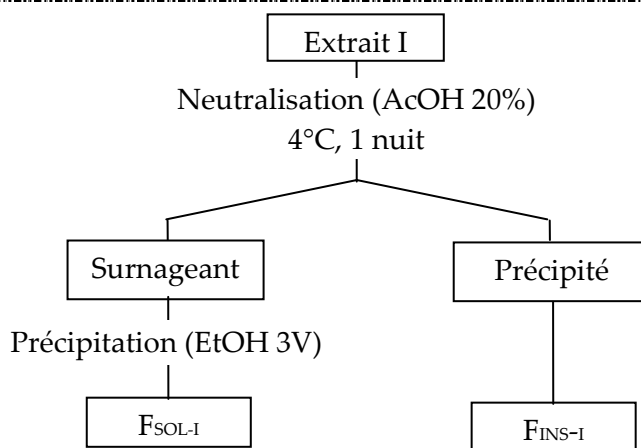


Figure II. 7: Exemple de traitement des extraits au cours des différentes extractions (extrait I)

IV.3. Bilan d'extraction et analyse des produits

Pour chaque extrait deux fractions ont été obtenues : une fraction soluble notée (F_{SOL}) et une fraction insoluble désignée (F_{INS}). Les rendements d'extractions ainsi que la composition des différentes fractions sont regroupés dans le tableau II.4. Sur le même tableau nous regroupons les résultats du dosage de sucres des différents résidus d'extraction.

A la vue de ces résultats, on constate que l'essentiel des extractions est réalisé au cours des trois premières extractions, c'est-à-dire pour des concentrations en soude de 0.5, 1 et 1.5 M. Au-delà de 1.5 M en soude, les rendements des autres étapes sont faibles en particulier pour les fractions solubles F_{SOL-V} et F_{SOL-VI} . Ceci peut s'expliquer par un appauvrissement du matériau en polysaccharides alcalino-extractibles ou encore par une inaccessibilité de ces derniers. La quantité maximale du produit extrait est obtenue à une concentration de 1.5 M avec un rendement de 9.1%. Il faut noter que les rendements des fractions insolubles sont plus élevés que les rendements des fractions solubles et ce pour les différentes extractions.

D'un point de vue composition, l'ensemble des extraits solubles et insolubles obtenus lors des différentes étapes d'extraction présente globalement la même composition en oses neutres. Les fractions ainsi isolées renferment essentiellement du xylose (80 à 98 % en poids) et seule la fraction F_{SOL-I} contient également, en faible proportion, de l'arabinose et du glucose.

Au cours de la séquence d'extraction réalisée, les résidus subissent une variation de leurs teneurs en sucres. Ils présentent, au fur et mesure de l'avancement du traitement, un appauvrissement progressif en xylose (de 53 à 1.5%), et un net accroissement de la teneur en

glucose (de 33 à 97%) traduisant ainsi l'élimination des polysaccharides riches en xylose et l'enrichissement des résidus de l'extraction en cellulose.

Tableau II. 4 : Rendement et composition en oses neutres des différentes fractions isolées et des résidus du péricarpe des graines du fruit de la figue de barbarie

| Fraction | Rendement | Sucres neutres (% massique) | | | |
|----------------------|-----------|-----------------------------|-------------|-----|-------------|
| | | Ara | Xyl | Gal | Glc |
| Péricarpe | | 1.1 | 46.2 | - | 33.7 |
| F _{INS-I} | 4.1 | - | 85 | - | traces |
| F _{SOL-I} | 1.0 | traces | 80 | - | 2.1 |
| Résidu I | - | - | 44.7 | - | 41.6 |
| F _{INS-II} | 5.2 | - | 89.0 | - | traces |
| F _{SOL-II} | 1.7 | - | 81.3 | - | - |
| Résidu II | - | - | 36.5 | - | 62.5 |
| F _{INS-III} | 9.1 | - | 96.2 | - | - |
| F _{SOL-III} | 2.3 | - | 89.8 | - | - |
| Résidu III | - | - | 12.0 | - | 87.6 |
| F _{INS-IV} | 1.3 | - | 98.5 | - | - |
| F _{SOL-IV} | 0.45 | - | 91.5 | - | - |
| Résidu IV | - | - | 9.7 | - | 90.1 |
| F _{INS-V} | 0.95 | - | 98.5 | - | - |
| F _{SOL-V} | 0 | - | - | nd | - |
| Résidu V | - | - | 4.6 | - | 93.5 |
| F _{INS-VI} | 0.8 | - | 97.5 | - | - |
| F _{SOL-VI} | 0 | - | - | nd | - |
| Résidu VI | - | - | 1.5 | - | 97.2 |

Conclusion

De l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que le péricarpe de la graine de la figue de barbarie est composé uniquement de xylanes et de cellulose. Ces deux polysaccharides font l'objet ci-dessous d'une étude plus approfondie.

IV.4. Purification et caractérisation des différentes xylanes

Nous nous proposons de caractériser les différentes fractions obtenues, mais étant donné le nombre important de fractions isolées nous avons décidé de n'étudier que les fractions majoritaires à savoir les six premières fractions.

IV.4.1. Purification des différentes xylanes

Dans un premier temps il est nécessaire de purifier les différentes fractions. Les fractions solubles dans l'eau, F_{SOL-I}, F_{SOL-II} et F_{SOL-III}, ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Bio-gel P6 selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. Par contre en raison de leur insolubilité dans l'eau, les fractions F_{INS-I}, F_{INS-II} et F_{INS-III}, ont été purifiées par des méthodes chimiques basées sur des solubilisation et précipitation à l'aide des ions cuivriques selon le protocole du paragraphe V de la partie expérimentale.

IV.4.2. Dosage de sucres

La composition en sucres neutres et acides des différentes fractions après purification est reportée dans le tableau II.5. La teneur en sucres acides a été mesurée par dosage colorimétrique et par conductimétrie. Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont cohérents. Néanmoins, la méthode colorimétrique est souvent mise en cause en raison des interférences dues à la présence de sucres neutres dans les hydrolysats.

Tableau II. 5 : Composition en sucres neutres et acides des différentes fractions xylanes purifiées

| Fraction | Sucres acides (% massique) | | Sucres neutres (% massique) | | |
|----------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------|------|--------|
| | Par colorimétrie | Par conductimétrie | Ara | Xyl | Glc |
| F _{INS-I} | 11.5 | 9.7 | - | 88.3 | traces |
| F _{SOL-I} | 13.2 | 12.5 | 2.2 | 80.7 | 3.9 |
| F _{INS-II} | 5.9 | 4.3 | - | 93.0 | - |
| F _{SOL-II} | 10.1 | 10.5 | - | 87.5 | traces |
| F _{INS-III} | 2.5 | 2 | - | 98.2 | - |
| F _{SOL-III} | 10.2 | 10.5 | - | 89.8 | - |

Les deux acides largement rencontrés dans les hémicelluloses en particulier les xylanes, et qui peuvent éventuellement être présents, sont soit l'acide glucuronique ou son dérivé l'acide 4-O-méthyl-glucuronique. Cependant, les deux techniques utilisées ne permettent pas de différencier entre les deux dérivés.

Les rapports massiques Xyl/AU varient en moyenne entre 98/2 et 88/9 pour les fractions insolubles et de 90/10 et 80/13 pour les fractions solubles. En faisant hypothèse qu'il s'agit de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique, les rapports molaires Xyl/AU correspondants varient donc de 56 à 18 unités xylose pour une seule unité acide dans les fractions insolubles et de 8 à 12 unités xylose pour une unité acide dans les fractions solubles d'après la conductimétrie.

On peut constater la grande variabilité du taux d'acide uronique entre les différentes fractions. En effet, les fractions solubles sont riches en acide tandis que les fractions insolubles contiennent de faibles quantités d'acide, ce qui est en accord avec les constatations reportées dans la littérature. En effet, il est connu qu'au-delà d'une proportion molaire d'environ 15 unités xylose pour une unité acide, les glucuronoxylanes sont insolubles dans l'eau. Néanmoins, jusqu'à présent on n'avait jamais rencontré une telle variabilité dans le taux d'acide uronique dans les xylanes isolées à partir de végétaux.

IV.4.3. Analyse par méthylation

Les différentes fractions de xylanes purifiées ont été analysées par méthylation comme décrit dans la partie expérimentale. Les acétates d'alditols perméthylés obtenus ont été analysés par CPG et CPG/SM en se référant à des produits témoins disponibles. L'acétate alditol omniprésent dans les différentes fractions est le 1,4-di-O-acétyl-2,3-di-O-méthyl-D-xylitol. La présence en faible quantité du dérivé 1,2,4-tri-O-acétyl-3-O-méthyl-D-xylitol provenant du résidu xylose substitué par l'acide en position O-2, s'explique par la résistance de la liaison osidique entre un ose acide et un ose neutre dans les conditions d'hydrolyse. Ce problème peut être résolu en effectuant une réduction des groupements carboxyles des résidus acides préalablement à la méthylation. Cette démarche ne nous a pas semblé nécessaire dans la mesure où nous avons également caractérisé ces fractions par RMN ^1H et ^{13}C .

IV.4.4. Analyse par RMN en solution

L'élucidation structurale des oligo et polysaccharides par RMN haute résolution, c'est-à-dire en solution, a connu un essor considérable ces dernières années et plusieurs auteurs se sont intéressés à la détermination de la structure primaire d'oligo- ou polysaccharides en particulier les xylanes par RMN [101-111]. Nous avons au regard de ces travaux choisi de caractériser nos fractions à l'aide de la RMN 1D et 2D.

Les spectres de RMN des différentes xylanes solubles ont été enregistrés dans l'eau lourde (D_2O), tandis que ceux des xylanes insolubles ont été réalisés dans le diméthylsulfoxyde deutérié ($DMSO-d_6$). Les figures II.8 et II.10 représentent respectivement, à titre d'exemple, les spectres 1H et ^{13}C obtenus pour les fractions $F_{SOL-III}$ et F_{INS-II} . Tous les spectres des différentes fractions sont quasi-équivalents et les conditions d'extraction n'ont donc pas d'incidence notable sur la structure des xylanes. Ces spectres présentent des différences uniquement au niveau des intensités relatives des différents signaux qui varient en fonction de leurs teneurs en acides uroniques. L'attribution des pics est effectuée grâce aux travaux antérieurs et aussi affinée par des spectres à deux dimensions. L'utilisation des deux séquences de corrélation directe (J-1) homonucléaire (COSY) et hétéronucléaire (HSQC) permet de lever toute ambiguïté et d'attribuer de façon certaine tous les signaux. Les cartes COSY et HSQC réalisées pour la fraction F_{SOL-II} sont reportées, à titre d'exemple, sur les figures II.9 et II.11 respectivement. Les déplacements chimiques et les attributions des protons et carbones-13 des différents résidus sont reportés dans les tableaux II.7 et II.8.

L'ensemble des données RMN 1H et ^{13}C indique que toutes les xylanes que nous avons extraits du péricarpe de la graine de la figue de barbarie correspondent à des xylanes de type β -(1→4).

Sur le spectre RMN- 1H (l'exemple de la fraction $F_{SOL-III}$ est donné dans la figure II.8) on retrouve les six protons des unités xylose liées β -(1→4) de la chaîne principale et non substitués. D'autres signaux moins intenses sont aussi présents et sont attribués aux unités acides glucuronique et aux unités xylose qui les portent en position O-2. Les doublets attribués aux protons anomériques des unités xylose situés aux alentours de 4.3 ppm et 4.4 ppm ont une constante de couplage d'environ 8 Hz caractéristique d'une liaison osidique de type β . Par contre le doublet attribué au proton anomérique H-1 de l'acide 4-O-méthyl

glucuronique présente une constante de couplage d'environ 3 Hz caractéristique d'une liaison osidique de type α .

La présence sur tous les spectres enregistrés pour les différentes fractions d'un singulet fin aux alentours de 3.2 ppm, attribué au groupement méthyle, montre qu'il s'agit en fait de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique.

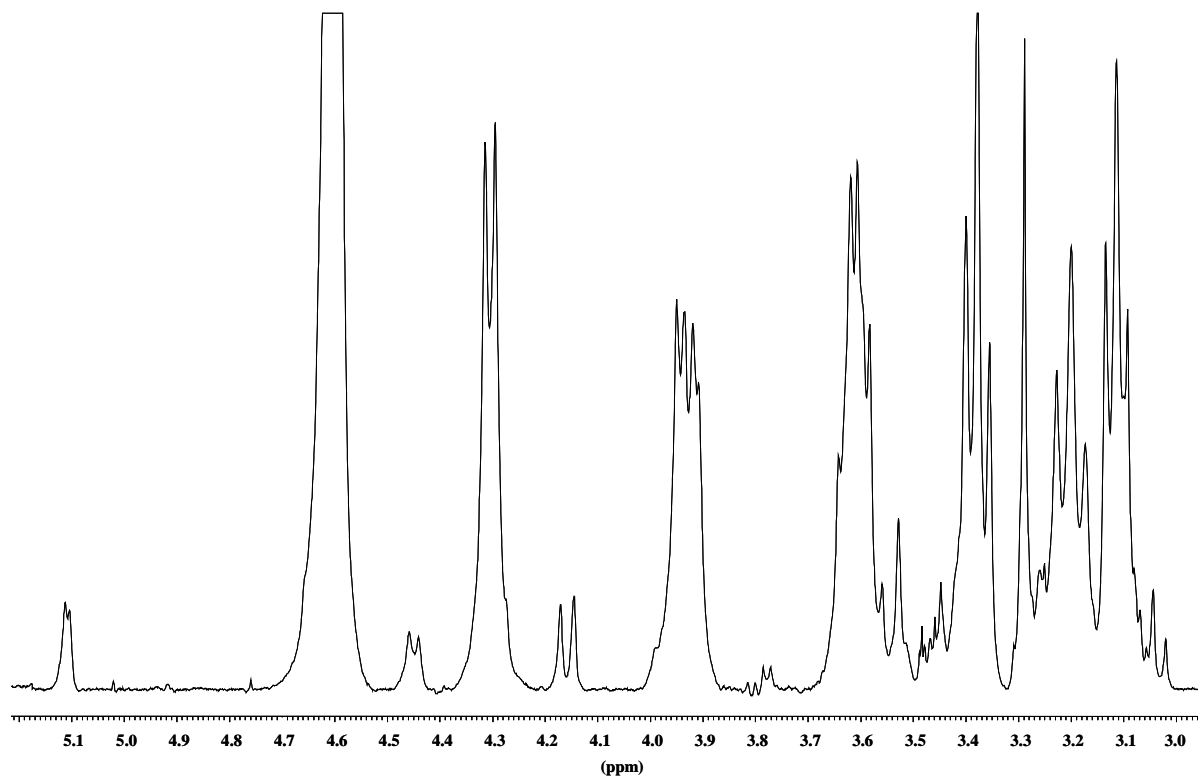


Figure II. 8 : Spectre RMN du proton de la fraction F_{SOL-II} (D_2O à 323 K, 400MHz)

L'observation des spectres ^{13}C découplé des protons montre une grande simplicité et plusieurs signaux parfaitement bien individualisés y sont présents. Nous avons reportés sur la figure II.10 le spectre de la fraction $F_{INS-III}$. Sur ce spectre on constate la présence de cinq signaux intenses attribués aux résidus xylose non substitués et plusieurs signaux, dont l'intensité dépend du taux de ramification en acide uronique, sont attribués aux autres résidus xyloses substitués ainsi qu'aux résidus acide 4-O-méthyl-glucuronique.

Dans la région des carbones anomériques, sont facilement identifiables les signaux attribués aux carbones C-1 des différents résidus à savoir les résidus xylose non substitués, résidus xylose substitués en position O-2 et aux unités acide. La présence d'un résidu 4-O-méthyl-glucuronique est confirmée par la présence d'un signal aux environs de 176,5 ppm attribué au groupement carboxyle et par la présence vers 56 ppm d'un signal attribué au groupement méthyle.

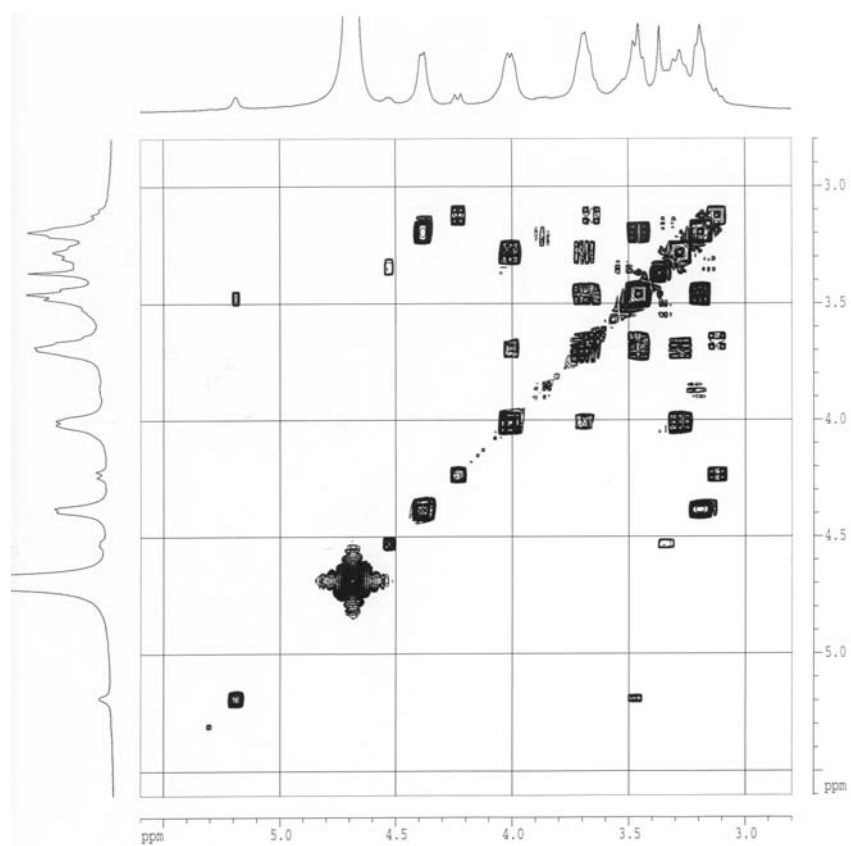


Figure II. 9 : Carte de corrélation homonucléaire 2D-COSY de la fraction F_{SOL-II} (D₂O, 323K, 400 MHz)

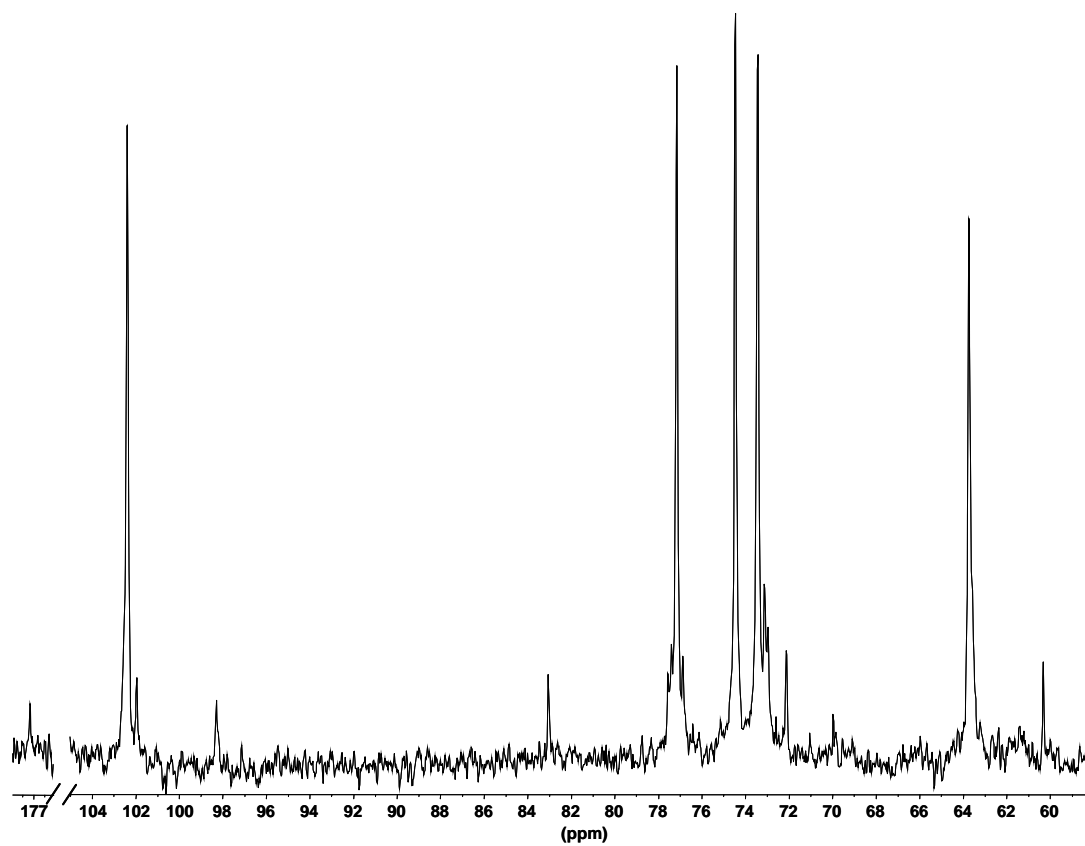


Figure II. 10 : Spectre RMN ¹³C de la fraction F_{INS-II} (DMSO-d₆, 333K, 300MHz)

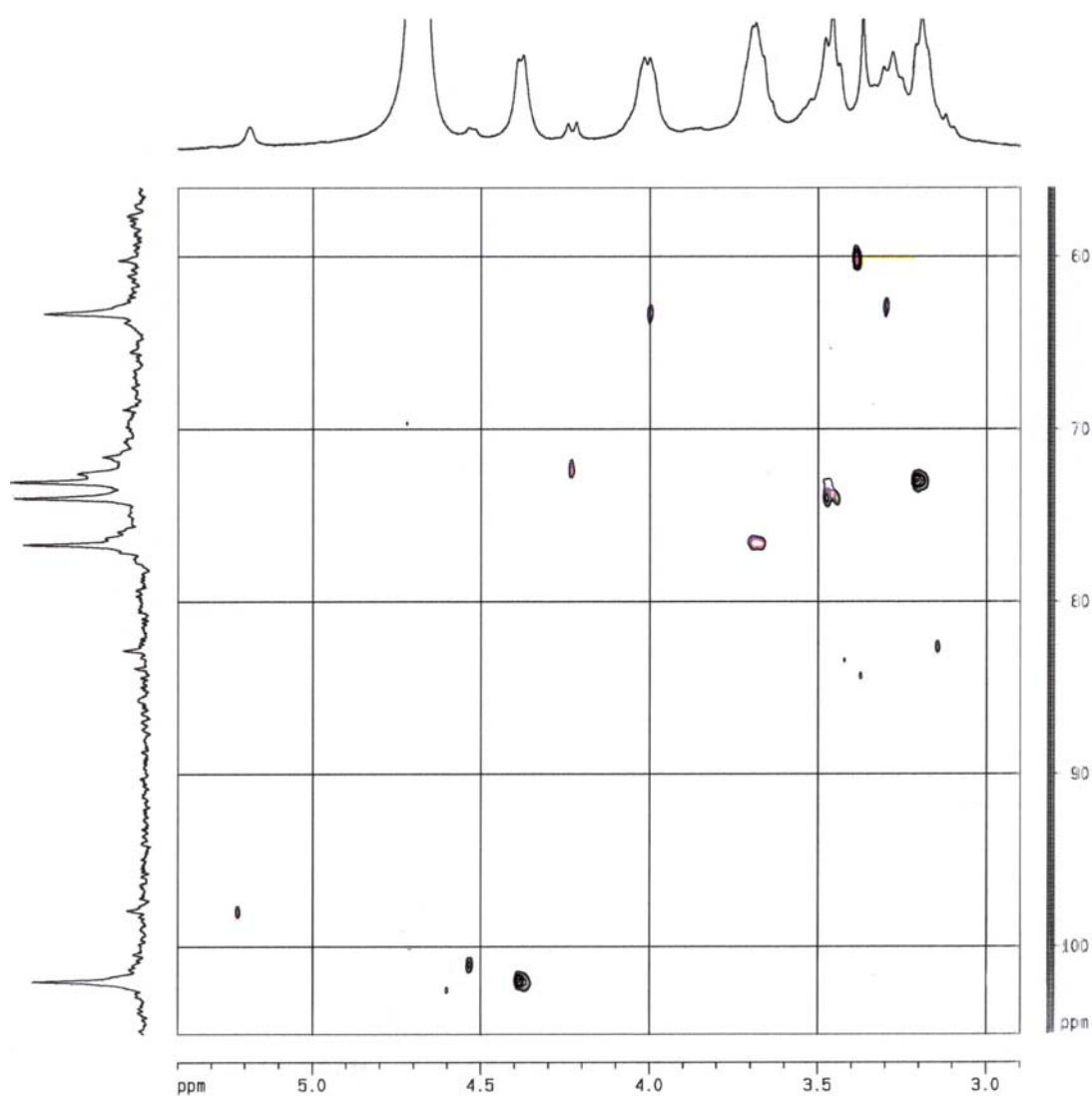


Figure II. 11 : Carte de corrélation hétéronucléaire 2D-HSQC de la fraction F_{SOL-II} (D₂O, 323K, 400 MHz)

Au regard de cette analyse structurale, nous pouvons conclure que les hémicelluloses secrétés dans la paroi du péricarpe de la graine de la figue de barbarie appartiennent à la famille des xylanes. Il s'agit plus précisément de 4-O-méthyl-glucurono- β -(1 \rightarrow 4)-xylanes.

D'un point de vue analytique, nous avons utilisé la RMN afin de déterminer les pourcentages en acide 4-O-méthyl-glucuronique dans les différentes fractions extraites. Il est en effet possible de mesurer les surfaces des signaux attribués aux protons anomériques des différents résidus et donc d'en déduire la composition molaire. De la même façon, on peut réaliser le même dosage à partir des spectres ¹³C enregistrés en quantitatif mais les résultats obtenus montrent une marge d'erreur plus importante. Les rapports molaires Xyl/4-O-Me-GlcA obtenus à partir des spectres proton sont regroupés dans le tableau II.6.

Ces résultats RMN confirment la grande variabilité du taux d'unités 4-O-méthyl-glucuronique entre les différentes fractions, qui a été observé précédemment.

Tableau II. 6 : Rapports molaires xylose/acide 4-O-méthyl-glucuronique des différentes fractions déterminés par RMN du ^1H

| Fraction | Xyl / 4-O-Me-GlcA |
|----------------------|-------------------|
| F _{INS-I} | 18.4 |
| F _{SOL-I} | 11.2 |
| F _{INS-II} | 26.0 |
| F _{SOL-II} | 12.0 |
| F _{INS-III} | 65.0 |
| F _{SOL-III} | 14.2 |

Tableau II. 7 : Les déplacements chimiques des résidus glycosidiques des différentes fractions solubles (D₂O)

| Les résidus glycosidiques | Déplacements chimiques | | | | | |
|----------------------------|------------------------|--------|-------|-------|-------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| F_{SOL-I} | | | | | | |
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.31 | 3.14 | 3.40 | 3.60 | H _{eq} : 3.97 / H _{ax} : 3.23 |
| | ¹³ C | 102.41 | 73.44 | 74.47 | 77.17 | 63.74 |
| →2.4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.47 | 3.38 | 3.50 | 3.60 | H _{eq} : 3.92 / H _{ax} : 3.22 |
| | ¹³ C | 101.97 | 77.41 | 72.12 | 75.95 | 62.57 |
| 4-O-Me-α-D-GlcpA(→ | ¹ H | 5.09 | 3.46 | 3.58 | 3.12 | 4.16 / OCH ₃ : 3.32 |
| | ¹³ C | 98.29 | 72.95 | 77.56 | 83.05 | 73.15 |
| | | | | | | OCH ₃ : 60.3 / C-6: 176.84 |
| F_{SOL-II} | | | | | | |
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.30 | 3.11 | 3.37 | 3.60 | H _{eq} : 3.91 / H _{ax} : 3.19 |
| | ¹³ C | 102.00 | 73.05 | 74.01 | 76.71 | 63.30 |
| →2.4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.45 | 3.35 | 3.40 | 3.62 | H _{eq} : 3.93 / H _{ax} : 3.22 |
| | ¹³ C | 101.61 | 77.15 | 72.56 | 75.95 | 62.88 |
| 4-O-Me-α-D-GlcpA(→ | ¹ H | 5.10 | 3.46 | 3.58 | 3.13 | 4.15 / OCH ₃ : 3.28 |
| | ¹³ C | 97.83 | 71.73 | 78.25 | 82.81 | nd |
| | | | | | | OCH ₃ : 60.2 / C-6: 177.07 |
| F_{SOL-III} | | | | | | |
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.31 | 3.14 | 3.40 | 3.60 | H _{eq} : 3.92 / H _{ax} : 3.17 |
| | ¹³ C | 102.39 | 73.47 | 74.52 | 77.2 | 63.76 |
| →2.4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.46 | 3.42 | 3.52 | 3.62 | H _{eq} : 3.94 / H _{ax} : nd |
| | ¹³ C | 102.61 | 76.44 | 71.78 | 74.74 | 62.90 |
| 4-O-Me-α-D-GlcpA(→ | ¹ H | 5.08 | 3.42 | 3.57 | 3.11 | 4.25 / OCH ₃ : 3.30 |
| | ¹³ C | 97.29 | 72.22 | 78.00 | 82.12 | 73.05 |
| | | | | | | OCH ₃ : 66.0 / C-6: 177.29 |

Tableau II. 8 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques des différentes fractions insolubles (DMSO-*d*₆)

| Les résidus glycosidiques | | Déplacements chimiques (ppm) | | | | |
|----------------------------|-----------------|------------------------------|-------|-------|-------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| F_{INS-I} | | | | | | |
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.16 | 2.93 | 3.14 | 3.40 | H _{eq} : 3.76 / H _{ax} : 3.12 |
| | ¹³ C | 101.79 | 72.63 | 73.93 | 75.79 | 63.24 |
| →2.4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.37 | 3.19 | 3.26 | 3.41 | H _{eq} : 3.87/ H _{ax} : 3.18 |
| | ¹³ C | 100.81 | 76.52 | 71.9 | 73.31 | 62.60 |
| 4-O-Me-α-D-GlcpA(→ | ¹ H | 4.74 | 3.37 | 3.51 | 3.14 | nd / OCH ₃ : 3.16 |
| | ¹³ C | 97.55 | 71.70 | 78.0 | 81.57 | nd |
| | | | | | | OCH ₃ : 59.1 / C-6: nd |
| F_{INS-II} | | | | | | |
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.24 | 3.02 | 3.26 | 3.48 | H _{eq} : 3.86 / H _{ax} : 3.14 |
| | ¹³ C | 101.87 | 72.73 | 74.10 | 75.54 | 63.36 |
| →2.4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.46 | 3.19 | 3.31 | 3.49 | H _{eq} : 3.87/ H _{ax} : 3.18 |
| | ¹³ C | 100.96 | 77.82 | 71.70 | 74.90 | 62.02 |
| 4-O-Me-α-D-GlcpA(→ | ¹ H | 5.00 | 3.37 | 3.51 | 3.14 | nd / OCH ₃ : 3.16 |
| | ¹³ C | 97.65 | 71.13 | 78.19 | 81.99 | nd |
| | | | | | | OCH ₃ : 59.0 / C-6: nd |
| F_{INS-III} | | | | | | |
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.15 | 2.92 | 3.15 | 3.38 | H _{eq} : 3.75 / H _{ax} : 3.08 |
| | ¹³ C | 101.91 | 72.70 | 74.07 | 75.67 | 63.41 |
| →2.4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.46 | 3.19 | 3.31 | 3.49 | H _{eq} : 3.87 / H _{ax} : 3.18 |
| | ¹³ C | 102.11 | nd | nd | 74.74 | 63.05 |
| 4-O-Me-α-D-GlcpA(→ | ¹ H | 4.97 | 3.37 | 3.51 | 3.14 | nd / OCH ₃ : 3.16 |
| | ¹³ C | 97.65 | nd | nd | 82.58 | nd |
| | | | | | | OCH ₃ :59.1 / C-6: nd |

IV.4.5. Détermination des masses molaires

La masse moléculaire et par voie de conséquence le degré de polymérisation d'un polysaccharide est une caractéristique physico-chimique importante. Dans le cas des xylanes plusieurs méthodes ont été reportées pour déterminer ces masses molaires. Le choix de la méthode est crucial compte tenu des variations considérables des valeurs obtenues selon les techniques envisagées. Habituellement, les valeurs obtenues par ultracentrifugation sont inférieures à celles déterminées par perméation sur gel. Néanmoins les valeurs les plus élevées sont celles obtenues par diffusion de la lumière. L'insolubilité des xylanes dans les solvants usuels est vraisemblablement à l'origine de cette divergence de résultats. Ceci peut s'expliquer par la formation aussi bien d'agrégats que de particules de microgels dans les solutions. En effet, les chaînes de xylanes se replient entre elles par établissement de liaisons hydrogène et adoptent des conformations en hélices. Ces « agrégats » rendent donc impossible l'estimation des masses moléculaire des chaînes osidiques à l'aide d'une technique telle que la viscosimétrie ou la diffusion de la lumière dans des solvants qui ne rompent pas ces liaisons. La détermination des masses moléculaire des xylanes faiblement substituées par l'utilisation des solvants utilisés habituellement pour dissoudre la cellulose comme par exemple le cuoxam (réactif de Schweizer), le cadoxen (hydroxyde de triéthylène diamine cadmium), NNMO (N-méthylmorpholine N-oxyde), la cupriéthylène diamine (CED) et le tartrate du sodium ferrique (FeTNa), ne permet pas de résoudre le problème. Une étude a été réalisée par diffusion de la lumière pour caractériser en solution dans certains de ces solvants une xylane extraite du son de seigle. Les résultats ont montré la tendance des chaînes dissoutes à former des agrégats en fonction du temps [112].

Pour certaines familles de xylanes, l'existence de ramifications (arabinose ou acide uronique) sur la chaîne principale complique encore la mesure. Pour les arabinoxylanes par exemple, la teneur et la répartition des unités arabinose sur la chaîne principale influencent les comportements des chaînes de polysaccharide en solution ce qui entraîne des augmentations des viscosités intrinsèques et par conséquent une sur-estimation des DP mesurés par viscosimétrie [113]. Pour les xylanes acides, la présence des groupements acides entraîne l'apparition de charges apparentes et les polysaccharides se comportent ainsi comme des polyélectrolytes ou des polymères rigides ce qui rend plus difficile la détermination des DP par les techniques classiques tels que la perméation sur gel [114].

Par ailleurs, les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant la chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC) sur des colonnes calibrées à l'aide de polysaccharides tels que les dextrans ou les pullulanes ou encore en associant la HPSEC avec la diffusion de la lumière et la viscosimétrie [115-117]. Mais le choix de l'éluant demeure un obstacle en raison de l'utilisation de solvants organiques ou alcalins qui sont relativement corrosifs. Finalement, pour pallier aux problèmes de solubilité, certains dérivés de xylanes, par exemple sulfates [118] ou carbanilates [119] qui sont alors plus solubles, ont été utilisés pour déterminer les masses molaires.

Pour déterminer les masses molaires des différentes xylanes extraites du péricarpe, nous avons utilisés deux techniques. Dans le cas des fractions solubles dans l'eau, les masses M_w ont été déterminées par HPSEC sur des colonnes préalablement étalonnées et couplées à différents détecteurs selon le mode opératoire décrit dans la partie expérimentale. Un tampon nitrate est utilisé comme éluant afin d'écranter les charges. Les profils ont mis en évidence une certaine hétérogénéité des extraits solubles par suite de la présence de plusieurs populations de xylanes dans chaque extrait. Afin de faciliter la comparaison et l'interprétation des résultats, la masse molaire a été calculée en se limitant à la population de polysaccharide majoritaire dans chaque échantillon. La représentativité de cette population dans chaque fraction, est calculée par le rapport de son aire sur l'aire totale du profil. Elle varie de 70 à 82% dans les trois fractions.

Par contre pour les fractions insolubles, les masses molaires M_w ont été évaluées par la diffusion de la lumière en régime dilué et en mode statique. Le DMSO a été utilisé comme solvant. En effet le DMSO est un bon solvant des xylanes en faible concentration et nous semble être le plus approprié pour déterminer les masses molaires par diffusion de la lumière. Un bref détail technique sur le principe et les équations de calcul de cette méthode est présenté dans la partie expérimentale.

Connaissant la constante de diffusion K pour les xylanes dans le DMSO, on peut en déduire les masses molaires à partir du digramme de Zimm réalisé pour chaque fraction. A titre d'exemple, le diagramme de Zimm correspondant à l'analyse de la fraction F_{INS-II} est représenté sur la figure II.12.

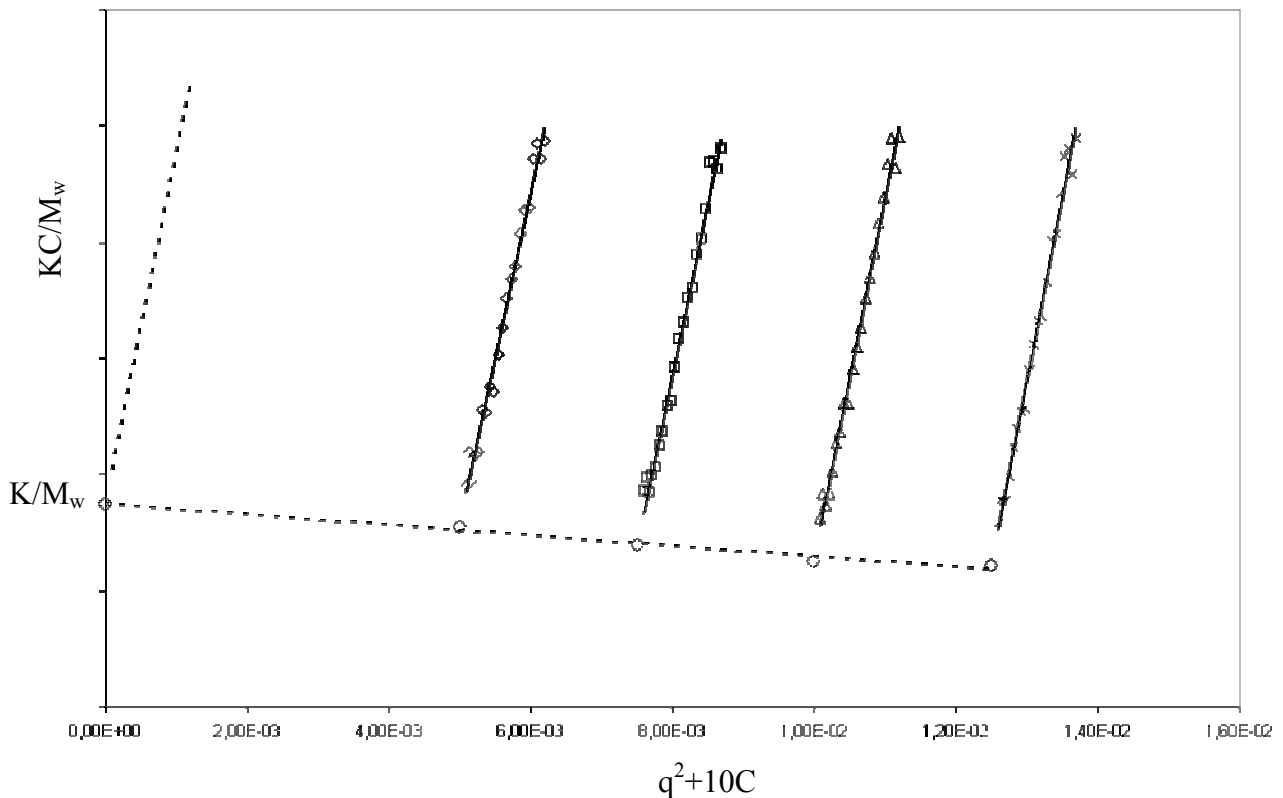


Figure II. 12 : Diagramme de Zimm correspondant à la fraction F_{INS-II} [$KC/M_w = f(q^2+10C)$]

Légende : (-◇-) (-□-) (-△-) (-×-) points expérimentaux pour les différentes concentrations testées.
 (-○-) points correspondant à l'extrapolation pour $q^2=0$ dans l'expression de Virriel. L'extrapolation de la droite ainsi obtenue pour les différentes concentrations utilisées à $C=0$ permet de déduire M_w .

Les masses molaires moyennes en nombre ainsi obtenu pour les deux catégories de xylanes (solubles et insolubles) par les deux techniques employées sont reportées dans le tableau II.9.

Les degrés de polymérisation moyens DP_m ont été estimés à partir des masses obtenues en faisant l'hypothèse que l'unité répétitive était l'anhydroxylose de masse molaire de 132. Les degrés de polymérisation obtenus varient de 50 à 70 pour les fractions solubles et de 95 à 160 pour les fractions insolubles. Ces valeurs obtenues sont dans la gamme de valeurs mentionnées dans la littérature pour d'autres xylanes isolées à partir de végétaux ou d'algues.

Tableau II. 9 : Masses molaires M_w et Degrés de Polymérisation moyens DP des différentes xylanes isolées

| Fraction | Par HPSEC | | Par diffusion de la lumière | |
|----------------------|---------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
| | M_w (g/mol) | DP _m | M_w (g/mol) | DP _m |
| F _{SOL-I} | 6500 | 50 | - | - |
| F _{INS-I} | - | - | 12500 | 95 |
| F _{SOL-II} | 8200 | 62 | - | - |
| F _{INS-II} | - | - | 17800 | 135 |
| F _{SOL-III} | 9300 | 70 | - | - |
| F _{INS-III} | - | - | 21000 | 160 |

IV.4.6. Etude par RMN du solide

Dans le cas de substrats polysaccharidiques plus au moins cristallins, la RMN du solide permet d'apporter des informations structurales complémentaires de celles obtenues par les méthodes classiques, à savoir la diffraction électronique et des rayons-X. C'est le cas des polysaccharides cristallins ou semi cristallins tels que cellulose, chitine, β -(1→3)-glucane et β -(1→3)-xylanes. C'est ainsi que le degré de cristallinité, la nature des allomorphes I_α et I_β et leurs proportions ont pu être obtenus dans le cas de la cellulose native (cellulose I).

Dans le cas des xylanes, des travaux réalisés par Saito *et coll.* en RMN du solide sur des β -(1→3)-xylanes, ont mis en évidence l'organisation des chaînes de polymère les unes par rapport aux autres en fonction du traitement chimique ou thermique et du taux d'hydratation [120]. Ces travaux ont en effet montrés que les chaînes s'organisent pour former des triples hélices. Des études similaires réalisées sur d'autres polysaccharides par exemple des β -(1→3)-glucanes, ont permis de confirmer les données cristallographiques déjà obtenues par la diffraction des rayons-X [121-123].

Bien que les xylanes β -(1→4) ne présentent pas d'organisation *in situ* dans les parois cellulaires où elles servent de matrice amorphe entre les microfibrilles de cellulose [124], ces polysaccharides peuvent s'organiser dans certaines conditions. En effet, plusieurs études menées par diffraction électronique et diffraction des rayons-X ont montré que les chaînes de xylanes en présence de molécules d'eau s'organisent de façon anti-parallèle en triple hélice et

adoptent une conformation gauche. Le système cristallin adopté est un système hexagonal avec les paramètres de la maille cristalline suivants : $a=b=9,16 \text{ \AA}$; $c=14,85 \text{ \AA}$ et $\gamma=120^\circ$.

Contrairement à la cellulose où l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène intra et intermoléculaires, lui confère un caractère cristallin, les xylanes sont incapables de former de tel réseau. La présence d'eau est nécessaire pour les xylanes afin de combler le déficit de liaisons hydrogène et adopter ainsi une structure ordonnée. Les molécules d'eau sont incorporées entre les chaînes de xylanes où elles participent à un réseau de liaisons hydrogène avec les chaînes de polysaccharide tout au long du squelette (Figure II.13). Ce réseau de liaisons hydrogène est affecté par la présence de ramifications, surtout acides uroniques, sur les résidus xylose de la chaîne principale. En effet les diagrammes de rayons-X deviennent moins nets, et les distances entre les plans du réseau augmentent avec une teneur croissante en acide uronique. Les diagrammes de rayons-X se transforment en un anneau élargi pour les xylanes riches en acide [125].

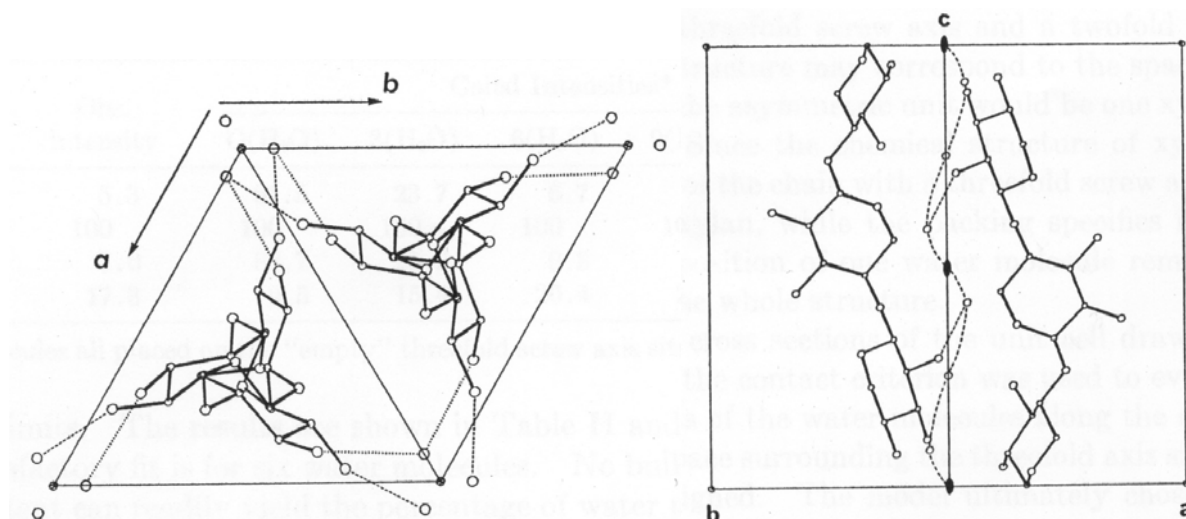


Figure II. 13 : Projection sur les plans 001 et 110 d'une maille élémentaire formée par des xylanes hydratées (les pointillés représentent les liaisons hydrogène) (d'après [126])

Toutefois, la RMN du solide n'a été que très peu utilisée à ce jour pour caractériser les xylanes β -(1 \rightarrow 4). Il existe en effet une seule étude RMN en phase solide sur les β -(1 \rightarrow 4)-xylanes réalisée par Teleman *et coll.*[127]. Les résultats obtenus ont montré l'organisation des chaînes de xylanes en fonction de l'hydratation et du traitement subi. Ils ont montrés que cette organisation peut être affectée par un changement de l'environnement du polysaccharide en ajoutant d'autres substances que l'eau, par exemple le méthanol ou

l'isopropanol. Cette réorganisation s'accompagne d'un déplacement des pics de résonance attribués aux carbones C-1 et C-4 des résidus xylose. Par la suite, ces observations ont conduit les auteurs à suggérer des hypothèses sur l'organisation des xylanes et la cellulose dans la paroi.

C'est ainsi que nous avons décidé d'analyser par spectroscopie RMN du ^{13}C à l'état solide les xylanes insolubles dans l'eau à savoir F_{INS-I}, F_{INS-II} et F_{INS-III} séchées (lyophilisées) ou hydratées dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau. Une étude par diffraction des rayons-X des différentes xylanes a été réalisée en parallèle à l'étude par RMN du solide, afin de vérifier si nos échantillons avaient tendance à s'organiser.

La figure II.14 présente les clichés de diffraction des rayons-X enregistrés pour la fraction F_{INS-II} à l'état sec et hydratée. On peut signaler que nous n'avons pas constaté de différence dans les clichés de diffraction des rayons-X enregistrés sur nos différents échantillons de xylanes, que ce soit à l'état sec ou hydraté, compte tenu des faibles différences en teneur en acide uronique. Les diagrammes enregistrés à l'état sec montrent un seul anneau élargi traduisant une non organisation des chaînes. Cependant à l'état hydraté on peut observer une organisation des chaînes de polymère, et plusieurs anneaux plus au moins fins et intenses se distinguent facilement sur les clichés à différentes distances du centre. Ces distances correspondent aux distances entre les plans réticulaires d'indices de Miller pour une maille cristalline. Les différents diagrammes révèlent, entre autres, la présence de quatre anneaux de diffraction à 7.90, 4.56, 3.96 et 2.63 Å correspondant aux plans 010, 110, 020 et 030 respectivement d'une maille hexagonale. Ces distances correspondent à l'état dit « super hydraté » c'est-à-dire que tous les sites sont saturés. Ces données sont très proches de celles reportées dans la littérature.

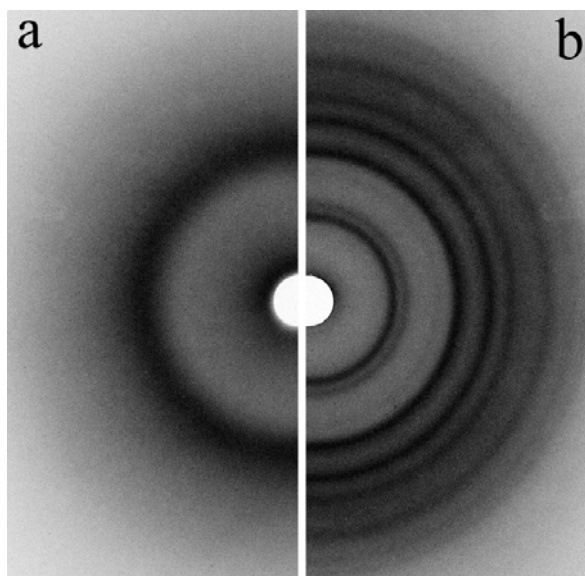


Figure II. 14 : Clichés de diffraction des rayons-X de la xylane (FINS-II) : (a) non hydratée ; (b) hydratée

Dans un second temps et afin de vérifier cette organisation en présence d'eau, nous avons enregistré des spectres RMN du solide des différentes xylanes hydratées ou non. La figure II.15 présente les spectres correspondants à la fraction FINS-II sèche et hydratée. Nous pouvons constater une différence importante de résolution entre ces deux spectres. En effet, le spectre enregistré sur le polymère à l'état sec présente des signaux très larges. Cet élargissement est dû à la modification du voisinage de chaque carbone d'un résidu à l'autre sur les chaînes disposées aléatoirement les unes par rapport aux autres. Ces bandes larges, au nombre de trois, sont centrées à 101.86, 74.38 et 63.52 ppm et peuvent être attribuées aux carbones C-1, (C-2, C-3, C-4) et C-5 respectivement. Etant donnée la faible résolution des signaux, il n'est pas possible d'observer les signaux des acides ainsi que les signaux des unités xylose qui les portent.

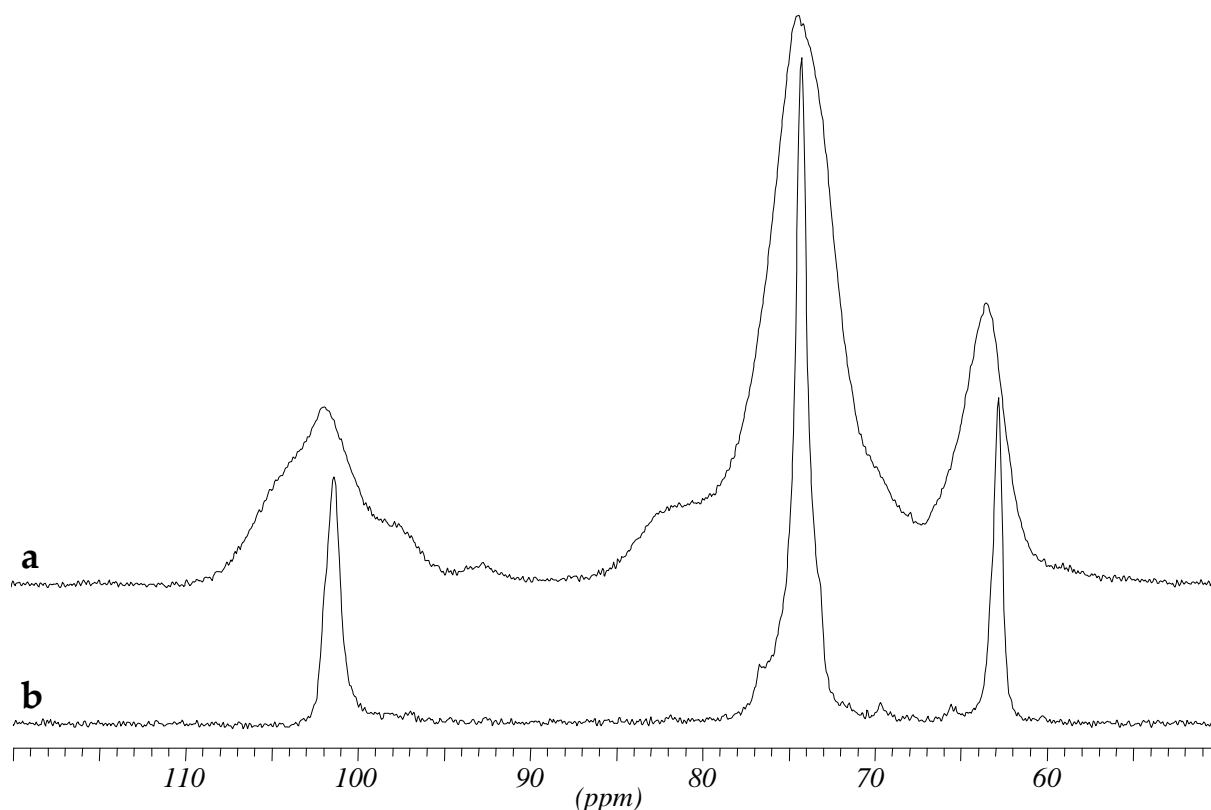


Figure II. 15 : Spectre CP/MAS de la Fraction $F_{\text{INS-II}}$: (a) : anhydre et (b) : hydratée

Une nette résolution des spectres est obtenue après hydratation des échantillons. On a alors une organisation des chaînes qui rend ainsi les voisinages des carbones plus au moins équivalents, ce qui entraîne une meilleure résolution des signaux. Les spectres réalisés pour les différentes fractions de xylanes ne présentent pas de différence significative. Ils sont constitués de trois signaux majoritaires centrés à 101.38, 74.26 et 62.83 ppm qui correspondent aux C-1, (C-2, C-3, C-4,) et C-5 des résidus xylose de la chaîne principale. Un léger déplacement vers les champs forts des carbones C-1 et C-5 ainsi que vers les champs faibles des autres carbones a été observé suite à cette hydratation. Quatre signaux beaucoup moins intenses apparaissent à 97.5, 77.2, 69.68 et 65.56 ppm que nous ne sommes pas arrivés à attribuer avec certitude par manque de données. Seul le signal à 97.5 ppm peut être attribué au carbone anomérique de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique par comparaison avec la valeur obtenue par RMN en solution.

Il est possible par ailleurs par un simple traitement mathématique (voir partie expérimentale) de mieux séparer les signaux et d'améliorer la résolution des spectres (Figure II.15). Ainsi, d'autres petits signaux sont dégagés des massifs dont trois peuvent être attribués facilement aux résidus xylose substitués. Il s'agit des signaux centrés aux alentours

de 101.80 (C-1), 73.14 (C-2, C-3, C-4) et 63.25 ppm (C-5). Nous remarquons ainsi, qu'à l'inverse des résultats de la RMN en solution, les signaux des carbones C-1 et C-5 des unités substituées subissent un déplacement vers les champs faibles par rapport aux carbones correspondant dans les résidus xylose non substitués.

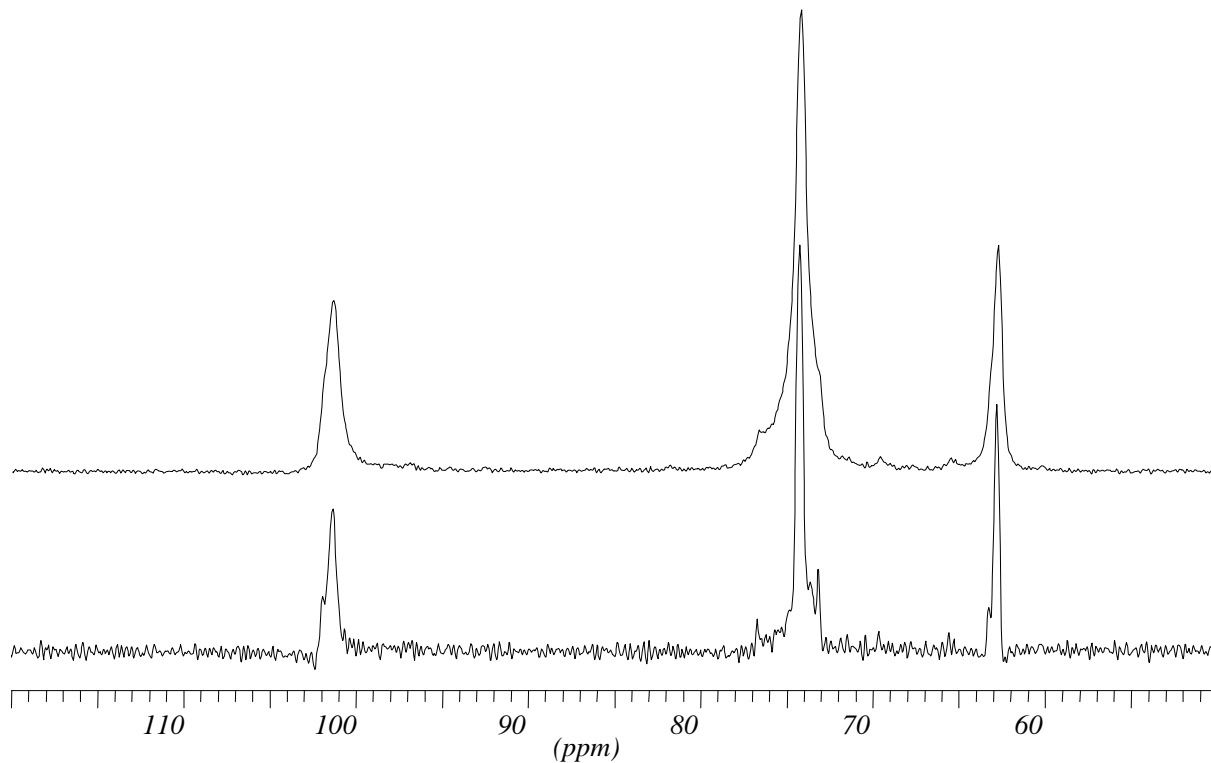


Figure II. 16 : Spectre CP/MAS de la xylane F_{INS-1} avant et après traitement mathématique

IV.4.7. Conclusion

L'extraction des polysaccharides pariétaux non cellulosique du péricarpe de la graine de la figue de barbarie a montré qu'ils sont constitués uniquement de xylanes. Ces polysaccharides sont, après la cellulose et l'amidon, les plus abondants dans la majorité des angiospermes. Ils sont principalement considérés comme constituants de la paroi secondaire où ils servent de matrice amorphe entre les fibrilles de cellulose. Ces xylanes sont caractérisées par un enchaînement linéaire d'unités xylopyranose liées β -(1→4) et peuvent être, plus au moins substituées, en position O-2 par de l'acide glucuronique ou plus généralement par son dérivé 4-O-méthylé, mais rarement les deux. En effet, ces deux acides uroniques n'ont été trouvés que dans les xylanes isolées des tiges de tournesol [128], des tiges de colza [129] et des pépins de coing [110, 130]. L'analyse structurale réalisée surtout par RMN en solution a permis de confirmer uniquement la présence de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique dans les xylanes du péricarpe de la graine de la figue de barbarie. En général,

c'est cet acide 4-O-méthyl-glucuronique qui est rencontré en quantités variables, dans la plupart des xylanes isolées du monde végétal. Nous avons reportés dans le tableau II.10 les rapports molaires en acide 4-O-méthyl-glucuronique retrouvés dans plusieurs xylanes issues de différentes sources. Nous pouvons constater que le taux d'acide 4-O-méthylglucuronique varie en fonction de l'origine et des tissus. Il est, en moyenne, de 7 unités xylose pour un acide. Néanmoins, une teneur inhabituelle en acide a été retrouvée dans les pépins de coing [130]. Dans notre cas, nous avons isolés deux types de fractions dont les taux en acide varient considérablement. En effet, dans les fractions solubles on constate que le taux d'acide est en moyenne de 12 unités xylose pour un acide, tandis que dans les fractions insolubles il varie de 26 à 65 xylose pour un acide. Cette grande différence en taux d'acide n'avait jamais été décelée, à notre connaissance, dans le règne végétal. Elle reste donc une caractéristique particulière des xylanes du péricarpe de la graine de la figue de barbarie.

La mesure des degrés de polymérisation des xylanes extraites du péricarpe a également montré des différences entre les différentes fractions. Les xylanes solubles sont caractérisées par un DP qui varient entre 55 et 70 alors que les fractions insolubles ont des DP élevés qui varient entre 95 à 160. Ces degrés de polymérisation rentrent dans la gamme de valeurs citées dans la littérature qui varient entre 50 à 260. Des valeurs exceptionnelles ont été trouvées pour des xylanes extraites d'algue et qui atteignent les 850.

L'analyse par RMN du solide nous a permis de vérifier l'organisation des chaînes de xylanes au cours de l'hydratation, phénomène également vérifié d'après les clichés de diffraction des rayons-X.

Tableau II. 10 : Rapport molaire (Xyl/4-O-Me-GlcA) de quelques 4-O-méthyl-glucuronoxylanes de différentes sources végétales

| Source | Xyl/4-O-Me-GlcA | Références |
|---|-------------------|-----------------|
| Graines de coing (<i>Cydonia oblonga</i>) | 2:1 | [110, 130] |
| Coques de tournesol | 3.4:1/7.2:1/9.1:1 | [107] |
| Fibre de feuille de <i>trifasciata</i> de <i>Sansevieria</i> | 5:1 | [131] |
| Fibre de feuille d'ananas (<i>Ananas comosus</i> L. Merr.) | 5:1/10:1 | [132]/[133] |
| Sapins de Norvège | 5:1 | [134] |
| Fibre de filasse de jute | 5:1 | [110, 135, 136] |
| Pin de Loblolly | 6:1 | [137] |
| <i>Rudbeckia fulgida</i> (<i>var. sullivantii</i> (Boynton et Beadle)) | 6:1 | [102] |
| Bois de pomme (<i>Malus pumila</i> L. <i>var. Golden T.</i>) | 6:1 | [138] |
| Bois de hêtre (<i>Fagus sylvatica</i> L.) | 6:1 | [139] |
| Graine de colza | 6:1 | [140] |
| Tiges de colza | 7:1 | [129] |
| Bois de cerise (<i>Prunus avium</i> L. <i>var. Bing</i>) | 7:1 | [141] |
| Orme blanc (<i>Ulmus americana</i>) | 7:1 | [142] |
| Pulpe de betterave sucrière | 7:1 | [111] |
| Fibres de Luffa | 7,5:1 | [110] |
| Hêtre de l'Amérique (<i>Fagus grandifolia</i>) | 8:1 | [143] |
| Bardane (<i>Arctium lappa</i> L.) | 8:1 | [144] |
| Bois d'Aspen (<i>Populus tremula</i>) | 9:1 | [101, 145] |
| Tige de tabac (<i>Nicotiana tabacum var. BY</i>) | 9:1 | [146] |
| Hêtre européen (<i>Fagus sylvatica</i>) | 10:1 | [147] |
| Bois jaune de bouleau (<i>Betula lutea</i>) | 10:1 | [148] |
| Écorce blanche de bouleau (<i>Betula papyrifera</i> Marsh) | 10:1 | [149] |
| Coques de Jojoba (<i>Simmondsia chinensis</i>) | 10 :1 | [150] |
| Bois du bouleau blanc (<i>Betula papyrifera</i> , Marsh) | 11:1 | [151, 152] |
| Bois du bouleau blanc (<i>Betula verrucosa</i>) | 11.5:1 | [153] |
| Écorce d'Aspen (<i>Populus tremuloïdes</i>) | 12:1 | [154] |
| Abricot sibérien (<i>Armeniaca siberica</i> L.) | 14:1 | [155] |
| Bouleau finlandais | 22:1 | [156] |

IV.5. Purification et caractérisation des fibres cellulósiques

Le péricarpe de la graine de la figue de barbarie est constitué d'après l'étude morphologique, de cellules allongées en forme de fuseau. Ces cellules sont communément appelées cellules ou fibres de sclérenchyme. Elles sont caractéristiques des parois secondaires où elles se trouvent enrobées dans une matrice constituée de polysaccharides de nature essentiellement hémicellulosique et de lignine. Dans le cas du péricarpe, les polysaccharides non-cellulosiques sécrétés dans la paroi sont, d'après l'étude précédente, des xylanes.

Après avoir extrait et caractérisé ces xylanes, nous nous sommes intéressés aux fibres cellulósiques constitutives du péricarpe de la graine.

IV.5.1. Purification

La paroi végétale est composée d'un assemblage de cellules dont la cohésion est assurée par des ciments polysaccharidiques qui constituent la lamelle mitoyenne. Dans les parois primaires ces polysaccharides « liants » sont de nature pectique, tandis que les parois secondaires sont dépourvues de ces ciments pectiques. La cohésion est assurée par des polysaccharides de nature hémicellulosique qui enrobent les microfibrilles de cellulose. La purification des parois cellulaires consiste en la solubilisation de ces polysaccharides, qui conduit à une désincrustation et une individualisation des cellules.

Nous avons vu que la concentration en soude lors des extractions des xylanes joue un rôle important dans l'efficacité de la purification chimique. Plus cette concentration est élevée, plus les xylanes sont solubles ce qui permet de purifier le résidu cellulósique. Par contre, la soude entraîne un gonflement des microfibrilles de cellulose et à une certaine concentration peut entraîner une réaction de mercerisation au cours de laquelle s'opère une transformation de la structure cristalline.

Afin d'élaborer un mode opératoire pour la purification, sans altération possible, des fibres du péricarpe de la graine, il faut déterminer le seuil adéquat en concentration de soude afin d'éliminer les xylanes sans merceriser la cellulose. Pour cela nous avons soumis le péricarpe de la graine à la même séquence d'extraction alcaline que celle utilisée pour extraire les xylanes cependant entre deux extractions nous avons effectué un blanchiment au chlorite de sodium. Nous avons suivi l'impact et l'efficacité de ces traitements sur le matériau initial par microscopie, diffraction des rayons-X et par dosage de sucre neutres.

IV.5.1.1. Dosage des sucres

Les résultats du dosage des sucres neutres sont reportés sur le tableau II.11 et on peut constater que les résidus des extractions s'enrichissent au fur à mesure de l'avancement des extractions en glucose c'est-à-dire en cellulose. On peut observer que le résidu de l'extraction à 12 % est constitué essentiellement de cellulose.

Tableau II. 11 : Composition en sucre neutres des résidus d'extractions

| Résidu | Sucres neutres (% massique) | | |
|------------------|-----------------------------|------|------|
| | Ara | Xyl | Glc |
| Péricarpe | 1,1 | 46,2 | 33,7 |
| Résidu 2 % NaOH | - | 40,5 | 59,5 |
| Résidu 4 % NaOH | - | 36,2 | 63,8 |
| Résidu 6 % NaOH | - | 11,7 | 88,3 |
| Résidu 8 % NaOH | - | 9,9 | 90,1 |
| Résidu 10 % NaOH | - | 4,5 | 96,5 |
| Résidu 12 % NaOH | - | 1,5 | 98,5 |

IV.5.1.2. Microscopie

Les photographies du péricarpe original et après extraction (traité 4% NaOH et traité 6% NaOH) sont reportés sur la figure II.17. On constate d'après ces figures que les fibres au sein du péricarpe sont associées entre elles et qu'au cours des différentes extractions les fibres sont progressivement décapés par élimination des ciments polysaccharidiques alcalino-solubles. On assiste à une dissociation des cellules pour obtenir finalement les fibres individualisées (Figure II.17-c). On peut constater qu'à partir d'une concentration de 6% en soude les fibres sont complètement dissociées ce qui pourrait laisser croire qu'elles sont entièrement débarrassées de leurs substances incrustantes. Or ce résidu d'après le dosage des sucres neutres renferme encore 12 % de xylose c'est-à-dire que les parois cellulaires contiennent encore des xylanes. Sur la figure II.17-c on peut constater que ces fibres sont elles mêmes composées d'un assemblage de microfibrilles.

Après analyse de ces résultats on peut supposer que l'on a deux sortes de xylanes, celles qui entourent les fibres et celles qui se trouvent entre les différentes strates (hélices) de microfibrilles de cellulose.

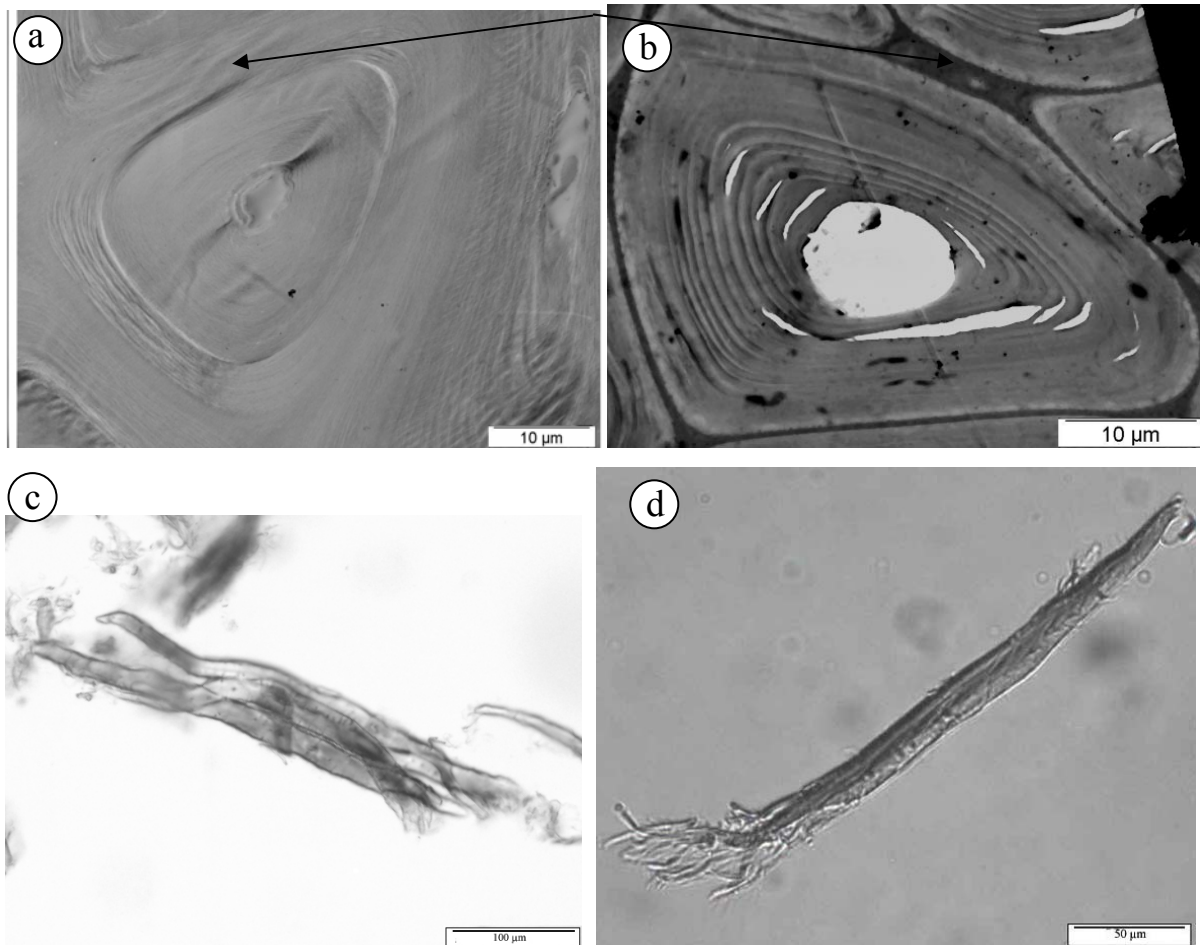


Figure II. 17 : Péricarpe de la graine de la figue (a) non traité (MET), (b) traité (4% NaOH) (MET), (c) traité (4% NaOH) (M. Optique) ; (d) traité (6% NaOH) (M.optique)

IV.5.1.3. Diffraction des rayons-X

D'après les études précédentes on peut affirmer que la concentration en soude joue un rôle important quant à la purification des fibres cellulosiques. Plus cette concentration est importante plus la paroi est déstructurée par solubilisation des polysaccharides alcalino-extractibles, et il en résulte des fibres de plus en plus purifiées (riche en glucose). Néanmoins, la soude peut entraîner une transformation de la structure cristalline de la cellulose native. Il a déjà été démontré dans la littérature que l'effet d'un traitement à la soude peut avoir des conséquences différentes selon les morphologies et les types des parois traitées (primaire ou secondaire). Pour les parois secondaires par exemple, Warwiker a observé l'action de solutions de soude de concentrations croissantes sur deux matériaux cellulosiques à structure proche, mais de morphologies différentes [157]. Pour la cellulose de coton, la mercérisation a eu lieu à partir d'une concentration en soude de 16%, alors que dans le cas de la cellulose de ramie elle commence à se produire pour une concentration en soude

de 12%. Dinand *et coll.* ont étudié ce même phénomène de changement de l'état cristallin de la cellulose pour les microfibrilles de cellulose des parois primaires issues de la pulpe de betterave [158]. Ils ont constaté que le basculement en cellulose II a lieu à une concentration en soude moins élevée (entre 8 et 9%) que celles précédemment mentionnées.

En ce qui nous concerne, nous avons suivi l'influence de la concentration de la soude sur la cristallinité des fibres du péricarpe de la graine afin de déterminer le seuil de mercerisation. Nous avons suivi cette transformation de cellulose I en cellulose II par diffraction de rayons X. La figure II.18 représente les clichés de diffraction des rayons-X enregistrés pour les résidus après chaque étape d'extraction.

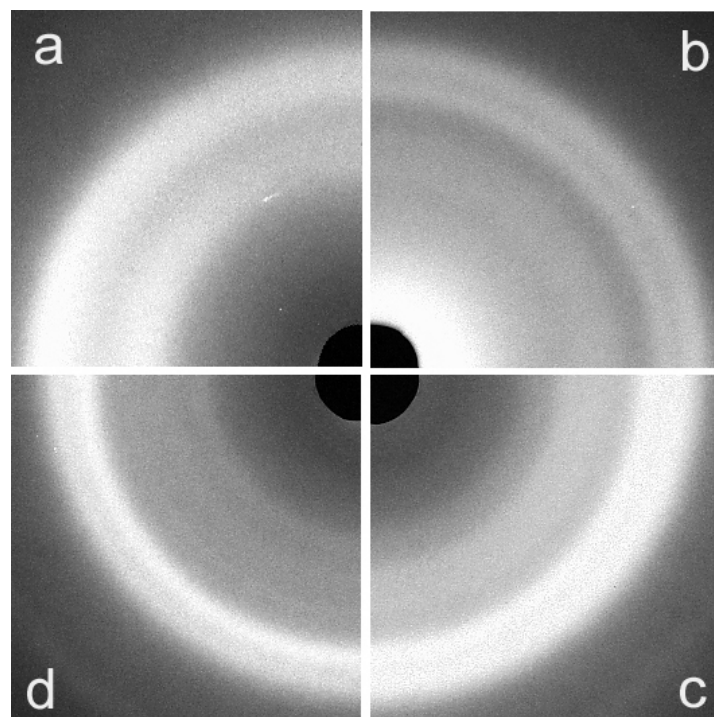


Figure II. 18 : Clichés de diffraction des rayons-X des résidus après traitement par NaOH :

(a) : 2%, (b) : 6%, (c) : 8%, (d) : 12%

Nous constatons que la concentration de la soude a un impact sur l'état cristallin des échantillons, ce qui se traduit par un changement des diagrammes de diffraction des rayons-X. Ainsi on constate que la structure initiale n'est pas modifiée jusqu'à une concentration en soude de l'ordre de 6%. Pour des concentrations plus élevées, on constate une transformation en cellulose II à partir d'une concentration en soude de 8% et une transformation complète à 12 %. Cette transformation se traduit sur les clichés par le changement de l'intensité de l'anneau vers 4,4 Å qui est de plus en plus intense et la disparition progressive des deux anneaux centraux à 5.4 et 6.0 Å.

IV.5.1.4. Conclusion

De l'ensemble de ces résultats, deux conclusions importantes concernant la purification des fibres de cellulose du péricarpe sont à retenir. La première concerne l'accessibilité des polysaccharides hémicellulosiques, qu'on peut classer en deux groupes à savoir des xylanes accessibles ou plus facilement solubilisés, qui se situent vraisemblablement dans la lamelle mitoyenne. Des xylanes qui sont moins accessibles et qui s'intercalent dans les strates et enrobent les microfibrilles de cellulose au sein de la paroi cellulaire. L'augmentation de la concentration en soude permet de solubiliser ces xylanes qui enrobent les microfibrilles de cellulose, cependant il faut contrôler la concentration en soude et ne pas dépasser une concentration de l'ordre de 6% si l'on veut éviter la mercerisation de ces fibres.

IV.5.2. Individualisation et purification

Les parois cellulaires des fibres du péricarpe sont constituées de plusieurs couches de microfibrilles disposées en hélices. Ces microfibrilles sont associées entre elles et les autres constituants de la paroi (xylanes et lignine) par des liaisons hydrogènes et de type Van der Walls. Une meilleure purification entraîne une meilleure accessibilité des surfaces des microfibrilles. Pour cela on peut utiliser n'importe quel traitement qui permet de déstructurer cette organisation de la paroi cellulaire et défibriller les microfibrilles constitutives.

Turbak *et coll.* [159-161] ainsi que Herrick *et coll.*[162], ont utilisé un homogénéisateur haute pression de type Manton-Gaulin. Ils ont obtenu à partir de pulpes de bois des microfibrilles de cellulose. Ce traitement correspond à un éclatement des fibres qui résulte en une microfibrillation avec une grande surface accessible et par conséquent une grande réactivité. Dinand *et coll.* ont utilisé ce même traitement pour transformer une suspension de cellules de paroi primaire purifiées en une suspension de microfibrilles de cellulose [163]. Au cours du traitement on a une déstructuration mécanique des parois et une individualisation progressive des microfibrilles. Les suspensions issues de ce traitement ont une meilleure dispersion dans l'eau et par conséquent une plus grande stabilité dans le temps.

Ce type de traitement répond parfaitement à l'objectif que nous nous étions fixé, c'est-à-dire déstructurer l'organisation des microfibrilles de la paroi cellulaire pour augmenter leur surface et leur accessibilité. Un détail technique sur les homogénéisateurs de type

Manton-Gaulin est présenté dans la partie expérimentale. Ce traitement mécanique doit être effectué sur le matériau purifié. Ainsi, pour rendre les xylanes qui se trouvent entre les différentes strates de microfibrilles de cellulose de la paroi cellulaire plus accessibles, nous avons combiné des traitements chimiques et des traitements mécaniques à l'aide d'un homogénéisateur Manton-Gaulin. En effet, nous avons intercalé un traitement mécanique au Gaulin entre les deux cycles du traitement alcalin à une concentration de 6% (Figure II.19).

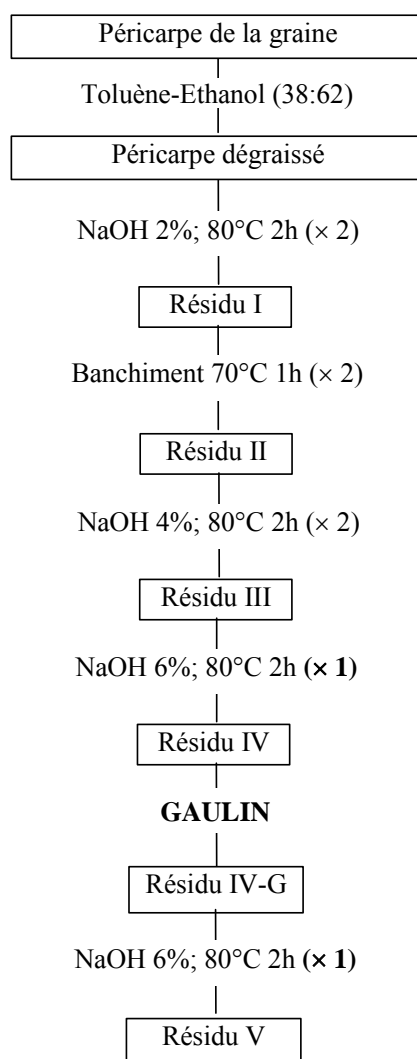


Figure II. 19: Schéma de purification des fibres du péricarpe en utilisant un homogénéisateur mécanique (Manton-Gaulin)

Pour s'assurer de l'efficacité de ce traitement, nous avons suivi l'évolution de la morphologie des fibres par microscopie, leur composition en sucres neutres ainsi que leur cristallinité par diffraction des rayons-X.

Le tableau II.12 regroupe les résultats de l'analyse des sucres neutres et les figures II.20 et II.21 représentent respectivement une photographie du résidu à l'issue du traitement

Gaulin (résidu IV-G) et un cliché de diffraction de rayons-X enregistré pour le résidu final (résidu V).

Tableau II. 12 : Composition en sucres neutres des principaux résidus obtenus au cours du schéma de purification utilisant l'homogénéisateur Manton-Gaulin

| Résidu | Sucres neutres (% poids) | |
|-------------|--------------------------|------|
| | Xyl | Glc |
| Résidu III | 36,2 | 63,8 |
| Résidu IV | 19,5 | 80,5 |
| Résidu IV-G | 18,8 | 82,2 |
| Résidu V | 1,2 | 98,1 |

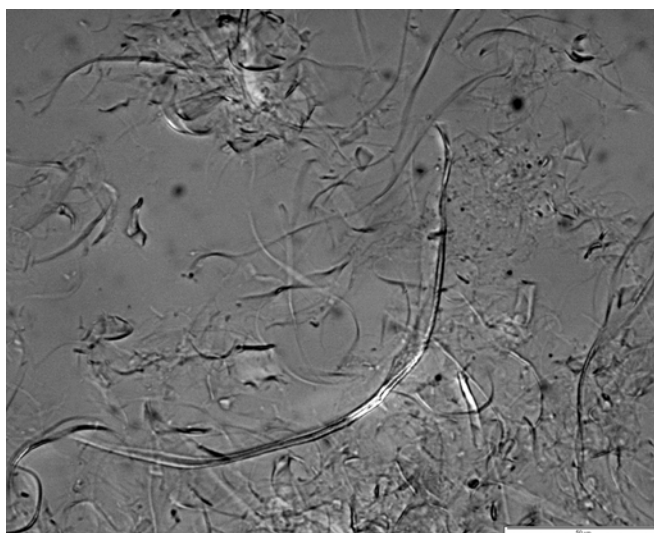


Figure II. 20 : Microfibres (résidu IV-G) obtenues après homogénéisation dans un homogénéisateur Manton-Gaulin (M. optique)

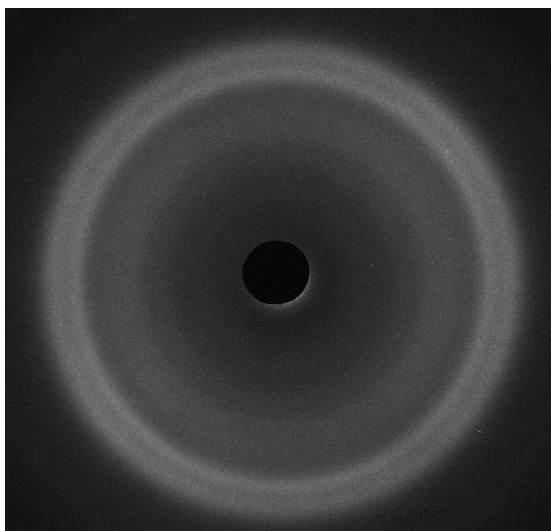


Figure II. 21 : Cliché de diffraction des rayons-X du résidu V du péricarpe

On constate d'après ces résultats que l'introduction de l'étape du traitement mécanique à l'aide de l'homogénéisateur Manton-Gaulin permet de mieux purifier les fibres du péricarpe, étant donné la composition du résidu final (Glc, 98.1 %). Ceci est réalisé sans aucune conséquence sur la cristallinité de la cellulose, comme le montre la figure II.21. Le cliché de diffraction des rayons-X représenté est celui de la cellulose sous sa forme cristalline native c'est-à-dire l'allomorphe I. Cette purification est due à la meilleure accessibilité des microfibrilles qui résulte de la destruction de la paroi cellulaire par homogénéisation (Figure II.20). En effet en comparant cette photographie à celle présentée sur la figure II.17-c on constate que les microfibrilles qui constituaient les parois cellulaires sont individualisées après le traitement mécanique. Ceci permet de mieux solubiliser les xylanes qui se trouvent entre les différentes strates de microfibrilles de cellulose.

IV.5.3. Caractérisation des fibres purifiées

IV.5.3.1. Le degré de polymérisation

Les problèmes d'insolubilité évoqués précédemment pour les xylanes, sont beaucoup plus complexes dans le cas de la cellulose en raison de son caractère cristallin. Par ailleurs, pour déterminer la masse moléculaire de la cellulose et donc son degré de polymérisation, le choix des méthodes devient très restreint. Habituellement pour la cellulose, c'est la viscosimétrie qui est employée. La plupart des solvants de la cellulose, cités précédemment, sont soit toxiques, soit ils ne solubilisent la cellulose que dans des conditions extrêmes ce qui limite leur manipulation. La cupriéthylènediamine (CED) est le solvant généralement utilisé pour déterminer la masse moléculaire de la cellulose par viscosimétrie.

Pour déterminer le degré de polymérisation des fibres de cellulose du péricarpe, nous avons donc utilisé la viscosimétrie et la CED comme solvant. Un détail technique sur la méthode et les équations de calcul utilisées est donné dans la partie expérimentale.

Les masses molaires trouvées pour les échantillons de cellulose du péricarpe de la graine de la figue de barbarie varient entre 226000 et 251000 (g/mol). Si l'on considère que l'unité répétitive est l'anhydroglucose de masse molaire 162, le degré de polymérisation de la cellulose issue du péricarpe de la graine de la figue de barbarie varie donc entre 1400 et 1550.

IV.5.3.1. Cristallinité

La diffraction des rayons-X permet dans le cas de la cellulose d'apporter des renseignements aussi bien qualitatifs que quantitatifs. En effet, on peut par le biais des données de la diffraction des rayons-X déterminer les indices des plans de Miller et remonter ainsi à la nature de la maille cristalline de Bragg et par conséquent à la nature de l'allomorphe. D'un point de vue quantitatif, Segal *et coll.* ont relié l'indice ou le pourcentage de cristallinité des objets cellulosiques aux intensités de certains anneaux selon l'expression suivante [164]:

$$IC = \frac{I_{002} - I_{001}}{I_{002}} \times 100$$

I_{002} est l'intensité de l'anneaux de diffraction du plan de Miller (002) mesuré à $\theta = 11,3^\circ$

I_{am} est la référence qui correspond à l'intensité du bruit de fond mesurée à $\theta = 9^\circ$

Ainsi, si l'on calcule le degré de cristallinité de la cellulose issue du péricarpe selon la relation de Segal, on obtient une valeur de IC=51%.

IV.5.3.2. Etude par RMN du solide

La spectroscopie RMN ^{13}C en phase solide a permis, comme il a été cité précédemment, de compléter les résultats obtenus par d'autres méthodes surtout cristallographiques et ce pour divers polysaccharides. Dans le cas de la cellulose, les premiers spectres enregistrés à l'état solide, avec polarisation croisée et rotation à l'angle magique (RMN ^{13}C CP/MAS), ont été obtenus par Atalla *et coll.* [165] ainsi que par Earl et VanderHart [166]. Ils ont observé des multiplicités inattendues des signaux attribuées aux carbones C-1, C-4 et C-6. Cette constatation d'ordre majeur a conduit Atalla et VanderHart à proposer pour la cellulose native, l'existence dans la fraction cristalline de deux phases distinctes qu'ils dénomment I_α

et I_β [167]. Cette donnée « récente » a été par la suite étudiée plus en détail par Sugiyama *et coll.*[168]. Ils ont mis en évidence par diffraction électronique que la forme dénommée I_α cristallise dans un système triclinique avec une chaîne de cellulose par maille alors que la forme I_β adopte un système monoclinique avec deux chaînes de cellulose par maille (Figure II.22). Par la suite, ils ont montrés que les proportions, entre ces deux formes cristallines dans la cellulose native, diffèrent selon son origine.

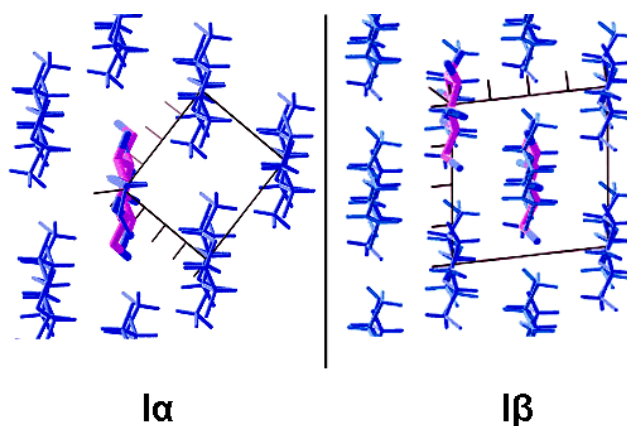


Figure II. 22 : Représentation des chaînes constituant les mailles cristallines des phases I_α et

I_β

a. Caractérisation préliminaire

Le spectre de RMN du solide enregistré pour les fibres de cellulose purifiées issues du péricarpe de la graine de la figue de barbarie est reporté sur la figure II.23. On constate la présence sur ce spectre de cinq signaux de multiplicités différentes que l'on peut attribuer comme suit :

- Un triplet centré à 104.81 ppm qui correspond aux carbones C-1 des deux allomorphes α et β de la cellulose : le C-1 correspondant à la phase α est à 104.93 ppm et le doublet de la phase β est à 105.65-103.90 ppm.
- Un triplet centré à 88.7 ppm attribué aux carbones C-4 des deux allomorphes α et β . Ce signal est accompagné d'un épaulement centré vers 84.2 ppm attribué aux C-4 des chaînes de surface de la cellulose.
- Deux massifs centrés aux environs de 74.8 ppm et 72.11 ppm qui correspondent respectivement aux carbones C-2, C-3 et C-5.
- Un signal à 64.8 ppm attribué aux carbones C-6 des zones cristallines. Ce signal est accompagné également d'un épaulement centré à 62.22 ppm caractéristique des chaînes de surface ou des zones amorphes.

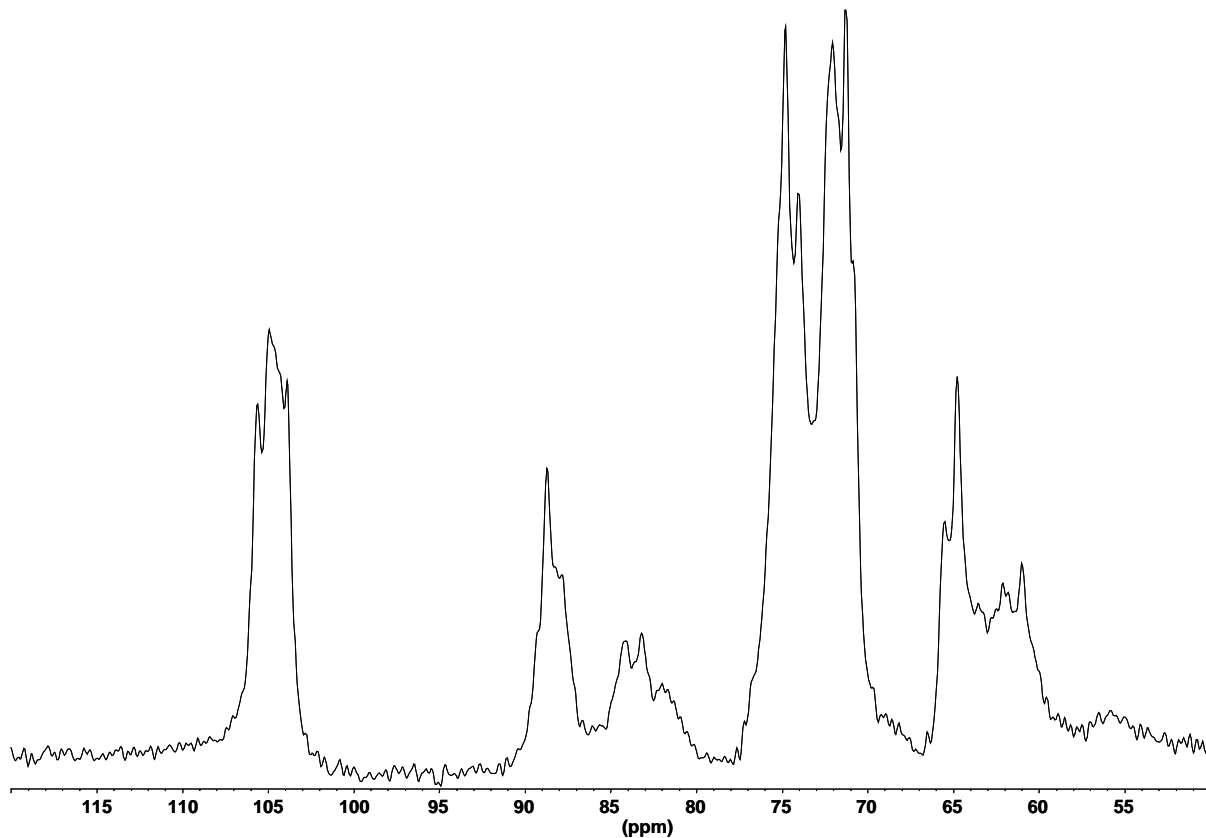


Figure II. 23: Spectre CP/MAS de la cellulose du péricarpe

b. Proportion α/β et taux de cristallinité

La RMN du solide permet, en plus de l'analyse structurale, de donner davantage d'informations sur la cellulose. Elle permet de mesurer les proportions des deux allomorphes α et β qui constituent la cellulose native ainsi que de déterminer le taux de cristallinité [169, 170]. Ceci peut s'effectuer en décomposant, par le biais d'un traitement mathématique (que l'on appelle déconvolution), le spectre ou simplement certaines raies en la contribution de chacun des allomorphes respectifs. Néanmoins, pour pouvoir effectuer cette déconvolution, il faut disposer des spectres de chacun des deux allomorphes I_α et I_β .

La paroi cellulaire de l'algue *Glaucozystis*, découverte récemment, est constituée de cellulose majoritairement composée de l'allomorphe I_α [171]. Par contre pour la phase I_β , la cellulose issue de la tunicine (définition *cf* partie expérimentale) est prise comme référence. Cette cellulose est composée majoritairement de l'allomorphe I_β (90% au moins) [172]. Nous avons représenté sur la figure II.24 les spectres de deux allomorphes I_α et I_β .

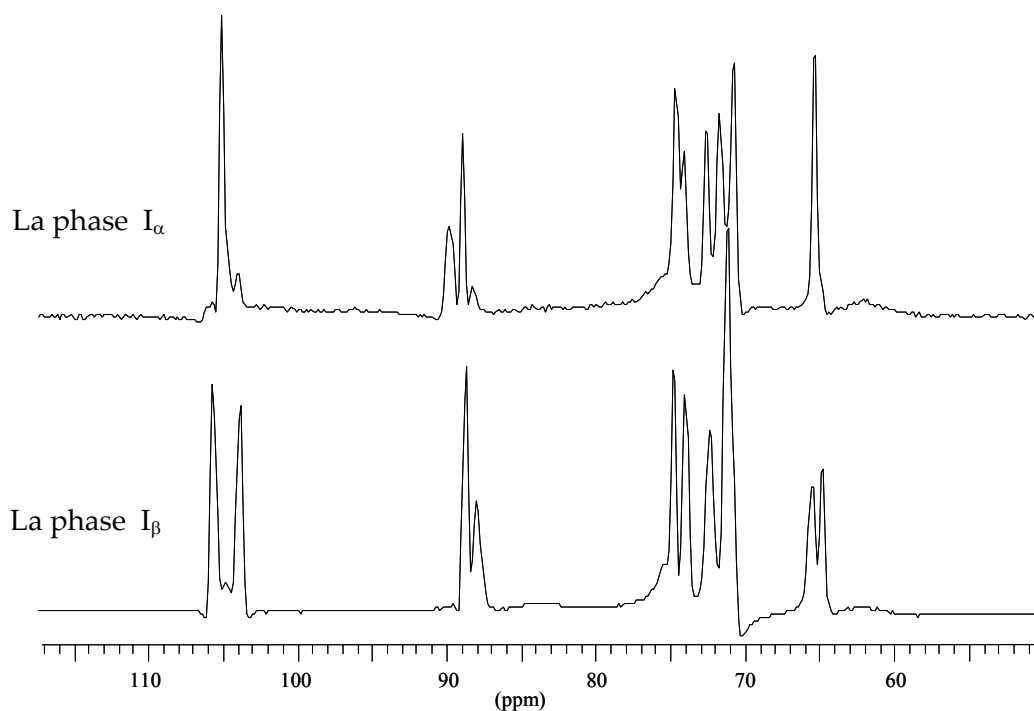


Figure II. 24 : Spectres RMN ^{13}C du solide des deux allomorphes I_α (de *Glaucocystis*) et I_β (de la tunicine)

On peut, d'après ces deux spectres, constater les différences entre les deux allomorphes, qui se manifestent surtout au niveau des signaux attribués aux carbones C-1, C-4 et C-6. Pour l'allomorphe I_β , ces signaux apparaissent tous sous la forme de doublets. Quant à la phase I_α , les signaux attribués aux carbones C-1 et C-6 donnent des singulets tandis que seul le signal du C-4 est sous la forme d'un doublet. On ne distingue pas de différence significative au niveau des carbones C-2, C-3 et C-5 qui donnent quatre raies principales.

C'est pourquoi, ce sont les signaux attribués aux C-1, C-4 et C-6 qui sont habituellement utilisés pour déterminer les proportions des deux allomorphes et du taux de cristallinité par déconvolution.

Cette déconvolution se base sur la génération des courbes de Lorentz qui permettent de décomposer le signal en plusieurs contributions. Pour l'estimation des proportions de phases I_α et I_β par exemple, le signal attribué au carbone anomérique C-1 est déconvolué en trois lorentziennes traduisant la contribution du doublet de la phase I_β et du singulet central de la phase I_α en tenant en compte des contributions des signaux des chaînes amorphes. Ces dernières se superposent au niveau du C-1, c'est pourquoi leur contribution est déterminée à partir de la déconvolution des signaux attribués aux carbones C-4 et C-6 où les signaux des chaînes désordonnées sont bien séparés de ceux des phases cristallines.

Sur le spectre enregistré pour les fibres purifiées du péricarpe de la graine, les signaux des carbones C-1, C-4 et C-6 sont déconvolués en cinq courbes de Lorentz qui résultent de la superposition des signaux des deux phases I_α (singulet) et I_β (doublet) qui composent la cellulose cristalline native, ainsi que la contribution de la fraction moins cristalline des chaînes de surface et de celle de la partie amorphe des microfibrilles (Figure II.25).

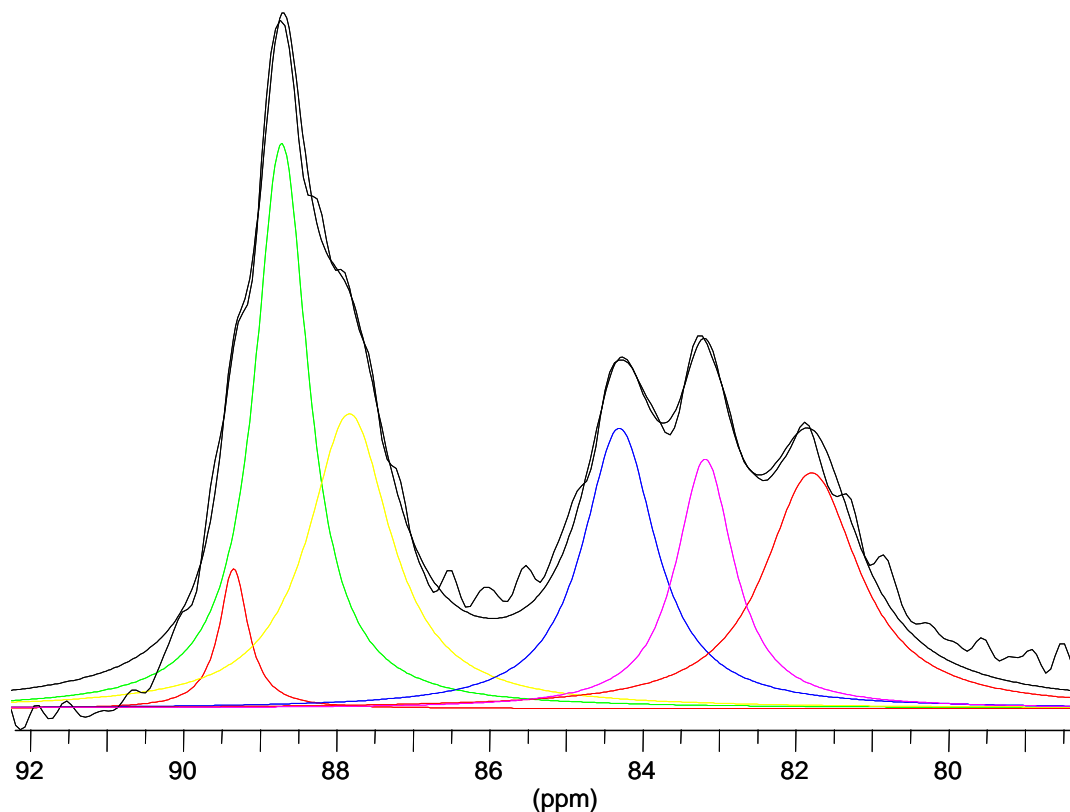


Figure II. 25: Déconvolution du spectre RMN du solide des fibres du péricarpe de la graine de la figue de barbarie en cinq courbes lorentziennes au niveau du C-4

On peut donc par mesure des surfaces de ces courbes de déconvolution au niveau du carbone C-1 évaluer les proportions des phases I_α et I_β dans la cellulose cristalline. On trouve des valeurs $I_\alpha=40\%$, $I_\beta= 60\%$ qui sont proches de celles de toutes les plantes supérieures.

Au niveau du carbone C-4 où les signaux de la partie cristalline et de la partie désordonnée sont bien séparés, on peut donc en déduire le taux de cristallinité. Les chaînes de surface donnent un épaulement entre 80 et 85 ppm, alors que les signaux des chaînes

ordonnées sont centrés vers 88.73 ppm. L'indice de cristallinité ou degré de cristallinité est déterminé par le rapport entre les surfaces de ces signaux. On utilise la relation :

$$IC = \frac{I_{cr}}{I_{cr} + I_{am}}$$

Avec : S_{cr} = surface du signal à 88.73 ppm attribué au C-4 de la phase cristalline

S_{am} = surface du signal entre 80-85 ppm attribué au C-4 de la phase amorphe

On trouve une valeur de 55% pour l'indice de cristallinité, valeur proche de celle obtenue à partir de la relation de Segal et qui est proche également de celles obtenues dans le cas des parois secondaires des plantes à fleures (56-60% pour le coton).

IV.5.4. Caractérisation au cours du traitement

Comme nous l'avons mentionné dans la partie consacrée à l'étude des xylanes, il est connu que les xylanes ne présentent pas d'organisation au sein de la paroi cellulaire. Elles forment une matrice amorphe entre les microfibrilles de cellulose. Néanmoins, isolées et sous certaines conditions, comme nous l'avons montré en présence de l'eau, elles peuvent s'organiser. Cette organisation est donc influencée par l'environnement où se trouvent ces xylanes. Afin de le vérifier, en présence de cellulose, nous avons utilisé la RMN du solide. Pour cela nous avons suivi l'évolution des spectres enregistrés dans le cas des résidus obtenus après chaque étape de purification. Sur la figure II.26 sont reportés ces spectres ainsi que celui de la xylane insoluble extraite dans une solution de soude à 2% (F_{INS-1}). Notons que tous les spectres ont été enregistrés à l'état hydraté.

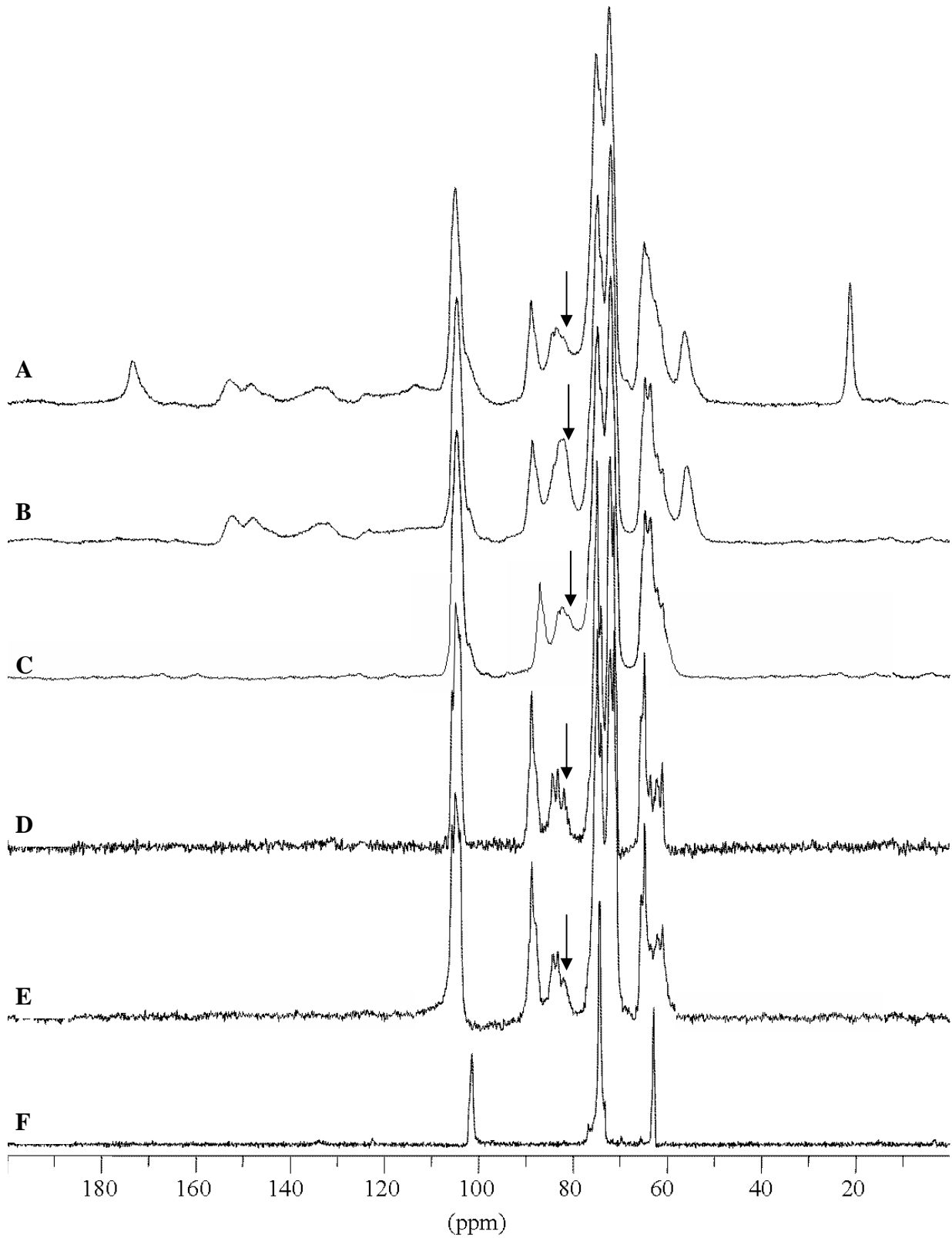


Figure II. 26: Spectres de RMN du solide des résidus du schéma d'extraction de la Figure II.19 A : péricarpe dégraissé; B : Résidu I; C : Résidu II, D : Résidu IV, E: Résidu V; F : Xylane

FINS-I

On constate, pour les spectres A, B, C correspondant au péricarpe dégraissé et aux résidus I et II respectivement, l'absence des signaux attribués aux unités xylose attendu notamment le signal du carbone anomérique C-1 vers 101.3 ppm alors que ces trois résidus sont riches en xylane. On peut supposer que ces signaux se superposent à ceux de la cellulose. Par ailleurs, on constate la présence de plusieurs signaux dans le spectre enregistré pour le péricarpe dégraissé vers 20.94, 56.06 et 173.21 ppm et plusieurs signaux entre 112 et 152 ppm. Les deux signaux à 20.94 et 173.21 disparaissent après le traitement à la soude ce qui suggère qu'ils s'agissent des groupements acétates portés par les xylanes. Ceci démontre que les xylanes à l'état natif dans le péricarpe de la graine de la figue de barbarie sont acétylées, ce qui n'était pas possible d'affirmer lors de l'étude des xylanes car les extractions ont été réalisées par des solutions alcalines.

Après blanchiment on observe la disparition des signaux à 56.06, et entre 112-152 ppm ce qui montre qu'ils correspondent aux résidus de la lignine.

Par ailleurs, on constate la disparition progressive du signal à 81.87 ppm au fur et à mesure des étapes d'extractions c'est-à-dire de l'élimination des xylanes. Cependant ce signal ne correspond à aucun des signaux attribués aux résidus xylose dans le spectre de la xylane isolée (Figure II.26-F). Ces observations ont été déjà reportées par Telman *et coll.* [127], Liitiäe *et coll.* [173] ainsi que Larsen *et coll.* [174] et ils en ont conclu que les xylanes adoptent, en présence de la cellulose, une organisation en co-agrégats. Cette organisation est différente de celle qu'elles adoptent à l'état isolé en présence d'eau et diffère également de celle qu'elles peuvent avoir avec d'autres substances. Elle se traduit par un déplacement vers les champs faibles du signal attribués au carbone C-4 des résidus xylose et qui entraîne un déplacement aussi du signal attribué au carbone C-1.

Ce phénomène est connu dans le cas de plusieurs polysaccharides à l'état isolés, qui bien qu'ils soient chimiquement identiques, peuvent présenter en CP/MAS des spectres différents en raison de l'existence de plusieurs formes d'association. Dans le cas de la cellulose par exemple, les études réalisées en CP/MAS sur des celluloses I de différentes origines ont montré que le signal de résonance correspondant au C-4 peut être déplacé d'un échantillon à l'autre selon que les chaînes sont associés en double ou triples hélices [175]. Ceci a conduit les auteurs à conclure que d'une structure à l'autre, la géométrie de la liaison β -(1 \rightarrow 4) n'est pas bloquée.

Par analogie à ces études, on pourrait se poser la question sur l'existence d'autres formes cristalline ou d'association des (1→4)-xylanes. En effet, Chanzy *et coll.* ont mis en évidence d'une façon tout à fait fortuite une autre forme cristalline des (1→4)-xylanes qu'ils décrivent comme étant une association en double hélices et non affectée par l'hydratation [176]. Malheureusement ils n'ont pas donné de spectre CP/MAS et nous n'avons pas été capable de reproduire cette forme cristalline. Toutefois on peut suggérer qu'il existe au sein de la paroi une certaine organisation des chaînes de xylanes en présence de la cellulose qui est à l'origine du déplacement du signal attribué aux C-1 et C-4 des résidus xylose liés β -(1→4).

IV.5.5. Conclusion

La purification et la caractérisation des fibres du péricarpe de la graine de la figue de barbarie ont été effectuées. Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'organisation au sein de la paroi cellulaire de deux composantes polysaccharidiques du péricarpe à savoir les xylanes et la cellulose. En effet, nous avons mis en évidence l'existence de deux types de xylanes : celles qui se trouvent dans la lamelle mitoyenne des cellules, et celles qui s'intercalent entre les strates de celluloses. Grâce à ces constatations, nous avons été capables de mettre au point un mode opératoire pour purifier les fibres cellulosiques. La combinaison à la fois des traitements chimiques et mécaniques était nécessaire pour purifier, sans aucune altération de la structure cristalline, les fibres du péricarpe. La caractérisation de ces fibres a été réalisée par diffraction des rayons-X et par RMN du solide. Ainsi l'indice de cristallinité et les proportions de deux allomorphes ont été déterminés, et leurs valeurs obtenues sont caractéristiques des parois secondaires des plantes à fleurs.

V. Etude de l'endosperme

Dans les endospermes des graines, les polysaccharides pariétaux sont constitués de polysaccharides composés essentiellement de mannose, en l'occurrence des mannanes, glucomannanes ou galactomannanes et en moindres proportions de xyloglucanes [177, 178]. Ces polysaccharides sont considérés, avec l'amidon, comme des réserves nutritives lors des différentes étapes de croissance, de la germination de l'embryon au développement de la plantule [179].

L'absence de mannose observé au cours du dosage des sucres dans la graine de la figue de barbarie nous a donc semblé étonnante. L'analyse morphologique a montré que cet

endosperme renferme plusieurs grains d'amidon. Par curiosité scientifique, nous avons tenté d'extraire et d'étudier qualitativement les différents polysaccharides contenus dans l'endosperme de la graine de la figue de barbarie. Une étude analytique par les méthodes classiques d'hydrolyse et méthylation a été aussi réalisée. Cette étude a été affinée par RMN.

V.1. Composition en sucres de l'endosperme

La composition en sucres neutres et acides de l'endosperme est reportée dans le tableau II.13 et nous avons reporté à titre comparatif la composition de la graine entière.

Tableau II. 13 : Composition en oses neutres et acides de la graine de la figue de barbarie entière et de son endosperme

| Echantillon | Oses neutres et acides (% massique) | | | | | | |
|----------------|-------------------------------------|-----|-----|------|--------|-----|------|
| | AU | Rha | Ara | Xyl | Man | Gal | Glu |
| Graine entière | 1,1 | 0,6 | 3,1 | 23,8 | 1,0 | 1,0 | 35,6 |
| Endosperme | 9.2 | 1,1 | 36 | 5,5 | traces | 4 | 35 |

Au vu de ces résultats, on constate que l'endosperme est composé majoritairement d'arabinose et de glucose. Il renferme en moindres proportions du xylose, du galactose et des acides uroniques. On peut constater que le mannose n'est décelé qu'à l'état de traces dans l'endosperme. Cette composition diffère de celle de la graine entière de par la présence d'arabinose en quantité importante (36%) alors que dans la graine entière on le trouvait en faibles quantités (3.1 %). Nous pouvons dire que l'endosperme est riche en polysaccharides composés en majorité d'arabinose (arabinanes) et de glucose (amidon et cellulose) et qu'il est dénué de tous polysaccharides contenant du mannose.

V.2. Extraction et caractérisation de l'amidon de l'endosperme

Dans un premier temps, nous avons voulu nous assurer de la nature des granules observés par microscopie lors de l'étude morphologique, afin de vérifier qu'il s'agissait vraiment d'amidon. Nous avons pour cela effectué une extraction à l'aide du DMSO pendant trois heures. Après filtration et élimination du DMSO par dialyse, le polysaccharide extrait a été lyophilisé. Nous avons par la suite enregistré un spectre du carbone-13 de cet extrait dans le DMSO-*d*₆. Le spectre, reporté sur la figure II.27, correspond à un spectre de l'amylopectine.

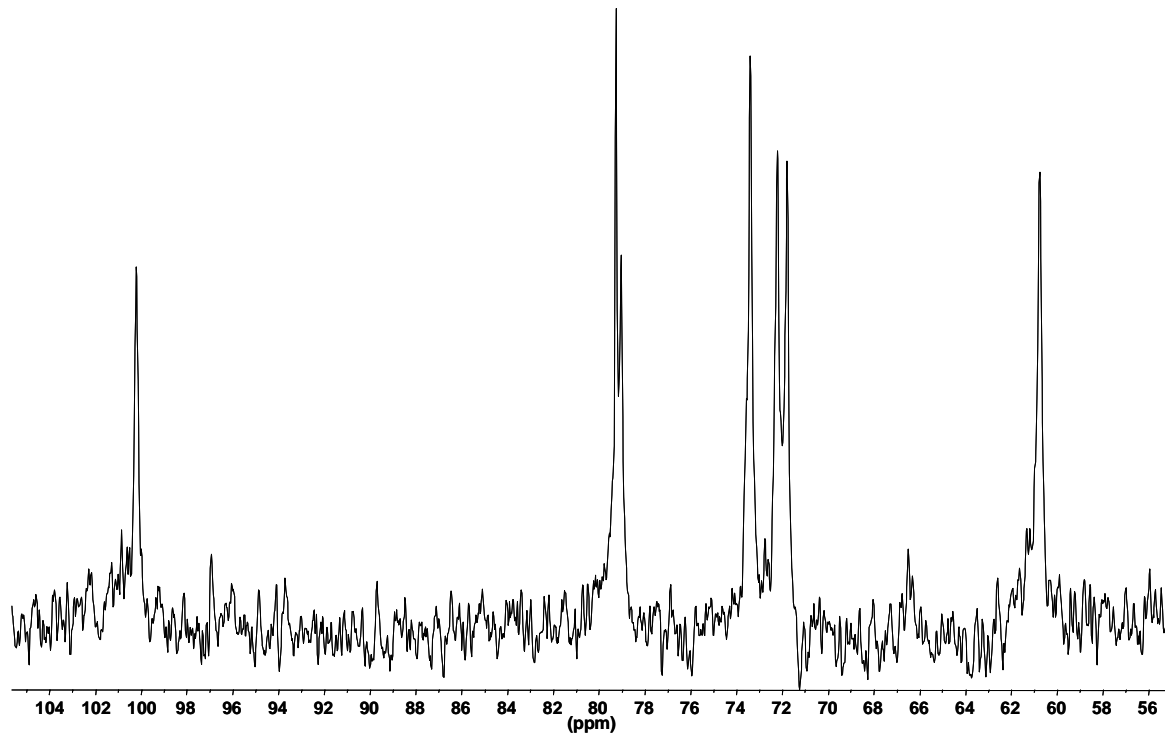


Figure II. 27: Spectre ¹³C de l'extrait DMSO de l'endosperme de la graine

Dans une seconde expérience, nous avons récupéré ces grains par une succession de centrifugations à partir d'une suspension aqueuse de l'endosperme. Un cliché de diffraction des rayons-X du culot est représenté sur la figure II.28, et par comparaison à une base de données disponible dans notre laboratoire, on constate qu'il correspond à un cliché d'amidon et plus précisément à de l'amidon de type A.

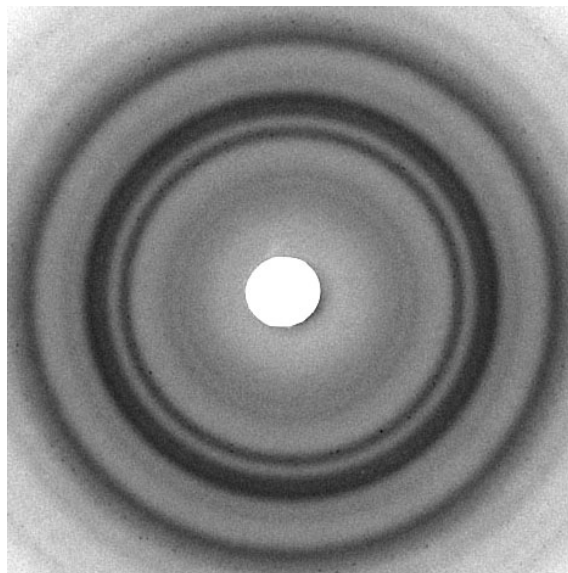


Figure II. 28: Cliché de diffraction des rayons-X de l'amidon de l'endosperme de la graine de la figue de barbarie

V.3. Extraction et caractérisation des polysaccharides pariétaux

V.3.1. Purification des parois cellulaires

Avant de procéder à l'extraction des polysaccharides pariétaux de l'endosperme de la graine de la figue de barbarie, les parois cellulaires ont été purifiées. Pour cela, l'endosperme isolé a été dégraissé à l'aide d'un mélange azéotropique Ethanol-Toluène (62 :38), puis l'amidon contenu a été hydrolysé par une digestion enzymatique à l'aide d'une α -amylase selon le protocole décrit dans la partie expérimentale.

V.3.2. Extraction des polysaccharides pariétaux

Les parois cellulaires ainsi purifiées, ont été soumises à une succession d'extractions en vue d'isoler les polysaccharides pariétaux. Mais étant donné la richesse de cet endosperme en arabinose, on a évité d'utiliser des conditions d'extraction acides, car les liaisons arabinofuranosyles sont très sensibles et s'hydrolysent assez facilement. Ainsi, les parois cellulaires purifiées ont été traitées à l'eau à 100°C au cours de deux cycles de 2 heures. Après précipitation à l'éthanol et dialyse contre de l'eau distillée, on obtient la fraction notée WSF (Water Soluble Fraction). Le résidu est traité ensuite par une solution aqueuse d'éthylène diamine tétracétique (EDTA) 0.5 % (p/v) à 100°C au cours de deux cycles de 2 heures. Après filtration et lavage à l'eau chaude, l'extrait est précipité à l'éthanol, puis dialysé contre de l'eau distillée et enfin lyophilisé. La fraction obtenue est notée CSF (Chelating Soluble Fraction). Le résidu récupéré a été blanchi à l'aide d'une solution aqueuse de chlorite de sodium dans un tampon acétique (pH=4.8) pendant 1 heure, avant d'être soumis aux autres traitements. Par la suite, le résidu blanchi a été traité par une solution de soude 0.5 M pendant deux cycles d'une heure à température ambiante, puis à 80°C. Les extraits obtenus lors de ces deux étapes ont été neutralisés à l'aide d'une solution aqueuse d'acide acétique 50% jusqu'à pH=6. Dans les deux extraits on a formation d'un précipité, qui est récupéré par centrifugation puis dialysé et lyophilisé. Les deux précipités sont désignés CAPF (Cold Alkaline Precipitate Fraction) et HAPF (Hot Alkaline Precipitate Fraction). Les surnageants ont été précipités à l'éthanol, et après dialyse et lyophilisation, les fractions obtenues sont notées respectivement CASF (Cold Alkaline Soluble Fraction) et HASF (Hot Alkaline Soluble Fraction). A l'issue de ces étapes on obtient un résidu final noté RF. Le schéma reporté sur la figure II.29 regroupe les différentes étapes d'extraction.

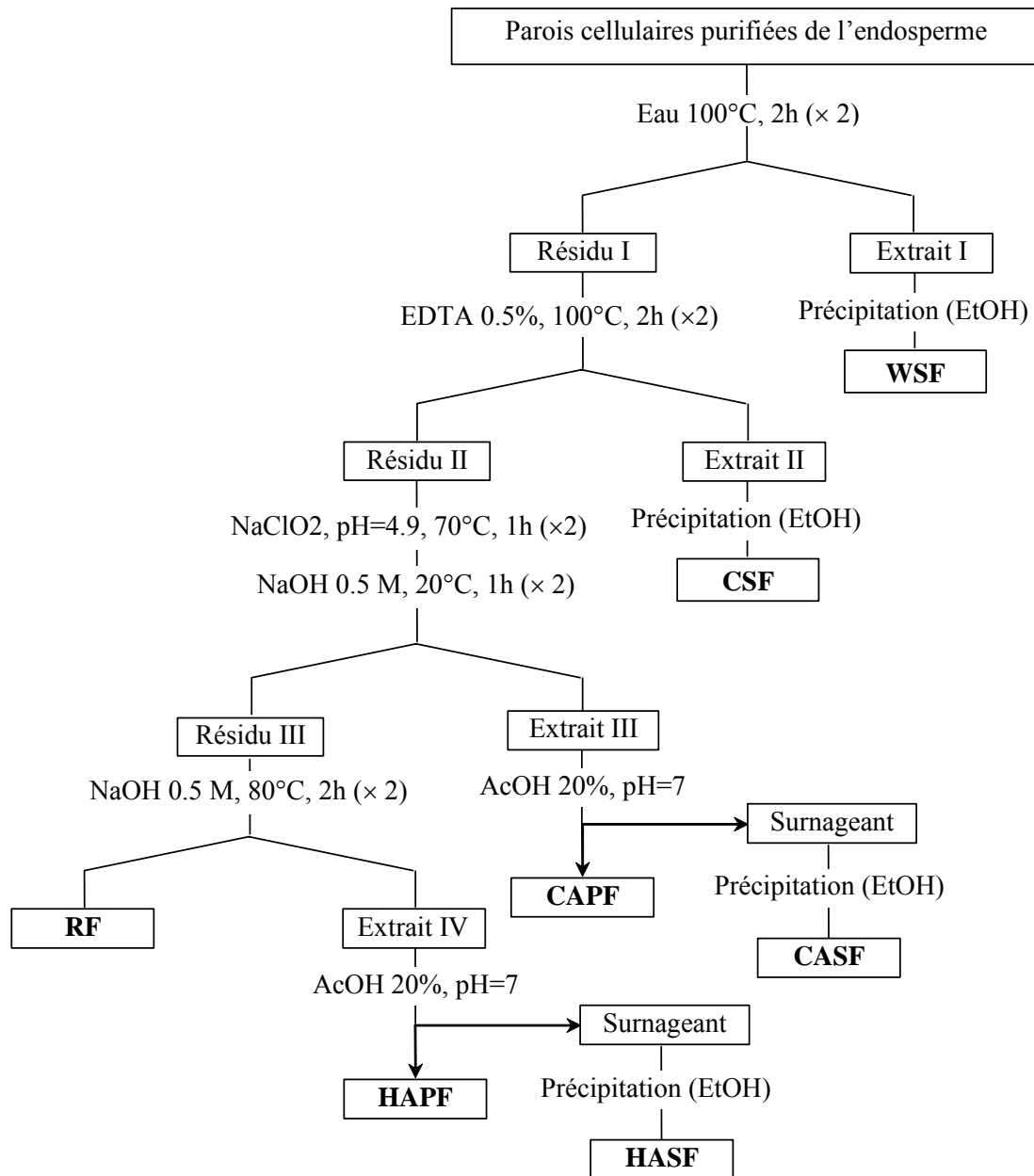


Figure II. 29: Schéma d'extraction des polysaccharides pariétaux de l'endosperme de la graine de la figue de barbarie

V.3.3. Rendements et caractérisation des extraits

L'ensemble des extractions menées, dans les différentes conditions pour isoler les polysaccharides pariétaux de l'endosperme de la graine de la figue de barbarie, nous a permis de les fractionner en plusieurs extraits. Les rendements de l'extraction ainsi que la composition des différentes fractions sont reportés dans le tableau II.14.

Tableau II. 14: Rendements et composition en sucres neutres et acides des différents extraits de l'endosperme de la graine du figuier de barbarie

| Fraction | Rendement (%) [*] | Sucres neutres et acides (% massique) | | | | | | |
|----------|----------------------------|---------------------------------------|--------|--------|-----|------|------|--------|
| | | AU | Rha | Glc | Gal | Ara | Xyl | Man |
| WSF | 6 | 10.4 | 3.4 | traces | 2.5 | 76.3 | 1.2 | – |
| CSF | 8.5 | 25.3 | 4.5 | 1.3 | 3.7 | 40.1 | 2.0 | traces |
| CAPF | 16 | – | – | – | – | – | 2.3 | – |
| CASF | 7 | 26.0 | 3.8 | 2.1 | 4.1 | 37.2 | 3.7 | traces |
| HAPF | 4.2 | – | – | – | – | – | 98.1 | – |
| HASF | 0 | non déterminés | | | | | | |
| RF | 11 | – | traces | 85 | 1.6 | 2.3 | 3.1 | 1.1 |

* en poids par rapport à la matière sèche de départ

D'après ces résultats on constate que la fraction CAPF est la plus importante en poids. Elle a été récupérée avec un rendement de 16 % par rapport à la matière sèche de départ, ce qui correspond 34 % de l'ensemble des fractions. Les autres fractions ont été extraites avec des rendements moyens qui varient de 4.2 à 8.5 % par rapport à la matière sèche. Le résidu final représente 11 % de la matière sèche de départ.

D'un point de vue composition osidique, on constate que les fractions WSF, CSF, CASF sont riches en arabinose (76.3, 40.1 et 37.2% respectivement). Elles renferment aussi en quantités plus au moins importantes des acides uroniques, qui sont de l'ordre de 10.4, 25.3 et 26 % pour WSF, CSF et CASF respectivement. Par contre, l'hydrolyse de la fraction majoritaire CAPF n'a mis en évidence que des traces de xylose et toutes les tentatives pour déceler sa composition osidique se sont avérées infructueuses, et elle a été abandonnée par la suite. La fraction HAPF renferme uniquement du xylose tandis que le résidu final de l'extraction est très riche en glucose. Par ailleurs, nous n'avons pas mis en évidence la présence de mannose dans ces différentes fractions.

V.4. Fractionnement et purification des différentes fractions

V.4.1. Fractionnement

D'après leurs compositions respectives, les fractions WSF, CSF, CASF semblent être de nature pectique, c'est pourquoi nous avons tenté de les fractionner en fonction de leur

teneur en acide. Les fractions WSF et CSF ont été déesterifiées par une solution de soude (0.1 M, 0°C, une nuit sous azote) puis neutralisées par une solution d'HCl 1M jusqu'à pH=5 afin de les isoler sous leur formes acide WSF⁺ et CSF⁺. La fraction CASF a été extraite en milieu alcalin, donc elle est déjà déesterifiée. Les trois fractions WSF⁺, CSF⁺ et CASF⁺, sous leurs formes acides, ont été fractionnées par chromatographie d'échanges ioniques, en utilisant une résine échangeuse d'ions cationique DEAE Trisacryl-M éluée par un tampon phosphate (0.05 M ; pH=6,3). Les échantillons sont décrochés progressivement de la colonne par ajout de NaCl dans l'éluant. Nous avons reportés sur la figure II.30, à titre d'exemple, le fractionnement de fraction CSF⁺.

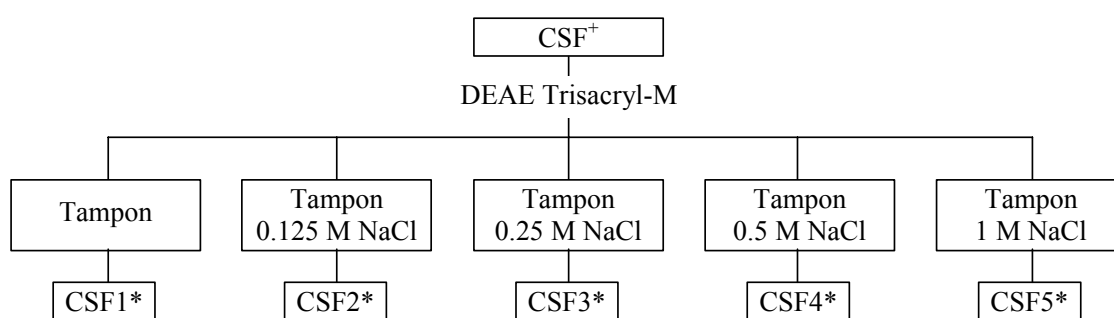


Figure II. 30: Fractionnement chromatographique de la fraction CSF

Les différentes fractions WSF⁺, CSF⁺ et CASF⁺ ont donc été fractionnées en cinq sous fractions. Ces dernières ont été obtenues avec différents rendements regroupés dans le tableau ci-contre.

Tableau II. 15: Rendement du fractionnement des fractions WSF⁺, CSF⁺ et CASF⁺

| Eluant | Fraction | | |
|-----------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | WSF ⁺ | CSF ⁺ | CASF ⁺ |
| Tampon | 65 % | 0 % | 15 % |
| Tampon + 0.125 M NaCl | 6 % | 15 % | 6 % |
| Tampon + 0.25 M NaCl | 3 % | 58 % | 42 % |
| Tampon + 0.5 M NaCl | 0 % | 4 % | 4.5 % |
| Tampon + 1 M NaCl | 2 % | 0 % | 7 % |

On peut constater d'après ces résultats, que les fractions WSF, CSF et CASF apparaissent comme des mélanges de sous fractions. Cependant chacune d'elles est marquée par la prédominance d'une seule sous fraction. Ainsi la fraction WSF est composée essentiellement d'une fraction vraisemblablement neutre du fait qu'elle n'a pas été retenue

par le support ionique. Cette sous fraction, notée WSF1*, représente 65 % de la prise d'essai initiale. Alors que les deux autres fractions CSF et CASF renferment des polysaccharides plus acides. Les fractions majoritaires dans ces deux fractions ont été éluées avec 0.25 M de NaCl, notées CSF3* et CASF3* et elles représentent 58 et 42 % respectivement de CSF et CASF. Pour la fraction CASF une quantité notable de produit a été aussi récupéré par le tampon seul. Cette sous-fraction CASF1*, apparemment neutre, a été récupérée avec un pourcentage de 15%.

V.4.2. Purification

Les fractions majoritaires WSF1*, CSF3*, CASF1* et CASF3* obtenues au cours des fractionnements de WSF, CSF et CASF, ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Biogel-P6 pour donner finalement les fractions purifiées notées respectivement WSF1, CSF3, CASF1 et CASF3.

La fraction HAPF a été purifiée, en raison de son insolubilité dans l'eau, par des méthodes chimiques basées sur des solubilisations et précipitations par des ions cuivriques selon le protocole décrit dans la partie expérimentale.

V.5. Etude des différentes fractions purifiées

Les cinq fractions purifiées auparavant ont été caractérisées par dosage de sucres et par méthylation, ainsi que par RMN du proton et du carbone 13.

V.5.1. Dosage des sucres

La composition osidique de toutes les fractions a été déterminée par les méthodes classiques de dosage des oses neutres et acides. Par ailleurs et pour remédier au problème de l'hydrolyse des liaisons alduroniques, l'acide galacturonique a été réduit en galactose avant l'hydrolyse selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. Cette réduction a été réalisée en utilisant le borohydrure de sodium deutérié (NaBD₄) afin de différencier le galactose provenant de la réduction de l'acide galacturonique et le galactose éventuellement présent sur les chaînes latérales. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau II.16.

D'après les résultats du dosage on peut constater que les fractions WSF1, CASF1 et HASF sont neutres. La fraction WSF1 est composée uniquement d'arabinose alors que les fractions CASF1 et HAPF renferment essentiellement du xylose, ce qui laisse supposer l'existence d'un polysaccharide de type xylane dans ces deux fractions. La fraction CASF1

contient également du fucose et des traces d'arabinose. La présence du fucose dans cette fraction, susceptible d'être une xylane, est très inhabituelle et demande à être vérifiée par d'autres méthodes.

Tableau II. 16 : Compositions en sucres neutres et acides des différentes fractions purifiées avant et après réduction

| Fraction | Osés neutres et acides (% massique) | | | | | | | |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------|------|--------|--------|------|-----|-----|
| | GalA | Gal-6.6'-d ₂ | Rha | Gal | Ara | Xyl | Fuc | Glc |
| WSF1 native | – | – | – | – | 98.5 | – | – | – |
| CSF3 native | 15 | – | 2.5 | 4.4 | 48.2 | 2.56 | – | – |
| CSF3 réduite | – | 18 | 17.6 | 4 | 55 | 1 | – | 3 |
| CASF1 native | – | – | – | – | traces | 87 | 12 | – |
| CASF3 native | 30 | – | 4.5 | 1.2 | 49.3 | 1.9 | – | – |
| CASF3 réduite | – | 35 | 11 | traces | 50 | 1.4 | – | 2 |
| HAPF native | – | – | – | – | – | 99 | – | – |

Les fractions CSF3 et CASF3 sont acides, et elles renferment de l'ordre de 15 et 30 % d'acide galacturonique. Elles contiennent des quantités importantes d'arabinose. Cette composition laisse penser qu'elles sont de nature pectique avec un squelette rhamnogalacturonane sur lequel sont branchées des chaînes d'arabinanes. En effet, le rhamnose a été détecté après réduction de l'acide galacturonique, en raison de la résistance de la liaison qui le lie avec l'acide galacturonique dans les conditions de l'hydrolyse. On remarque que la fraction CSF3 renferme autant de rhamnose que d'acide galacturonique, à la différence de CASF3 qui contient plus d'acide galacturonique que de rhamnose. Ceci laisse donc supposer que la fraction CSF3 est constituée uniquement de blocs rhamnogalacturonane (alternance de rhamnose et d'acide galacturonique). Par contre la fraction CASF3 semble renfermer en plus des blocs rhamnogalacturonanes, des blocs composés uniquement d'acide galacturonique (homogalacturonanes).

V.5.2. Analyse par méthylation

Afin de mettre en évidence la nature et les positions des liaisons entre les différents monomères dans les différents polysaccharides, on a eu recours à la méthylation. Les deux

fractions acides CSF3 et CASF3 ont été examinées après réduction comme précédemment afin d'améliorer les rendement d'hydrolyse. Les résultats de l'analyse par méthylation sont regroupés dans le tableau II.17 suivant :

Tableau II. 17 : Acétates d'alditols partiellement méthylés des différentes fractions natives ou réduites

| Acétates partiellement méthylés | alditols | Fraction | | | | |
|--|----------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|
| | | WSF1 native | CASF1 native | HAPF native | CSF3 réduite | CASF3 réduite |
| 2,3,5-Me ₃ -Ara* | | 38.3 | – | – | 20.3 | 18.8 |
| 2,3-Me ₂ -Ara | | 6.7 | – | – | 17.2 | 17.7 |
| 2,5-Me ₂ -Ara | | 15.3 | – | – | – | – |
| 2-Me-Ara | | 0.1 | – | – | 5.8 | 7.2 |
| 3-Me-Ara | | 37.7 | – | – | 5.1 | 3.6 |
| Ara | | 0.2 | – | – | 4.3 | 5.0 |
| 2,3-Me ₂ -Xyl | | – | 76 | 99 | – | – |
| 2-Me-Xyl | | – | 11.3 | – | – | – |
| 2,3,4,Me ₃ -Fuc | | – | 12 | – | – | – |
| 3,4-Me ₂ -Rha | | – | – | – | 10.6 | 7.7 |
| 3-Me-Rha | | – | – | – | 6.7 | 5.9 |
| 2,3,4,6-Me ₄ -Gal | | – | – | – | 4.9 | 4.2 |
| 2,3,6-Me ₃ -Gal | | – | – | – | 5.1 | – |
| 2,3,6-Me ₃ -Gal-6,6'-d ₂ | | – | – | – | 20 | 30.2 |

*2,3,5-Me₃-Ara= 1,4-di-O-acétyl-2,3,5-tri-O-méthyl-D-arabinitol, etc

V.5.2.1. La fraction WSF1

L'analyse par méthylation de la fraction WSF1 révèle la présence en majorité de quatre monomères d'arabinose. Il s'agit, en proportions relatives: 38.3 % d'arabinose terminal (2,3,5-Me₃-Ara) ; 6.7 % d'arabinose lié (1→5) (2,3-Me₂-Ara); 15.3 % d'arabinose lié (1,3) (2,5-Me₂-Ara) et 37.7% d'arabinose lié (1→5) et substitué en O-2 (3-Me-Ara). L'arabinose substitué en O-3 et l'arabinose doublement substitué en O-2 et O-3 ont été détectés à l'état de traces. Cette configuration laisse prévoir que cette arabinane est constituée d'un squelette principal d'unités arabinose liées (1→5) et hautement substituée en position O-2 (84 % de l'ensemble

des unités arabinose liées en (1→5)). Les ramifications peuvent être constituées d'oligoarabinanes liés (1→3). Cependant la proportion d'arabinose lié (1→3) est inférieure à celle de l'arabinose substitué en O-2, ce qui laisse prévoir des substitutions irrégulières sur le squelette principal. On peut donc prévoir que les ramifications renferment soit une seule unité terminale soit un dimère lié (1→3). Ainsi d'après les résultats de la méthylation : 40 % des unités substituées en O-2 portent un dimère lié [Ara-(1→3)-Ara] et 60 % ne portent qu'une seule unité arabinose en position O-2.

V.5.2.2. La fraction CSF3

Plusieurs monomères d'arabinose ont été identifiés en pourcentages différents dans la fraction CSF3. Il s'agit, en proportions relatives par rapport à l'ensemble des unités arabinoses: 38 % d'arabinose terminal (2,3,5-Me₃-Ara) ; 33 % d'arabinose lié (1→5) ; 11 % et 10 % d'arabinose lié (1→5) et substitué en O-3 et O-2 respectivement ; 8 % d'arabinose lié (1→5) et substitué à la fois en O-2 et O-3.

Cette composition suggère donc que cette arabinane est constituée d'un squelette principal formé d'unités arabinofuranose, liées entre elles uniquement par des liaisons (1→5). L'unité répétitive moyenne est composée de quatre unités arabinoses non substituées et une unité substituée en O-3, une unité substituée en O-2 et une unité doublement substituée.

Contrairement à la fraction WSF1, cette arabinane constitue une chaîne latérale d'une rhamnogalacturonane révélée par la présence des résidus méthylés provenant du rhamnose et de l'acide galacturonique. En effet, deux monomères du rhamnose (3,4-Me₂-Rha, 10.6% et 3-Me-Rha, 6.7 %) et un monomère du galactose (2,3,6-Me₃-Gal-6,6'-d₂, 20%) provenant de la réduction de l'acide galacturonique lié (1→4) ont été identifiés. Ce résultat montre que la fraction CSF3 est constituée d'une alternance d'unités rhamnose liés (1→2) et d'acide galacturonique liés (1→4). La présence de 3-Me-Rha, provenant du rhamnose lié (1→2) et substitué en position O-4, indique les points de branchement où sont liées les chaînes latérales d'arabinane.

D'autres résidus perméthylés ont été détectés en faibles proportions dans cette fraction. Il s'agit du 2,3,6-Me₃-Gal et 2,3,4,6-Me₄-Gal en pourcentages relatifs respectivement de 5.1 et 4.9%. Ces résidus proviennent des courtes chaînes de (1→4)-galactane branchées en position O-4 sur le rhamnose du squelette principal de la rhamnogalacturonane.

Le taux de substitutions du squelette rhamnogalacturonane est estimé à 35% de l'ensemble des unités rhamnose, et les longueurs de chaînes des arabinanes et galactanes sont en moyenne de 15 unités arabinose pour l'arabinane et 2 unités galactose pour la galactane.

V.5.2.3. La fraction CASF1

La fraction CASF1 présente une structure plus simple puisque seuls trois résidus ont été identifiés. Le monomère majoritaire est le 2,3-Me₂-Xyl, mais on détecte en faible proportion du 2-Me-Xyl. Ce qui laisse supposer qu'elle est constituée d'unités xylose liées (1→4) qui sont substituées en position O-3 par d'autres résidus. La présence de fucose terminal (2,3,4-Me₃-Fuc) en même proportion que le xylose substitué en O-3, suggère que le fucose constitue le principal substituant. A notre connaissance, c'est la première fois que l'on rencontre une xylane extraite d'un végétal substituée par des unités fucose.

V.5.2.4. La fraction CASF3

L'analyse par méthylation de la fraction CASF3 révèle la présence globalement des mêmes résidus que la fraction CSF3. Les résidus arabinose trouvés ont pratiquement les mêmes types de liaisons mais cependant dans des proportions différentes. Ce qui suggère que les arabinanes de ces deux fractions ont plus au moins des structures identiques. Elles sont constituées d'un squelette principal composé d'unités arabinoses liées (1→5). Pour la fraction CASF3 l'unité répétitive est composée neuf unités arabinose dont cinq unités ne sont pas substituées et deux unités sont substituées en position O-3 tandis qu'une unité est substituée en position O-2 et une doublement substituées en O-2 et O-3.

Un seul résidu galactose non marqué par le deutérium a été trouvé. Il s'agit du 2,3,4,6-Me₄-Gal, ce qui suggère qu'une seule unité galactose est liée sur le rhamnose.

La fraction CASF3 renferme aussi une rhamnogalacturonane constituée d'une alternance d'unités acide galacturonique liées (1→4) (présence de 2,3,6-Me₃-Gal-6,6'-d₂, 30.2%) et d'unités rhamnose liées (1→2) (présence de 3,4-Me₂-Rha, 7.7%) dont 43 % sont ramifiées en position O-4 (présence de 3-Me-Rha, 5.9%). Mais contrairement à la fraction CSF3 la proportion du 2,3,6-Me₃-Gal-6,6'-d₂ est beaucoup plus importante que l'ensemble des résidus provenant du rhamnose. Ceci suggère que cette fraction est constituée d'un squelette contenant à la fois de blocs d'homogalacturonanes [→4)-GalA-(1→] et de blocs de rhamnogalacturonanes [→4)-GalA-(1→2)-Rha-(1→].

Les chaînes latérales sont composées, d'après les résultats de la méthylation, en moyenne, de 15 unités arabinose pour l'arabinane et une seule unité galactose.

V.5.2.5. La fraction HAPF

La fraction HASP est constituée exclusivement d'unités xylose liées (1→4) d'après les résultats de la méthylation. En effet on détecte uniquement le 2,3-Me₂-Xyl, ce qui affirme qu'il s'agit d'une (1→4)-xylane.

V.5.3. Étude par spectroscopie RMN

Nous avons utilisé la spectroscopie RMN 1D et 2D afin de confirmer les structures des différentes fractions polysaccharidiques isolées et purifiées de l'endosperme de la graine de la figue de barbarie. Les spectres ¹H et ¹³C des différentes fractions WSF1, CSF3, CASF1, CASF3 et HAPF sont regroupés sur les figures II.32 et II.33 respectivement. L'attribution complète des signaux des différents résidus a été obtenue grâce aux données bibliographiques [180-185] et aussi par l'utilisation des corrélations homo et hétéronucléaires directes ou à distance, et ce pour les différentes fractions.

V.5.3.1. La fraction WSF1

L'analyse RMN des spectres proton ou carbone-13 confirment les résultats de la méthylation et révèle la présence de quatre résidus arabinose dans la fraction WSF1. En effet dans le spectre ¹³C, dans la région des carbones anomères, on constate la présence de quatre signaux à 108.52, 108.46, 107.82 et 107.21 ppm et qui peuvent être attribués aux carbones anomériques des résidus arabinose liés (1→3), liés (1→5), liés (1→5) et substitués en O-2, et aux résidus terminaux, respectivement. On peut distinguer facilement sur les cartes de corrélation HSQC et HMBC des taches à 5.21, 5.09, 5.04 et 4.97 ppm attribués aux H-1 respectivement des résidus arabinose liés (1→2,5), en positions terminales, liés (1→5) et liés (1→3). Par des corrélations directes, on peut remonter à l'ensemble des protons. La présence de deux signaux à 62.26 et 61.92 ppm dont les protons correspondants sont identifiés à 3.80 et 3.86 ppm respectivement, confirme la présence de deux résidus différents n'ayant pas le C-5 impliqué dans une liaison glycosidique. Il s'agit des unités terminales et des résidus arabinose liés (1→3). Ceci démontre sans ambiguïté la présence de tels résidus (liés (1→3)) dans cette fraction. L'ensemble de ces résultats est reporté dans le tableau II.18.

A partir de ces résultats obtenus par RMN et par méthylation, on peut proposer pour la fraction WSF3 la structure de l'arabinane reportée sur la figure II.31, mais d'autres structures isomères sont possibles. Un oligoarabinane de structure proche a été isolé de graines de colza [185].

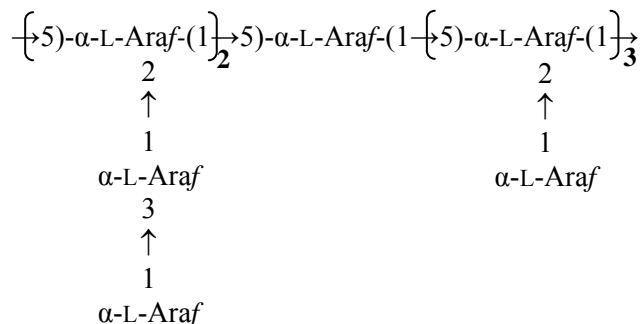


Figure II. 31 : Structure proposée pour l'arabinane de la fraction WSF1

Tableau II. 18: Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction WSF1

| Les résidus glycosidiques | | Déplacements chimiques (ppm) | | | | |
|--|-----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| $\rightarrow 5) \text{-}\alpha\text{-Araf-(1} \rightarrow$ | ^1H | 5.04 | 4.08 | 4.03 | 4.18 | 3.87 |
| | ^{13}C | 108.46 | 81.85 | 77.48 | 83.06 | 68.22 |
| $\rightarrow 2,5) \text{-}\alpha\text{-Araf-(1} \rightarrow$ | ^1H | 5.21 | 4.32 | 4.04 | 4.24 | 3.72 |
| | ^{13}C | 107.82 | 80.38 | 84.90 | 82.82 | 68.47 |
| $\rightarrow 3) \text{-}\alpha\text{-Araf-(1} \rightarrow$ | ^1H | 4.97 | 4.09 | 4.16 | 4.18 | 3.86 |
| | ^{13}C | 108.52 | 84.96 | 83.20 | 83.06 | 61.92 |
| T- $\alpha\text{-Araf-(1} \rightarrow$ | ^1H | 5.09 | 4.16 | 3.91 | 3.97 | 3.80 |
| | ^{13}C | 107.21 | 82.62 | 77.47 | 84.93 | 62.26 |

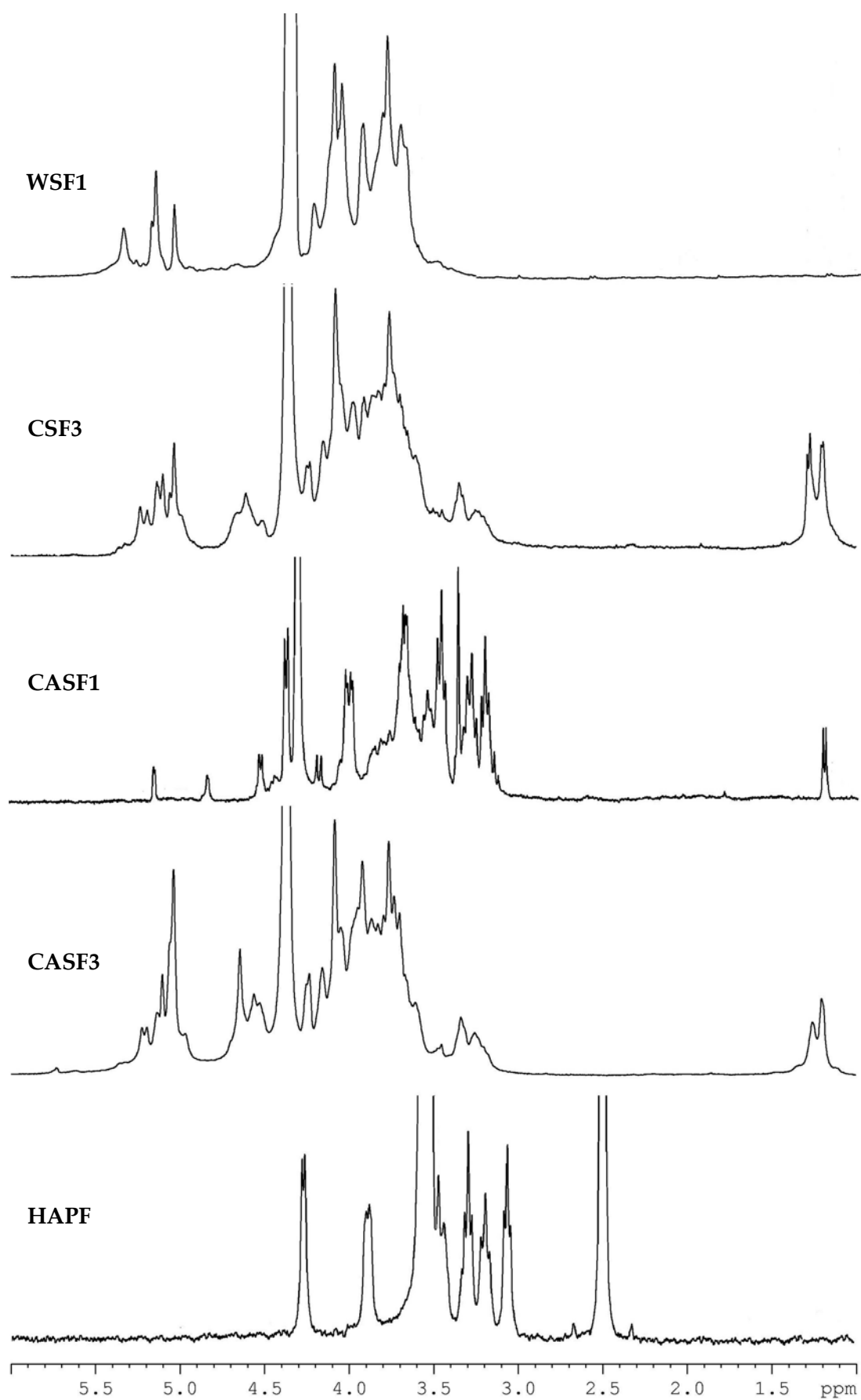


Figure II. 32 : Spectres ^1H des fractions WSF1, CSF3, CASF1, CASF3 et HAPF

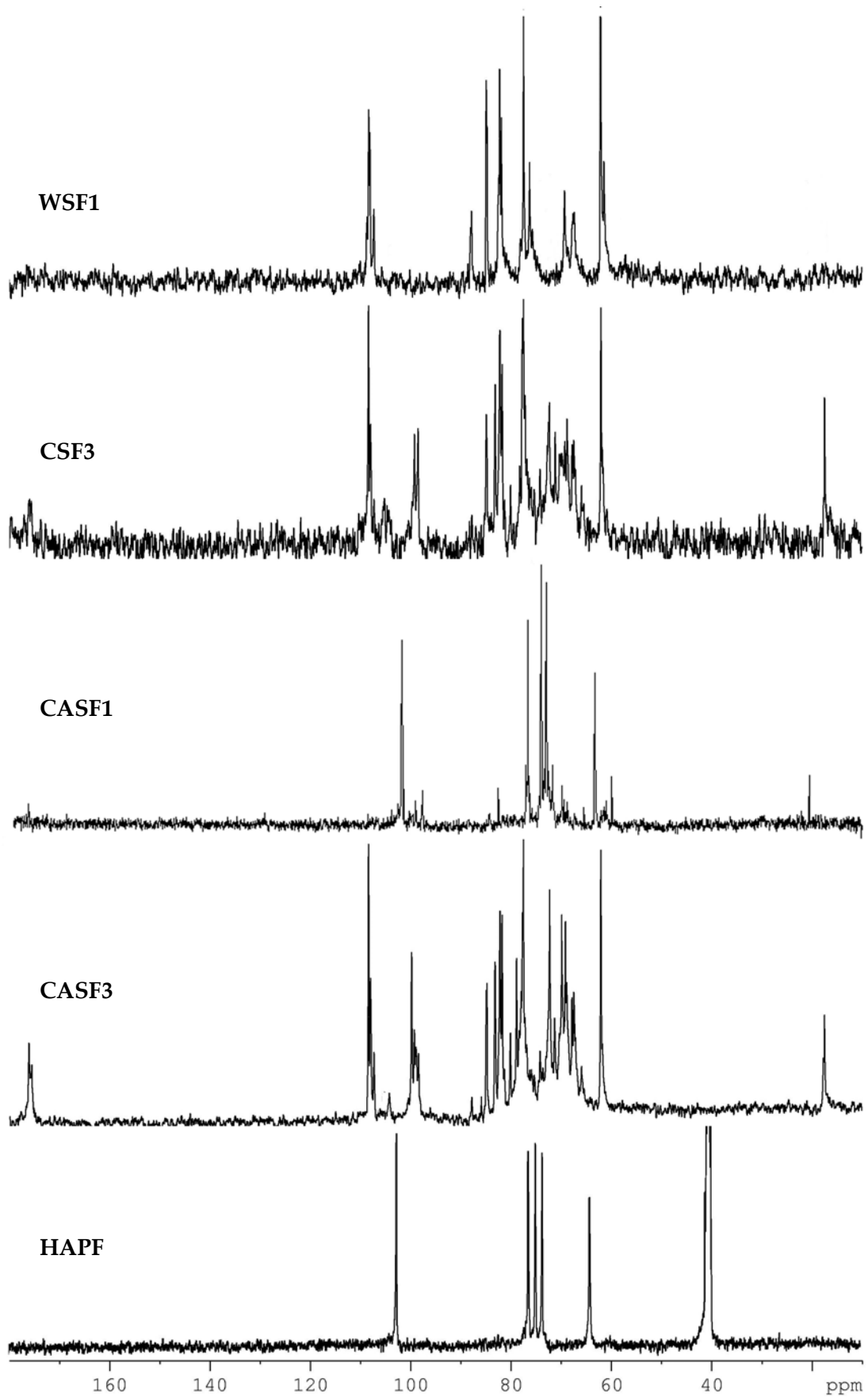
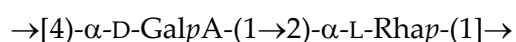


Figure II. 33 : Spectres ^{13}C des fractions WSF1, CSF3, CASF1, CASF3 et HAPF

V.5.3.2. La fraction CSF3

Les résultats de l'analyse RMN confirment les résultats de la méthylation et donc que la fraction CSF3 est une rhamnogalacturonane qui porte des chaînes d'arabinanes et de galactane en chaînes latérales. Le squelette rhamnogalacturonane est caractérisé par la présence sur le spectre ^{13}C dans la région des carbones anomères des signaux à 98.49 et 99.21 ppm attribués aux C-1 des résidus rhamnose liés (1→2) et acide galacturonique liés (1→4). Les signaux à 176.01 et 17.43 ppm sont caractéristiques des fonctions carboxyliques des résidus acide galacturonique et des groupements méthyles des résidus rhamnose respectivement. Ces derniers sont encore bien identifiés dans le spectre ^1H par la présence de deux doublets centrés à 1.2 et 1.26 ppm. Le signal à 1.2 ppm est attribué aux résidus rhamnose liés uniquement (1→2), alors que le signal à 1.26 ppm est caractéristique des unités rhamnose liées (1→2) et substituées en position O-4. Ces substitutions sont constituées de courtes chaînes arabinanes et galactanes. Les chaînes arabinanes sont caractérisées par la présence sur le spectre ^{13}C dans la régions des carbones anomères des signaux à 108.38 et 107.28 ppm tandis que les résidus galactose sont caractérisés par la présence d'un signal aux environs de 105.16 ppm.

L'ensemble des déplacements chimiques des signaux carbone-13 des différents résidus est regroupé dans le tableau II.19. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'analyse par méthylation et confirment que la fraction CSF3 est constituée d'un squelette principal rhamnogalacturonane dont l'une unité répétitive est :



Sur ce squelette, 37% des unités rhamnose portent en position O-4, soit des chaînes latérales de β -(1→4)-galactane linéaire contenant en moyenne, 2 unités galactose soit des chaînes d' α -(1→5)-arabinane plus au moins branchées en O-2 et/ou O-3. La figure II.34 ci-dessous représente une des structures possibles de l'unité répétitive de l'arabinane de la chaîne latérale :

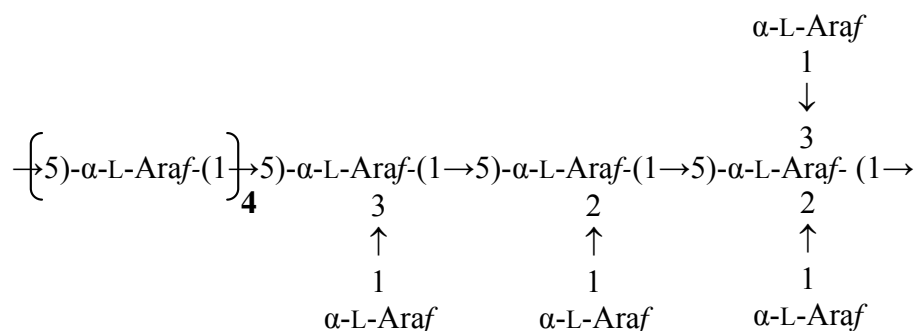


Figure II. 34 : Structure proposée pour l’arabinane de la chaîne latérale de la fraction CSF3

Tableau II. 19 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction CSF3

| Résidus glycosidiques | Déplacements chimiques (ppm) | | | | | | |
|---|------------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Les résidus arabinose | | | | | | | |
| $\rightarrow 5\text{-}\alpha\text{-Araf}\text{-}(1 \rightarrow$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.05/108.66 | 4.08/82.22 | 4.11/78.53 | 4.16/83.15 | 3.81/68.22 | - |
| $\rightarrow 3,5\text{-}\alpha\text{-Araf}\text{-}(1 \rightarrow$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.09/108.08 | 4.23/80.01 | 3.92/84.95 | 4.25/82.13 | 3.76/68.17 | - |
| $\rightarrow 2,5\text{-}\alpha\text{-Araf}\text{-}(1 \rightarrow$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.03/108.55 | 4.13/85.00 | 4.37/78.04 | 4.16/83.20 | 3.86/67.65 | - |
| $\rightarrow 2,3,5\text{-}\alpha\text{-Araf}\text{-}(1 \rightarrow$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.13/108.11 | 4.25/85.00 | 4.06/84.98 | 4.20/83.20 | 3.67/68.13 | - |
| T- $\alpha\text{-Araf}\text{-}(1 \rightarrow 2$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.18/107.33 | 4.08/82.4 | 3.98/77.66 | 4.00/84.98 | 3.65/62.25 | - |
| T- $\alpha\text{-Araf}\text{-}(1 \rightarrow 3$ | | 5.203/110.36 | | | | 3.79/62.09 | |
| Les résidus galactose | | | | | | | |
| $\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-Galp}\text{-}(1 \rightarrow$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 4.56/105.26 | 3.48/72.70 | 3.70/74.18 | 4.11/78.34 | 3.65/75.3 | 3.76/61.78 |
| Les résidus acide galacturonique | | | | | | | |
| $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-GalpA}\text{-}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1 \rightarrow$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 4.96/98.52 | 3.97/68.82 | 4.02/69.8 | 4.37/77.9 | 4.56/72.3 | 176.50 |
| Les résidus rhamnose | | | | | | | |
| $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-GalpA}\text{-}(1 \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1 \rightarrow$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.23/99.21 | 4.08/77.69 | 3.87/70.32 | 3.35/71.20 | 3.80/69.81 | 1.20/17.43 |
| $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-GalpA}\text{-}(1 \rightarrow 2,4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1 \rightarrow$ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.23/99.02 | 4.15/78.75 | 3.87/70.32 | 4.23/80.05 | 3.68/67.76 | 1.25/17.64 |

V.5.3.3. La fraction CASF1

Dans le spectre ^{13}C de la fraction CASF1 on constate la présence de cinq signaux majoritaires à 102.37, 77.15, 74.45, 73.45 et 63.74 ppm qui correspondent aux carbones C-1, C-4, C-3, C-2 et C-5 respectivement des résidus xylose liés $\beta\text{-}(1 \rightarrow 4)$. D’autres signaux minoritaires sont également identifiés dans le spectre à 98.30, 83.03, 177.16 et 60.23 ppm et qui sont caractéristiques de l’acide 4-O-méthy-glucuronique. Ils sont attribués aux carbones C-1, C-4, aux groupements carboxyliques et méthyles respectivement. Ces résidus sont portés par le squelette principal en position O-2 de certains résidus xylose caractérisés par la présence des signaux à 101.95, 77.41, 72.12, 75.95 et 62,39 ppm attribués aux C-1, C-2, C-3, C-4 et C-5 respectivement. La présence des résidus fucose est confirmée par la présence de plusieurs signaux dont deux particulièrement caractéristiques à 99.67 et 20.85 ppm et qui

sont attribués aux carbones C-1 et C-6 (CH₃) respectivement. Ces résidus sont liés aux unités xylose en position O-3 qui sont identifiées par les signaux à 103.12, 76.88 ppm qui sont attribués aux carbones C-1 et C-3 du xylose qui porte en O-3 un résidu fucose.

Dans le spectre ¹H, on retrouve les cinq signaux majoritaires caractéristiques des résidus xylose liés (1→4) et non substitués. D'autres signaux minoritaires sont aussi présents et sont attribués aux résidus fucose, acide 4-O-méthyl-glucuronique et aux unités xylose qui les portent. Dans la région des protons anomères on peut facilement identifier quatre doublets à 4.45, 4.51, 4.83 et 5.14 ppm attribués respectivement aux protons anomériques des résidus xylose substitués en position O-3, des résidus xylose substitués en O-2, du résidu fucose et de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique. La présence d'un singulet à 3.35 ppm confirme la présence de l'acide 4-O-méthylglucuronique. Le résidu fucose est caractérisé par la présence d'un doublet fin à 1.19 ppm attribué au groupement méthyle. L'ensemble de ces résultats est regroupé dans le tableau II.20 et suggère qu'il s'agit d'une 4-O-méthyl-glucuronoxylane fucosylée en position O-3 de certains résidus xylose de la chaîne principale.

Tableau II. 20 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction CASF1

| Les résidus glycosidiques | | Déplacements chimiques | | | | |
|---------------------------|-----------------|------------------------|-------|-------|-------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.36 | 3.14 | 3.40 | 3.60 | H _{eq} : 3.97 / H _{ax} : 3.23 |
| | ¹³ C | 102.37 | 73.45 | 74.45 | 77.15 | 63.74 |
| →2.4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.51 | 3.38 | 3.53 | 3.60 | H _{eq} : 4.01 / H _{ax} : 3.22 |
| | ¹³ C | 101.95 | 77.41 | 72.12 | 75.95 | 62.39 |
| →3.4)-β-D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.45 | nd | nd | nd | nd |
| | ¹³ C | 103.12 | 72.27 | 76.88 | 76.24 | 63.50 |
| α-D-Fucp(→ | ¹ H | 4.83 | 3.65 | 3.80 | 3.70 | nd/CH ₃ :1.19 |
| | ¹³ C | 99.67 | 68.53 | 76.24 | 69.01 | 61.41/CH ₃ : 20.85 |
| 4-O-Me-α-D-GlcpA(→ | ¹ H | 5.14 | 3.46 | 3.58 | 3.12 | 4.16 /OCH ₃ : 3.35 |
| | ¹³ C | 98.30 | 72.95 | 77.44 | 83.03 | 73.15 |
| | | | | | | OCH ₃ : 60.23 / C-6: 177.16 |

Afin déterminer le taux de substitution de cette 4-O-méthy-glucurono-xylane inhabituelle, nous avons mesuré les surfaces des signaux anomériques dans le spectre ¹H et

dans le spectre ^{13}C . Les rapports molaires entre les différents résidus Xyl/4-OMe-GlcA/Fuc/ sont respectivement de 12: 2 :1.

V.5.3.4. La fraction CASF3

Les spectres de la fraction CASF3 présentent la même allure globale que ceux enregistrés pour la fraction CSF3. On peut observer dans le spectre ^{13}C les signaux caractéristiques des résidus rhamnose et acide galacturonique impliqués dans des blocs rhamnogalacturonanes. Ainsi les signaux à 99.22 et 98.92 ppm sont attribués aux carbones anomériques des résidus rhamnose liés α -(1→2) et acide galacturonique liés (1→4). Les groupements méthyle du rhamnose et les fonctions carboxyliques des résidus acide galacturonique sont caractérisés par la présence des signaux à 17.43 et 175.45 ppm respectivement. Cependant on constate l'apparition de plusieurs signaux caractéristiques d'unités acide galacturonique liés α -(1→4) entre elles pour constituer des blocs d'homogalacturonanes, à 99.75, 78.86, 72.25, 69.85 et 69.12 ppm qui sont attribués aux C-1, C-4, C-5, C-3 et C-2 respectivement de l'unité acide galacturonique. La présence de deux signaux à 80.06 et 17.54 ppm qui sont attribués aux C-4 et C-6 des résidus rhamnose liés (1→2) et substitués en O-4, confirme la présence de ramifications latérales. De la même façon, la présence dans le spectre ^1H de deux doublets centrés à 1.2 et 1.25 ppm met en évidence l'existence d'unités rhamnose liées (1→2) et d'unités rhamnose liées (1→2) et branchées en O-4.

Les chaînes latérales sont constituées, comme le montrent les différents spectres, de courtes chaînes d'arabinanes et de galactanes. Le résidu galactose est identifié par le signal caractéristique du carbone anomérique à 105.21 ppm. Les arabinanes sont constituées d'unités liées α -(1→5) non substituées ou substituées en O-3, en O-2 ou en O-2 et O-3 à la fois. Ces unités sont caractérisées, respectivement, par la présence dans la région des carbones anomériques des signaux à 108.37, 107.98, 107.37 et 107.87 ppm. Les unités arabinoses terminales qui constituent les ramifications sont caractérisées par la présence de signaux à 110.34 et 107.28 ppm.

D'après l'ensemble des résultats de la RMN et de la méthylation, le polysaccharide de la fraction CASF3 est constitué d'un squelette principal où s'intercale des blocs rhamnogalacturonanes et des blocs homogalacturonanes :



facilement attribués respectivement aux protons H-1, H-5eq, H-4, H-3, H-5ax et H-2. Ces résultats sont reportés dans le tableau II.22 et indiquent qu'il s'agit d'une β -(1→4)-xylane.

Tableau II. 22 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction HAPF

| Les résidus glycosidiques | Déplacements chimiques | | | | | |
|---------------------------|------------------------|--------|-------|-------|-------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| →4)- β -D-Xylp-(1→ | ¹ H | 4.26 | 3.05 | 3.28 | 3.53 | H _{eq} : 3.88 / H _{ax} : 3.18 |
| | ¹³ C | 102.34 | 73.32 | 74.59 | 76.02 | 63.81 |

V.6. Conclusion

L'étude des polysaccharides pariétaux de l'endosperme de la graine de la figue de barbarie a montré la richesse de cet endosperme en polysaccharides composés essentiellement d'arabinose. L'investigation structurale de ces polysaccharides a été réalisée par les méthodes classiques d'analyse basées sur le dosage de sucres avant et après méthylation. Cette étude a été affinée grâce à la spectroscopie RMN haute résolution. Trois fractions, dont la teneur en arabinose est très importante, ont été isolées. Il s'agit pour la première fraction, d'une arabinane hautement branchée dont la structure proposée ressemble beaucoup à la structure déjà proposée pour une arabinane de l'endosperme des graines de colza [185]. Les deux autres fractions, sont constituées d'une rhamnogalacturonane ayant des chaînes latérales d'arabinanes. Les structures de ces arabinanes sont plutôt habituelles contrairement à la fraction WSF1. Elles sont constituées d'une chaîne principale formée d'unités arabinose liées α -(1→5), sur laquelle vient se greffer en position 2 et/ou 3 une seule unité arabinose.

Cette étude nous a permis aussi de mettre en évidence la présence dans l'endosperme de la graine de deux xylanes. La première est une 4-O-méthyl-glucuronoxylanes fucosylée qui, à notre connaissance, n'avait jamais été isolée d'un végétal. L'unique xylane fucosylée (ayant une structure différente) a été isolée par Aspinall *et coll.* du mucilage de graines de mélisse (*Hyptis suaveolens*) plus connu sous le nom de la ballote odorante [186]. La deuxième xylane est linéaire et non substituée. Ce type de xylane aussi est très rare dans les végétaux. L'unique xylane ayant une telle structure a été isolée des graines du guar [187].

Par ailleurs il nous a été possible à travers cette étude de mettre en évidence l'absence de polysaccharide contenant du mannose. Une situation inhabituelle à laquelle il faudra s'intéresser afin de connaître le mécanisme de biosynthèse et le développement de cet endosperme.

VI. Conclusion générale

L'étude des polysaccharides constitutifs des parois des deux composantes de la graine de la figue de barbarie a révélé la présence dans son endosperme de polysaccharides riche en arabinane. Quant au péricarpe nous avons montré qu'il est composé, du point de vue polysaccharide, uniquement de xylanes et de fibres de cellulose. Ces constituants pourront jouer, avec les huiles, un rôle important dans la valorisation de ces graines. En effet, de par leur teneur importante en xylanes et étant donné la facilité pour les isoler et les purifier, les pépins de la figue de barbarie constituent une source potentielle de xylanes. Elles pourront concurrencer les principales autres sources comme le bois de hêtre ou les tourteaux d'extraction des huiles des coques de maïs ou de tournesol. Elles offrent aussi l'avantage par rapport à ces derniers substrats d'avoir une grande variabilité en taux d'acide ce qui permet de diversifier leurs utilisations.

On pourra énumérer quelques-unes de ces applications des xylanes, en général sous forme de dérivés, qui peuvent aller de l'industrie plastique, de la papeterie à des applications médicales [188-190]. En effet, des dérivés alkyles amphiphiles (1-bromododecane ou paracarboxylbenzène) de xylanes possèdent des propriétés émulsifiantes excellentes, et ils sont largement utilisés dans le domaine agroalimentaire [191-193]. Certains dérivés alkyles triméthylammonium-2-hydroxypropyl (TMAHP), (3-chlorure du chloro-2-hydroxypropyltriméthylammonium (CHMAC)) préparés à partir des xylanes du bois de hêtre sont utilisés comme des additifs dans l'industrie papeterie. Ils améliorent considérablement les propriétés thermomécaniques des pâtes à papier, ainsi que la rétention des éventuels additifs dans le papier tels que les colorants [194-196].

Des xylanes totalement substituées par des groupements carbamates donnent des matériaux thermoplastiques thermostables qui se dégradent à des températures supérieures à 300°C. D'autres dérivés de xylanes comme le 2,3(bis benzyle éther) xylanes, ou d'acides gras peuvent aussi donner des thermoplastiques [189].

Dans le domaine médicale, plusieurs glucuronoxylanes isolées de plantes ont été décrites comme ayant des propriétés immunostimulantes et antiphlogistiques intéressantes [197, 198]. Les 4-O-méthylglucuronoxylanes isolées du hêtre Japonais, par exemple, ont été citées pour inhiber le taux de croissance du sarcome 180 et d'autres tumeurs [199, 200]. Les dérivés carboxyméthylxylanes ont été utilisés pour activer des T-Lymphocytes et des immunocytes impliqués dans l'inhibition de certaines tumeurs.

Des dérivés monoesters phosphates préparés à partir de xylanes possèdent des activités anticoagulantes comparables à celles obtenues pour des polysaccharides naturellement phosphatés. Le dérivé polysulfate pentosane (PSP) habituellement préparé à partir de 4-O-méthyl-glucuronoxylane isolée du bois de hêtre est utilisé en Europe depuis une trentaine d'années comme anticoagulant. Il possède une activité anticoagulante comparable à celle de l'héparine avec moins d'effets secondaires, en particulier les allergies cutanées provoquées par le sel de sodium d'héparine. D'autres activités ont été décrites pour ce dérivé, seul ou associé, comme par exemple des activités anticancéreuses, antivirales et anti-inflammatoires. Le PSP a montré aussi une activité anti-arthritique pour les chiens qui ont de l'arthrose chronique [201].

Par ailleurs le résidu cellulosique après extraction de ces xylanes à partir des graines de la figue de barbarie peut lui avoir des applications intéressantes. En effet, les fibres cellulosiques peuvent être incorporés comme éléments de renfort dans des matières plastiques à l'instar d'autres fibres, dans la mesure où elles ont un facteur de forme (Longueur/largeur) intéressant.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA PELURE DE LA FIGUE DE BARBARIE

I. Introduction

La pelure du fruit constitue le deuxième sous produit généré par les diverses transformations industrielles de la figue de barbarie auquel il faudra s'intéresser.

Lorsque l'on envisage la valorisation de la peau d'un fruit, la première idée qui vient à l'esprit est de l'extraction des pectines à l'instar des pelures des agrumes. Ceci est également vrai dans le cas de la pelure du fruit du figuier de barbarie. En effet, les premiers essais d'extraction des pectines de la pelure de la figue de barbarie ont révélé la richesse de cette pelure en pectines. Néanmoins, elles ont été abandonnées en raison d'un pouvoir gélifiant médiocre. Par la suite les études se sont orientées vers leur incorporation comme adjuvants dans des médicaments afin d'exploiter les propriétés hypoglycémiantes et d'élimination du cholestérol et des triglycérides dans le sang que possèdent ces pectines [202-204]. En effet, le taux de réduction du cholestérol dans le sang peut atteindre jusqu'à 25% en utilisant des pectines de la figue de barbarie alors qu'il est en moyenne de 15 % pour les pectines d'autres sources. Des préparations pharmaceutiques à base de pectines de la figue de barbarie comme étant des composés hémostatiques dans les formulations des capsules des médicaments, ainsi que dans la composition des produits diététiques ont vu le jour.

Selon plusieurs auteurs les pectines du figuier de barbarie ne possèdent pas de propriétés gélifiantes excellentes. Mais bien que la structure secondaire des pectines soit déterminante dans le processus de gélification, aucune étude structurale des pectines de la pelure du figuier de barbarie n'est citée dans la littérature. Ainsi notre objectif principal a été d'élucider leur composition et leur structure chimique afin de comprendre pourquoi ces pectines ont un faible pouvoir gélifiant. Nous avons étendu l'étude aux autres polysaccharides pariétaux tant hémicellulosiques que celluloses. Par ailleurs alors que les données bibliographiques sur les pectines du figuier de barbarie sont peu nombreuses, elles sont inexistantes en ce qui concerne les autres polysaccharides. Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la caractérisation des divers polysaccharides pariétaux de la pelure de la figue de barbarie.

II. Étude préliminaire

II.1. Récolte et échantillonnage

Notre travail a été réalisé sur la pelure des fruits de l'*Opuntia ficus-indica*. Ces fruits ont été récoltés en fin de maturité et sélectionnés de façon à ne retenir que les fruits sains dont la peau n'était pas endommagée.

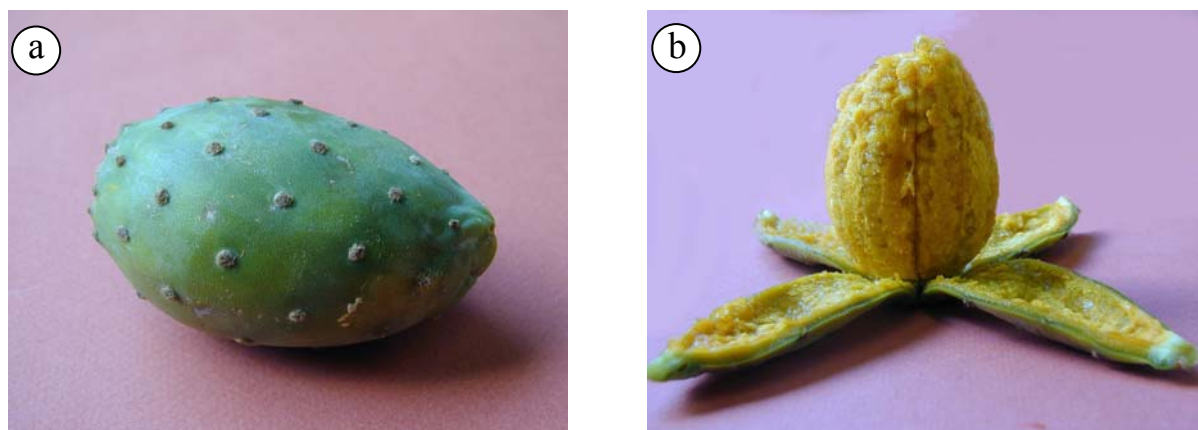


Figure III. 1: Fruit du figuier de barbarie (a) et fruit épluché (b)

Les fruits choisis sont verdâtres, de forme ovale (Figure III.1) et leur poids oscille entre 75g et 85g. Ces fruits ont été épluchés et la pelure, qui constitue entre 35 et 40 % du poids total du fruit frais, a été par la suite séchée dans une étuve ventilée à 50°C. La teneur en eau varie entre 85-88 % par rapport au poids total de la pelure fraîche pour les échantillons étudiés (Tableau III.1).

Tableau III. 1: Récapitulatif du poids, siccité et pourcentages en pelure des fruits

| Échantillon | Poids du fruit (g) | Poids sec du fruit (g) | Pourcentage de la pelure* |
|-------------|--------------------|------------------------|---------------------------|
| Lot 1 | 85.46 | 15.38 | 26 % |
| Lot 2 | 75.25 | 15.05 | 22 % |
| Lot 3 | 75.60 | 15.12 | 25 % |
| moyenne | 78.77 | 15.18 | 24,3 % |

* en masse par rapport au fruit sec

II.2. Composition chimique

La composition chimique d'un végétal varie selon les espèces et au sein même d'une espèce. Elle dépend des conditions de culture (qualité du sol, climat, irrigation, traitements...), et de la période de récolte (précoce ou tardive). Dans un premier temps, nous avons déterminé le pourcentage en matières minérales (cendres), en graisses et cires, en

protéines et en lignine. Ces substances sont, en plus des polysaccharides, omniprésentes dans les parois végétales en quantités plus au moins importantes. Dans un second temps et en vue d'avoir un ordre d'idée sur la distribution en composition polysaccharidique, nous avons soumis notre matériau dégraissé à une succession d'extractions permettant de solubiliser les polysaccharides non cellulosiques. Le bilan pondéral de ces extractions nous a permis de compléter la composition chimique de notre matériau. Un dosage de sucre neutres et acides constitutifs a été aussi réalisé. Nous récapitulons dans le tableau III.2 les résultats obtenus.

Tableau III. 2: Composition moyenne et sucres constitutifs de la pelure du fruit de la figue de barbarie

| Constituants | Pourcentage* | | | | | |
|------------------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|------|
| Cires | 9-11 | | | | | |
| Minéraux (cendres) | 7-8 | | | | | |
| Lignine Klason | 2-3 | | | | | |
| Protéines (N×6,25) | 8-10 | | | | | |
| Cellulose | 27 | | | | | |
| Autres polysaccharides | 40-45 | | | | | |
| Sucres neutres et acides :* | | | | | | |
| AU | Rha | Ara | Xyl | Man | Gal | Glu |
| 35.6 | 3.3 | 9.3 | 4.5 | 1.6 | 8.4 | 29.3 |

* en poids par rapport à la masse sèche

II.3. Conclusion

A la vue de ces résultats, nous constatons que la pelure du fruit du figuier de barbarie est constituée majoritairement de polysaccharides surtout pectiques et cellulosiques. Elle contient aussi mais en moindre proportion des cires, des minéraux, des protéines et de la lignine. Comme pour toutes les parois végétales de nature pecto-cellulosique, le dosage des sucres neutres et acides laisse apparaître une grande prédominance de glucose provenant de la cellulose et d'acides uroniques, en particulier galacturonique constituant principal des substances pectiques. D'autres sucres toujours présents chez les dicotylédones à parenchyme sont détectés en quantité plus au moins importantes dans la pelure du figuier de barbarie.

III. Étude morphologie

Afin de caractériser la nature, la constitution et l'organisation cellulaire au sein de la pelure du fruit du figuier de barbarie nous avons réalisé une caractérisation morphologique par microscopie des différents tissus au niveau de la pelure.

Des échantillons ont été découpés dans la pelure des fruits frais, et déshydratés par la méthode du point critique (protocole expérimental V.2) après fixation au glutaraldéhyde afin de préserver, sans modification, les tissus dans leur état natif.

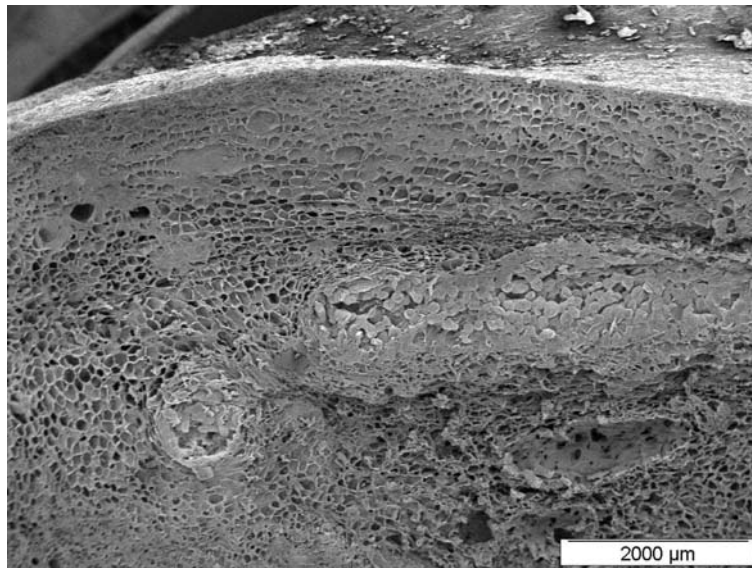


Figure III. 2: Coupe transversale de la pelure du fruit du figuier de barbarie : Vue de l'ensemble (MEB)

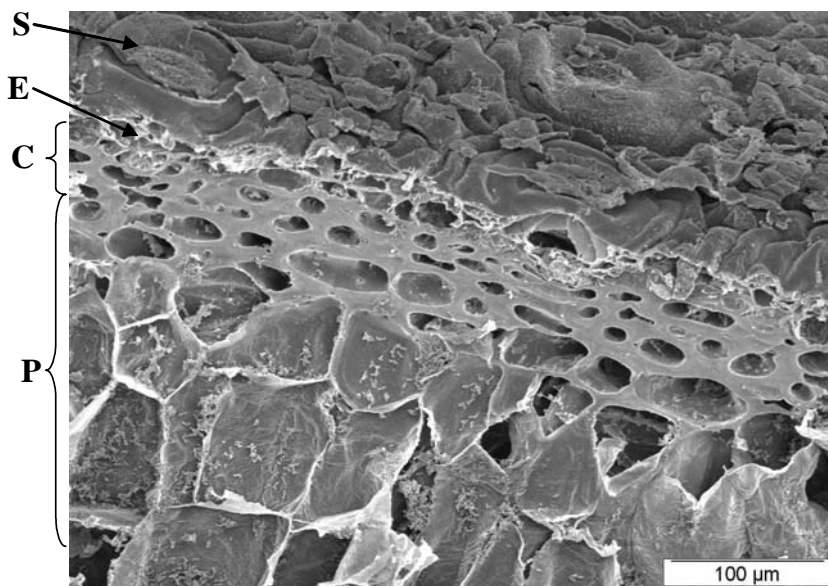


Figure III. 3: Coupe transversale de la pelure du fruit du figuier de barbarie : S : stomate, E : épiderme, C : cellules de collenchyme, P : cellules de parenchyme (MEB)

L'observation au microscope électronique à balayage (MEB) d'une coupe transversale de la pelure du fruit (Figure III.3) permet de différencier trois types de tissus :

- L'épiderme : le tissu de revêtement primaire, réduit à une seule assise de cellules à paroi cellulosique. Il est protégé par une mince cuticule imperméable de nature lipidique interrompue par endroits par des ouvertures appelées stomates (Figure III.4). Ces stomates assurent les échanges gazeux avec le milieu externe et régulent la transpiration des organes [100, 205, 206].

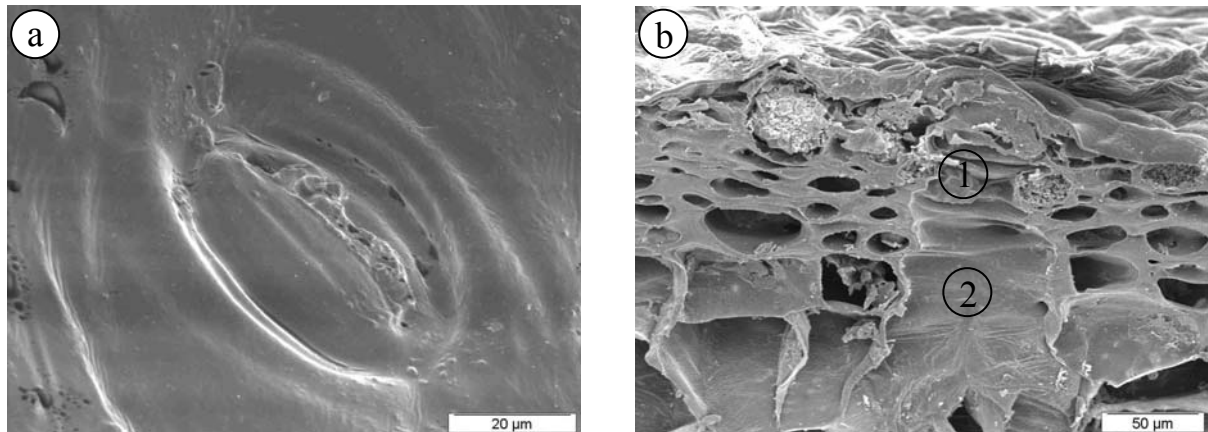


Figure III. 4: (a) : vue de surface d'un stomate ; (b) : coupe transversale d'un stomate : (b-1) : Ostiole, (b-2) : chambre sous-stomatique (MEB)

La surface externe de l'épiderme présente par endroits des aréoles qui sont constituées de plusieurs glochides à parois fine de nature cellulosique (Figure III.5-a) et de petits aiguillons (Figure III.5-b).

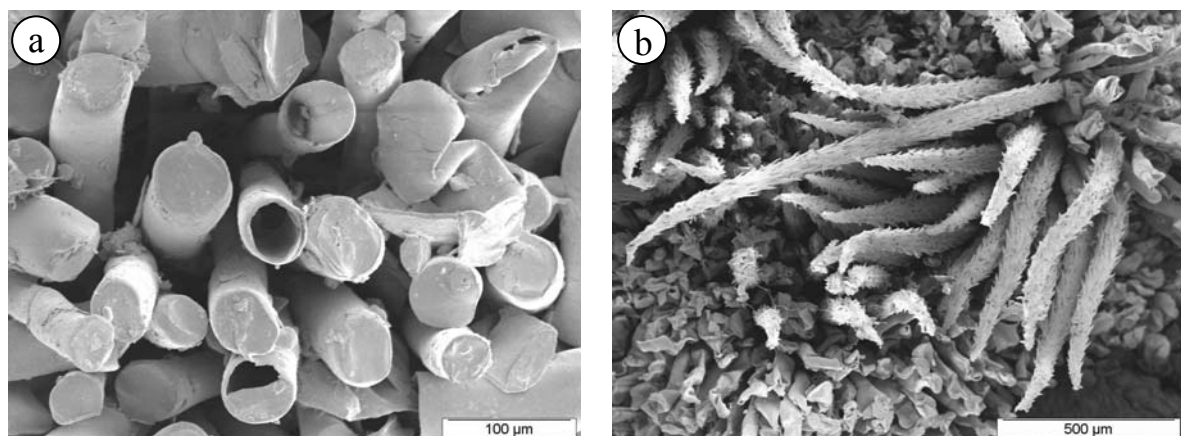


Figure III. 5: Photographie au niveau d'une aréole où on distingue (a) : les glochides et (b) : les aiguillons (MEB)

- Le collenchyme : ce sont des cellules à paroi cellulosique très épaisse et très riche en polysaccharides de nature pectique et hémicellulosique. Ceci leur confère une très

grande plasticité, et leur permet de jouer un rôle de soutien. Le collenchyme se forme dans les organes jeunes en croissance, aériens essentiellement. C'est un tissu vivant dont les parois sont épaissies par un dépôt de cellulose, ce qui confère à la plante une grande résistance à la flexion et à la traction, une élasticité et une certaine souplesse [100, 205, 206]. Ces cellules sont situées en anneaux ou en îlots sous l'épiderme. Elles sont remplies d'une substance visqueuse appelée mucilage (Figure III.6). Ces cellules mucilagineuses sont communes dans beaucoup de cactacées, et semblent jouer un rôle clé dans l'aptitude à retenir l'eau chez les plantes.

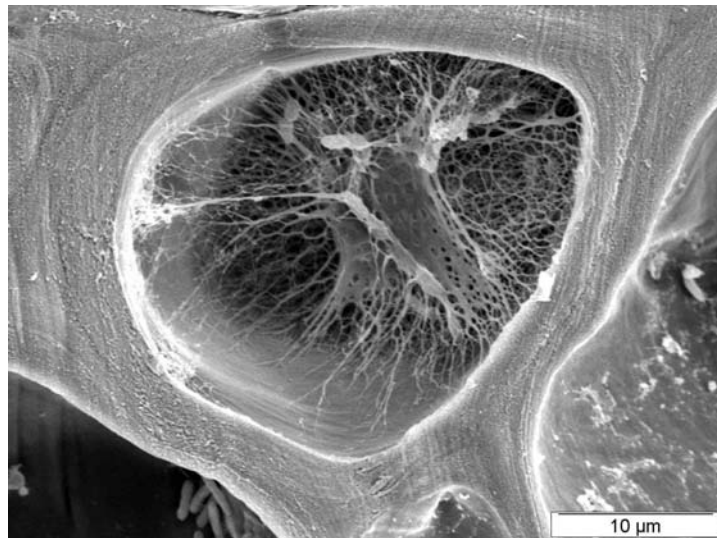


Figure III. 6 : Coupe transversale d'une cellule de collenchyme (MEB)

- Le parenchyme : c'est le tissu cellulaire le plus abondant. Il est constitué de cellules à paroi cellulaire mince. On distingue nettement deux types de parenchyme : le parenchyme dit de réserve (Figure III.7-a) et le parenchyme aquifère (Figure III.7-b) caractéristique des plantes succulentes [100, 205, 206]. Ce dernier apparaît sous forme de poche. Les réserves d'eau sont contenues dans ce type de parenchyme, on le rencontre en abondance à l'interface avec la pulpe de fruit. Les espaces délimitant les cellules de parenchyme sont appelés méats ou lacunes selon leur taille.

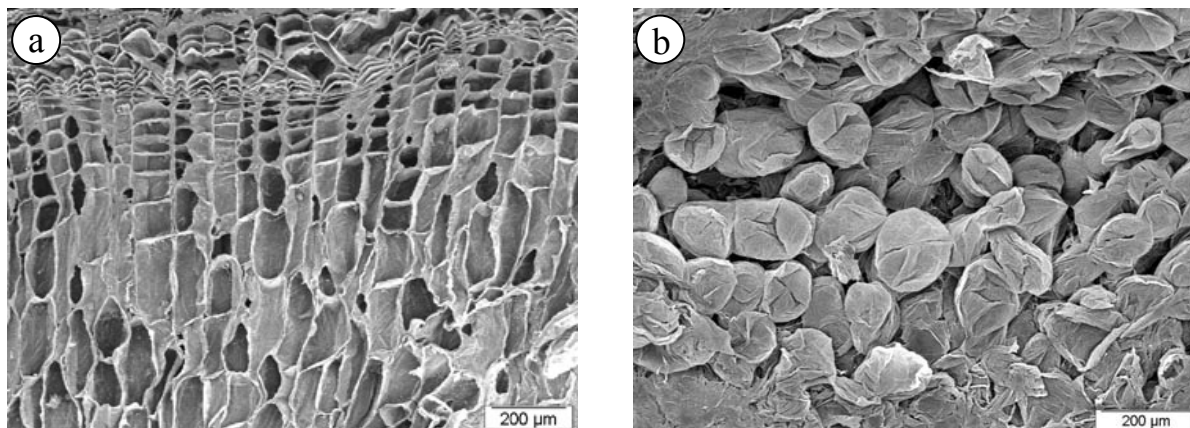


Figure III. 7: Cellules de : (a) parenchyme de réserve, (b) parenchyme aquifère (MEB)

Conclusion

Les différentes observations microscopiques nous ont permis d'avoir une idée sur les types de cellules, leur organisation au sein de la pelure, les différents types de paroi cellulaires constitutives et leur abondance relative. Nous constatons qu'il s'agit en majorité de tissus à cellules parenchymateuses à parois très minces. L'épaisseur de ces parois est de l'ordre de 0,2 µm. Ces cellules sont de forme isodiamétriques, ovoïdes, ou allongées plus ou moins arrondies. Leur taille varie entre 25 et 80 µm. On rencontre aussi, en anneaux sous l'épiderme, des cellules de collenchymes à paroi cellulosique très épaisse (5-7 µm), mais très élastique et normalement riches en pectines. Ces cellules sont ovoïdes arrondies et leur diamètre est de l'ordre de 30 µm.

IV. Extraction des polysaccharides pariétaux

La paroi cellulaire végétale joue un rôle fondamental tant dans le contrôle de la croissance et de la morphogenèse des végétaux que dans la résistance de ces derniers aux organismes pathogènes. Cette diversité de fonctions de la paroi trouve son origine dans l'extraordinaire complexité de ses composants, majoritairement de nature polysaccharidique.

Qualitativement, les dicotylédones à parois cellulosique primaires possèdent chimiquement les mêmes constituants polysaccharidiques avec cependant des différences dans leurs proportions relatives. Les parois végétales à tissus parenchymateux sont constituées essentiellement de microfibrilles de cellulose, de pectines et en moindres proportions d'hémicelluloses.

Nous allons nous intéresser à l'extraction, la purification et la caractérisation des polysaccharides pariétaux de la pelure du figuier de barbarie.

IV.1. Extraction séquentielle des polysaccharides

Les parois primaires constituées de cellules de parenchymes ont une architecture relativement lâche. C'est pourquoi les modes opératoires mis au point pour l'extraction des polysaccharides constitutifs font appel à des méthodes chimiques douces. Le fractionnement que nous avons adopté pour l'extraction des polysaccharides pariétaux de la pelure du figuier de barbarie est une extraction chimique en trois grandes étapes distinctes :

1. Solubilisation du mucilage qui est réalisé par une extraction par l'eau à température ambiante.
2. Solubilisation des pectines qui est réalisée par des extractions successives par l'eau, un agent chélatant et une solution d'acide chlorhydrique diluée.
3. Extraction, par une solution alcaline des hémicelluloses, et obtention d'un résidu insoluble de nature cellulosique.

IV.1.1. Extraction du mucilage

Le mucilage d'origine végétale est constitué de polysaccharides dont les compositions et les structures chimiques sont très différentes selon les espèces. Il est caractérisé par une bonne solubilité dans l'eau c'est pourquoi la plupart des extractions se font avec de l'eau, généralement à température ambiante et parfois légèrement acidifiée (acide acétique). L'augmentation de la température favorise le rendement et la vitesse de l'extraction, mais peut entraîner avec le mucilage, les pectines hautement méthylées qui pourraient exister.

Le mucilage de la pelure du figuier de barbarie a été extrait, à partir du résidu dégraissé par l'eau à température ambiante et purifié par précipitation dans l'éthanol (Figure III.8). La fraction est désignée MP (Mucilage Polysaccharide).

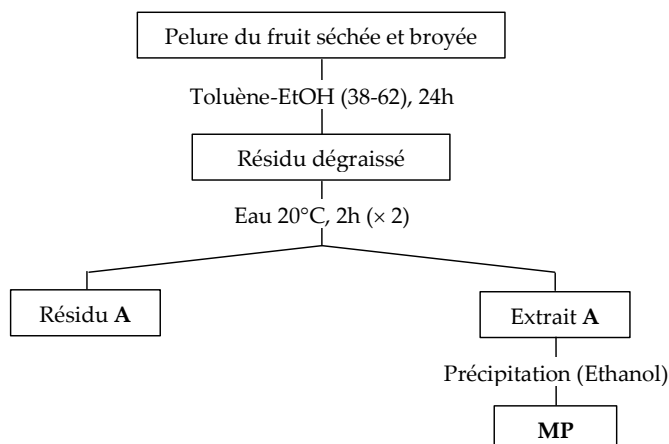


Figure III. 8 : Schéma d'extraction du mucilage de la pelure du fruit du figuier de barbarie

IV.1.2. Extraction des polysaccharides pectiques

Il s'agit d'extractions successives de manière à épuiser le matériau de tous les polysaccharides pectiques. De ce fait, les pectines sont extraites à chaud séquentiellement avec de l'eau, un agent chélatant du Ca^{2+} et l'acide chlorhydrique, comme indiqué sur la figure III.9.

Ainsi le résidu A de l'étape précédente est soumis à une extraction par l'eau à 60°C au cours de deux cycles de 2 heures. Après précipitation par l'éthanol et dialyse contre de l'eau distillée, on obtient la fraction notée WSP (Water Soluble Polysaccharide).

Parmi les agents chélatant du Ca^{2+} , l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) a été choisi dans notre schéma d'extraction. Ce dernier offre l'avantage de ne pas relarguer les ions Ca^{2+} dans la solution après retour à température ambiante. En effet, les ions Ca^{2+} libres risqueraient de former des agrégats insolubles par pontage entre les chaînes polygalacturoniques (egg-box). Le résidu est ainsi traité par une solution d'EDTA 0.7% à 60°C pendant deux cycles de 2 heures. Chaque extraction est suivie d'une filtration et d'un lavage à l'eau chaude. Les filtrats sont traités par l'éthanol en vue de précipiter les extraits. Les précipités récupérés sont dialysés et lyophilisés, ils constituent la fraction CSP (Chelating Soluble Polysaccharide). Un traitement par une solution d'acide chlorhydrique (HCl, 0.05M), pendant deux cycles d'une heure chacun à 80°C , permet l'extraction des polysaccharides de nature pectique fortement liés aux microfibrilles de cellulose. Ainsi les protopectines intimement associées à la paroi végétale sont extraites et un résidu dépourvu de pectines est récupéré. La fraction extraite à l'acide est précipitée à l'éthanol et dialysée contre l'eau distillée. Elle est désignée ASP (Acid Soluble Polysaccharide).

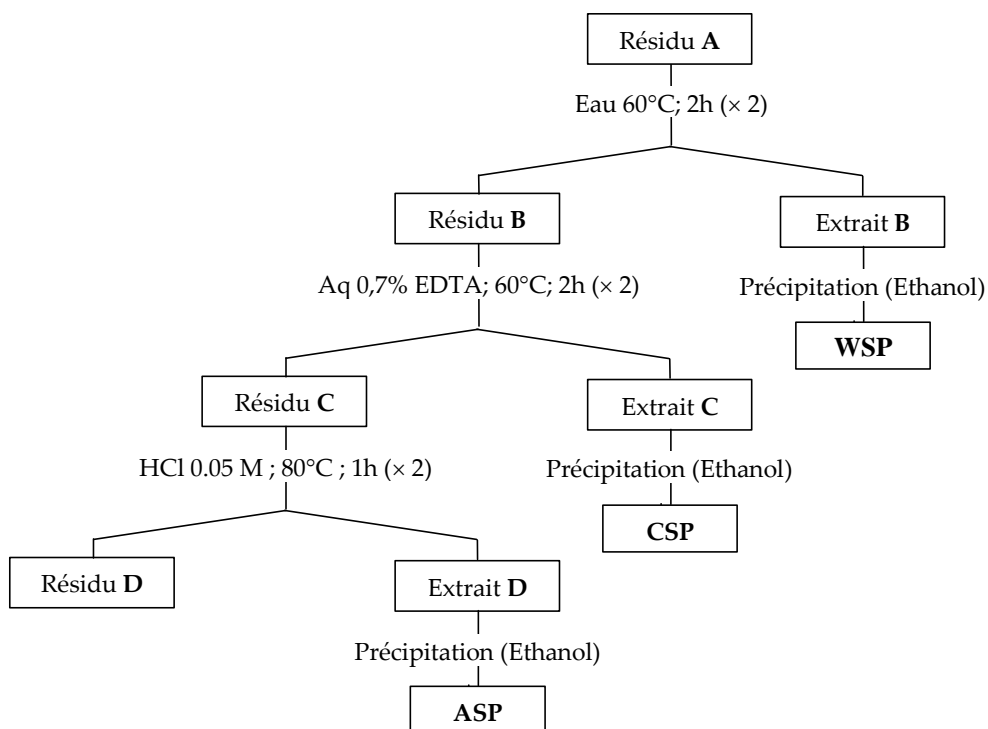


Figure III. 9 : Schéma d'extraction des pectines de la pelure du fruit du figuier de barbarie

IV.1.3. Extraction des hémicelluloses

D'une façon générale et comme il a été mentionné précédemment, les hémicelluloses sont solubilisés par des solutions alcalines. On peut utiliser des solutions de soude ou de potasse de concentrations croissantes, mais la soude permet de mieux solubiliser les hémicelluloses que la potasse, d'où son choix dans notre schéma d'extraction. L'augmentation de la concentration en soude ou/et de la température favorise le rendement et la vitesse de l'extraction. Mais une forte augmentation de la concentration risque de provoquer une transformation allomorphique de la cellulose I en cellulose II. Dinand *et coll.*, en purifiant les microfibrilles de cellulose issues de la pulpe de betterave de morphologie et composition cellulaire semblables à celles de la pelure du figuier de barbarie, ont constaté qu'une concentration en soude de 2% (p/v) était suffisante pour éliminer les hémicelluloses. La mercerisation pour ces microfibrilles de cellulose n'a été observée qu'à une concentration de 8 à 9% en soude [158]. Nous avons donc adopté le même protocole pour extraire les hémicelluloses de la pelure du figuier de barbarie. Le résidu dépectiné (résidu D) est donc traité par une solution de soude (NaOH, 0.5M) à 80°C, au cours de deux cycles de 2 heures. Les extraits alcalins réunis sont neutralisés par l'acide acétique 20 % (v/v). L'addition de

l'éthanol en excès dans le surnageant permet de précipiter les polysaccharides (Figure III.10). La fraction récupérée est désignée SSP (Soda Soluble Polysaccharide).

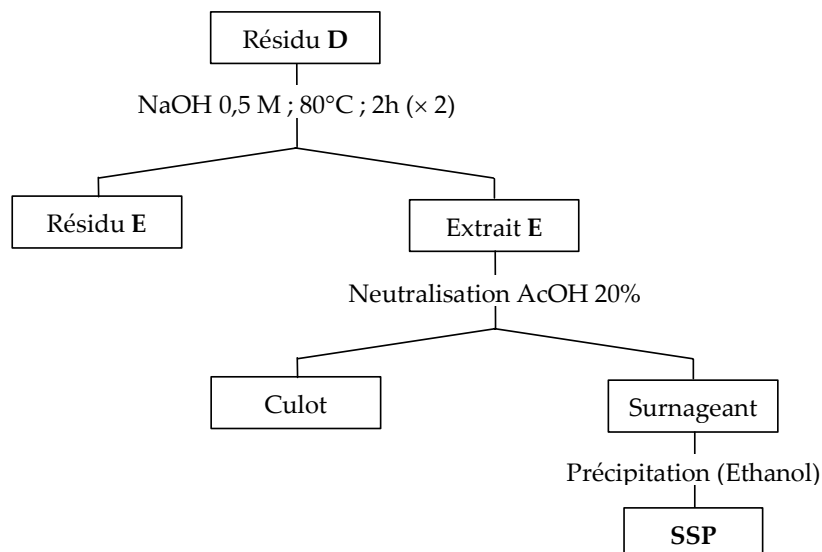


Figure III. 10 : Schéma d'extraction des hémicellulose de la pelure du fruit du figuier de barbarie

IV.1.4. Blanchiment de la paroi cellulaire

Le résidu insoluble de couleur marron, en principe constitué essentiellement de cellulose, est soumis à un blanchiment au chlorite de sodium, dans un tampon acétique (pH=4.8), à 70°C pendant deux cycles de deux heures. Chaque cycle est suivi d'une filtration et d'un lavage à l'eau distillée des parois de cellules blanchies. Le résidu final est noté CR (Cellulosic Residue).

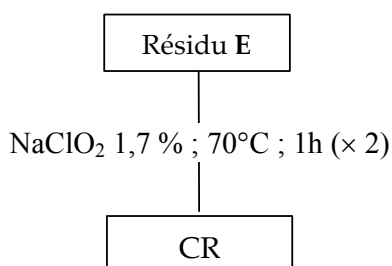


Figure III. 11 : Etape de blanchiment du résidu final de la pelure du fruit du figuier de barbarie

IV.2. Efficacité des extractions

L'avancement de l'extraction des polysaccharides peut être suivi quantitativement par analyse chimique ou par spectroscopie infrarouge.

IV.2.1. Par spectroscopie infrarouge

L'infrarouge est une technique d'une grande simplicité et facile à mettre en œuvre qui nécessite peu de matériau. Certains polysaccharides pariétaux possèdent dans leur structure certains groupements caractéristiques qui peuvent être mis en évidence assez facilement par spectroscopie infrarouge (Tableau III.3). Les groupements carboxyles de l'acide galacturonique, qui est le constituant principal des pectines, constituent un bon marqueur caractéristique de la présence des polysaccharides pectiques. Ces groupements donnent, en infrarouge, des bandes très différenciées de celles des autres groupements présents dans la cellulose ou les hémicelluloses.

La détection par infrarouge des hémicelluloses dans le résidu cellulosique n'est pas toujours évidente. Ces derniers sont généralement dépourvus ou renferment de faibles quantités de groupements permettant de les différencier de la cellulose.

Ainsi au fur et à mesure des traitements, on peut suivre l'évolution de certaines de ces bandes caractéristiques reportés dans le tableau III.11. Nous avons reportés sur la figure III.12 les spectres d'absorption infrarouge de quelques résidus d'extractions.

Tableau III. 3 : Attribution des principales bandes observées sur les spectres IR pour les polysaccharides

| Vibration | Attribution | Fréquence en cm^{-1} |
|--|--------------------------------------|-------------------------------|
| VOH | Polysaccharides et eau d'hydratation | 3370 |
| ν_{CH} et ν_{CH_2} | Polysaccharides | 2918 et 2850 |
| $\nu_{\text{C=O}}$ | Esters et acides | 1730 |
| Liaisons hydrogène et eau adsorbée | | 1650 |
| $\delta_{\text{C-H}}$ et δ_{CH_2} et $\delta_{\text{O-H}}$ | Polysaccharides | 1430-1200 |
| $\nu_{\text{C-C}}$ et $\nu_{\text{C-O}}$ | Polysaccharides | 1160-1000 |

Si l'on compare les différents spectres, on peut observer dans le cas du résidu dégraissé qui constitue le matériau de départ, la présence d'une bande très intense aux environs de 1730 cm^{-1} qui correspond à la bande d'élongation de la liaisons C=O des acides et des esters. Cette bande peut être attribuée aux oses acides estérifiés ou non que l'on retrouve surtout dans les pectines et en moindres proportions dans les hémicellulose. L'infrarouge ne permet

pas de différencier l'origine de ces groupements. De ce fait, l'élimination du mucilage, qui peut être assimilé à un hémicellulose, n'affecte ni l'allure ni les intensités des bandes. Cependant, on observe une disparition progressive de la bande à 1730 cm^{-1} au cours des étapes de l'extraction des pectines ce qui traduit l'élimination des pectines au cours du traitement. On constate de même la présence de cette bande dans le résidu après l'étape de dépectination, ce qui est dû à la présence des hémicelluloses acides ou de pectines résiduelles dans le résidu D. Après l'extraction à la soude, on remarque une disparition quasi complète de cette bande. L'eau absorbée est à l'origine de la petite bande observée à 1660 cm^{-1} dans le résidu E de l'extraction alcaline (Figure III.12).

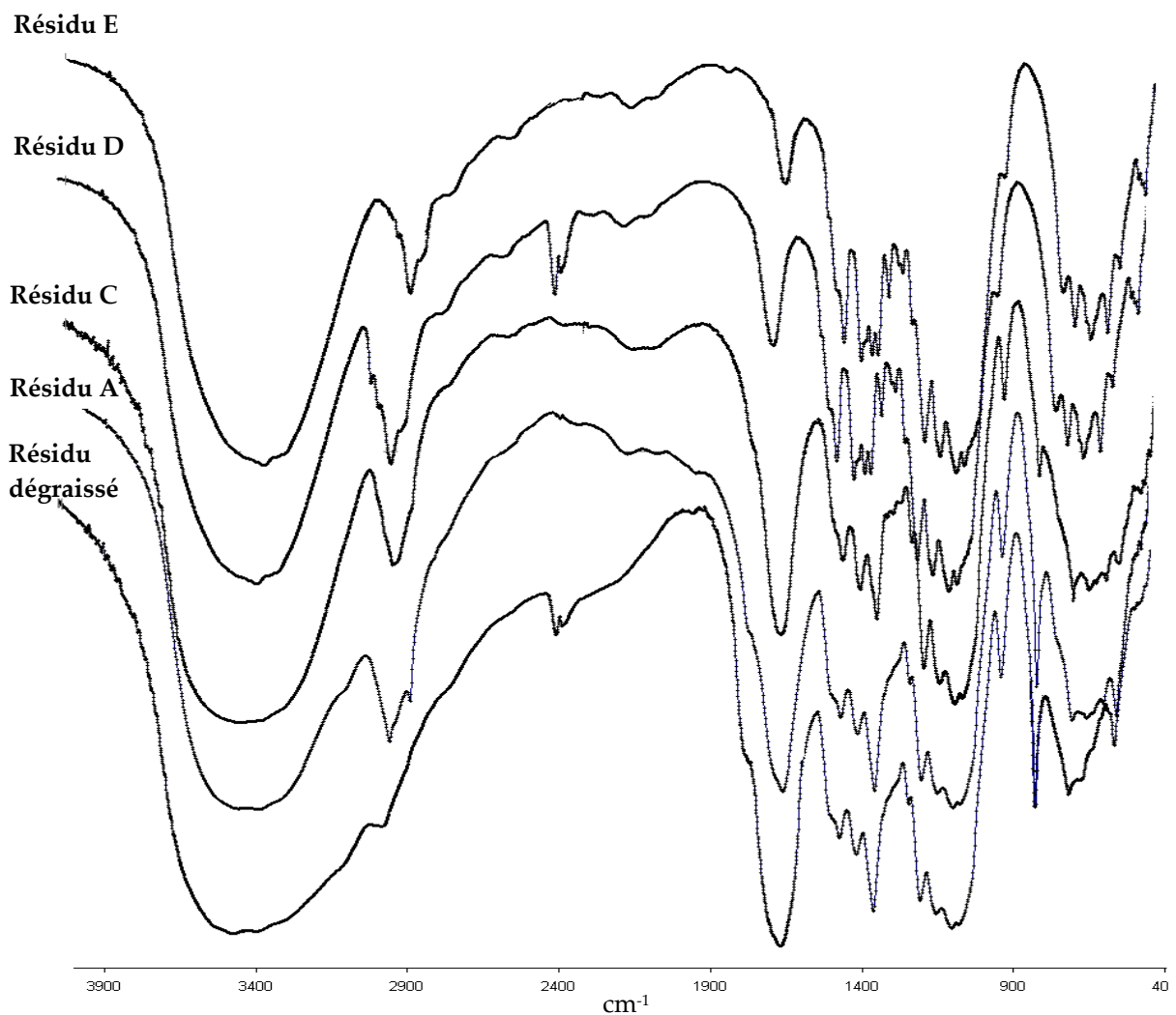


Figure III. 12 : Spectres d'adsorption infrarouge des résidus après différentes étapes d'extraction

IV.2.2. Par analyse chimique

Les constituants de base des parois végétales ainsi que des différents extraits sont des oses neutres ou/et acides. Les pectines sont constituées essentiellement de l'acide galacturonique tandis que les hémicelluloses renferment des oses neutres et des acides uroniques. La cellulose est constituée uniquement de glucose. Après avoir donné la composition de notre matériau de départ, il est intéressant d'établir un bilan analytique permettant de suivre la composition en oses neutres et en acides uroniques des résidus à chaque étape d'extraction. Par ailleurs, les variations des teneurs en ces sucres au cours des différentes étapes du processus de l'extraction permettent de contrôler l'efficacité des traitements. Ces teneurs sont déterminées par dosage quantitatif des sucres constitutifs de chaque résidu. Nous récapitulons dans le tableau III.4 les résultats des dosages de sucres des résidus après les différentes étapes d'extraction.

Tableau III. 4 : Composition en sucres neutre et acides uroniques des résidus après les différentes étapes d'extraction

| Résidu | Sucres neutres et acides (% massique) | | | | | | |
|------------------|---------------------------------------|-----|-------|------|--------|-------|------|
| | AU | Rha | Glc | Gal | Ara | Xyl | Man |
| Résidu dégraissé | 35.6 | 3.3 | 29.3 | 8.4 | 12.3 | 4.5 | 1.6 |
| Résidu A | 41.2 | 4.5 | 30 | 5.2 | 9.2 | 6.5 | 2.4 |
| Résidu D | 19.80 | 8.5 | 68.80 | 2.25 | traces | 22.90 | 1.13 |
| Résidu E | 0.91 | — | 92.80 | 2.25 | traces | 4.90 | 2.2 |

IV.2.3. Conclusion

Le dosage des sucres neutres et des sucres acides permet de suivre l'extraction des différents polysaccharides. Les résultats des dosages permettent d'observer une diminution des teneurs en galactose et arabinose après élimination du mucilage. Cependant, ce n'est qu'après la solubilisation des pectines que l'on constate la disparition du galactose et de l'arabinose. Par ailleurs on constate une diminution des sucres acides et une augmentation du glucose dans le résidu D. Cependant, une teneur importante en sucres acides est décelée après l'étape d'extraction des pectines. La présence d'acides uroniques à ce stade de l'extraction suggère la présence d'un polymère acide intimement associé à la cellulose de nature pectique ou hémicellulosique. Cette teneur en sucre acide chute après le traitement alcalin, et une diminution des pourcentages en xylose et rhamnose est constatée. Cette évolution dans

la composition des différents résidus atteste de l'efficacité des extractions. On part d'un matériau de nature pecto-cellulosique pour récupérer après les différentes extractions un résidu cellulosique.

IV.3. Bilans et rendements des extractions

La séquence de traitement adoptée pour l'extraction des polysaccharides de la pelure du fruit de *l'opuntia ficus-indica* nous a permis de les fractionner en quatre principaux groupes à savoir : mucilage, pectines, hémicelluloses et cellulose. Le tableau ci-contre regroupe les rendements des différentes étapes d'extraction :

Tableau III. 5: Rendement des différentes fractions extraites

| Fraction | Rendement (%) * |
|-----------------------------------|-----------------|
| Mucilage (MP) | 4.5 |
| Pectique : extraite à l'eau (WSP) | 6.5 |
| extraite à l'EDTA (CSP) | 12 |
| extraite à l'acide (ASP) | 8 |
| Hémicellulosique (SSP) | 5.8 |
| Cellulosique (CR) | 25 |

* en poids par rapport à la matière sèche

Ces quatre principaux groupes de polysaccharide de la pelure de la figue de barbarie sont récupérés dans des quantités différentes. Le mucilage est récupéré avec un rendement de 4.5% par rapport à la matière sèche totale, et un rendement de 8% par rapport à l'ensemble des polysaccharides. La fraction pectique est la plus importante. Son pourcentage est de 26,5 % par rapport à la matière sèche, ce qui correspond à 43 % du total des polysaccharides pariétaux. Elle est constituée de trois sous fractions extraites successivement à l'eau, à l'EDTA et à l'acide qui représentent 25, 45 et 30 % respectivement par rapport à l'ensemble de la fraction pectique soit 11, 19 et 13 % par rapport au total des polysaccharides. Le pourcentage des hémicelluloses est très faible par rapport aux autres fractions, 5.8 % par rapport à la matière sèche qui correspond à 9% de l'ensemble de fractions isolées. La fraction cellulosique occupe le deuxième rang du point de vue pondéral, et représente 25 % de la matière première de départ soit 40 % de l'ensemble des polysaccharides.

Ces résultats mettent en évidence que la figue de barbarie est constituée essentiellement de pectines et de cellulose. Les hémicelluloses sont en moindres proportions

comme c'est le cas de la plupart des dicotylédones à paroi primaire parenchymateuse.

IV.4. Caractérisation des différents extraits

Les différentes fractions isolées sont de nature osidique. Nous avons déterminé la composition en oses neutres et acides uroniques de ces différentes fractions. Les résultats obtenus pour les différents extraits ainsi que la composition du matériau de départ sont reportés dans le tableau III.6.

Tableau III. 6: Composition en sucres neutres et acides des différents extraits de la pelure du fruit du figuier de barbarie

| Fraction | Sucres neutres et acides (% massique) | | | | | | |
|------------------|---------------------------------------|------|--------|--------|--------|------|-----|
| | AU | Rha | Glc | Gal | Ara | Xyl | Man |
| Résidu dégraissé | 35.6 | 3.3 | 29.3 | 8.4 | 12.3 | 4.5 | 1.6 |
| MP | 14.2 | 4.2 | 1.5 | 23.5 | 32.7 | 4.5 | – |
| WSP | 52.0 | 1.4 | 3.3 | 10.8 | 14.2 | 0.9 | 0.5 |
| CSP | 64.5 | 3.7 | traces | 4.0 | 17.2 | 0.9 | – |
| ASP | 50.7 | 12.5 | 2.9 | 10.8 | 1.2 | 0.8 | – |
| SSP | 49.4 | – | 0.9 | traces | 1.3 | 36.6 | – |
| CR | 0.91 | – | 92.80 | 2.25 | traces | 4.90 | 2.2 |

On constate, d'après ces résultats, que chaque groupe se caractérise par la prédominance d'un ou deux oses. La fraction extraite avec l'eau à température ambiante ou mucilage est riche en arabinose et en galactose. Elle renferme mais en faibles quantités des sucres acides et d'autres oses neutres. Cette distribution laisse prévoir la présence d'un polysaccharide type arabinogalactane dans cet extrait. Les trois fractions pectiques, comme attendu, sont majoritairement composées de sucres acides qui représentent entre 50.7 à 64.5 %. Les sucres neutres, habituellement retrouvés dans les substances pectiques sont à des teneurs plus au moins variables. Ainsi, la fraction extraite à l'eau (WSP) est caractérisée par la présence notable à la fois d'arabinose et de galactose. Cependant, les fractions extraites à l'EDTA (CSP) et à l'acide (ASP) contiennent respectivement de l'arabinose et du galactose en quantités importantes par rapport au reste des sucres neutres. Ces distributions laissent supposer l'existence de chaînes latérales riches en arabinose et galactose (arabinanes, galactanes ou arabinogalactanes) couramment rencontrées dans les pectines. Habituellement

ces chaînes latérales sont portées par le squelette rhamnogalacturonane, plus précisément par la position O-4 du rhamnose. Cependant, le rhamnose n'a été détecté qu'en faible quantité. Ceci est dû à la résistance des liaisons alduroniques qui lient un acide uronique à un sucre neutre en particulier dans l'unité répétitive d'une rhamnogalacturonane [GalA→Rha], dans les conditions d'hydrolyse. Dans la fraction extraite à la soude (SSP), on peut observer la présence d'une quantité importante de xylose (46%). La teneur assez élevée en sucre acide dans cette fraction est probablement due à l'existence d'une xylane acide. La prédominance de glucose dans le résidu final CR (92.80 %) affirme sa composition cellulosique.

V. Etude du mucilage

Les mucilages sont des polysaccharides, de structure chimique parfois très complexe, que l'on rencontre dans plusieurs plantes supérieures. Ils trouvent beaucoup d'applications dans les domaines alimentaire et pharmaceutique pour leurs propriétés émulsifiantes. Ils ont été isolés et étudiés dans le cas de plusieurs espèces végétales. D'un point de vue composition chimique, ils renferment en général des oses neutres et sont caractérisés par la prédominance d'un ou deux oses neutres mais rarement plus. Ils peuvent contenir en quantité plus au moins importante des sucres acides uroniques (galacturonique, glucuronique et/ou 4-O-Me-glucuronique) [207]. Parmi les mucilages largement étudiés, on peut citer à titre d'exemple, le mucilage isolé des graines de moutarde qui est riche en glucose et galactose, à la différence de celui issu de la gomme arabique qui contient surtout de l'arabinose ou encore le mucilage extrait des pépins de coing qui renferme uniquement du xylose et de l'acide 4-O-méthylglucuronique.

Les plantes succulentes, en particulier les cactacées, sont caractérisées par la présence de cellules mucilagineuses qui semblent jouer un rôle physiologique important dans leur faculté de rétention de l'eau. Pour la famille des cactacées, le mucilage produit par ces cellules est riche en galactose et en arabinose. Quant aux proportions et au reste de la composition en sucres, de grandes différences ont été constatées entre les divers genres et sous-genres appartenant à cette famille [208, 209]. Le mucilage du genre *Opuntia*, auquel on attribue des propriétés rhéologique et pharmaceutique très intéressantes, a été étudié pour plusieurs espèces de ce genre, et des résultats contradictoires ont été constatés tant du point de vue composition que structure. Ainsi, plusieurs auteurs l'ont considéré comme étant un

polysaccharide neutre dépourvu de tout résidu uronique et ne contenant que le galactose et l'arabinose. D'autres l'on cité comme étant un polysaccharide acide ayant un squelette identique à une rhamnogalacturonane renfermant, en plus de l'acide galacturonique et du rhamnose, du galactose et de l'arabinose.

Le mucilage de l'espèce *Opuntia ficus-indica*, extrait essentiellement des cladodes, a aussi suscité beaucoup d'intérêt scientifique pour ses propriétés pharmaceutiques et rhéologiques [210-213]. De point de vue structure chimique, il a fait l'objet de plusieurs études aux résultats contradictoires. Toutefois, le mucilage de la pelure du fruit de l'espèce *Opuntia ficus-indica* n'a jamais fait l'objet d'étude approfondie. Nous avons donc décidé d'étudier le mucilage extrait de la pelure du fruit de la figue de barbarie, afin d'en établir la structure chimique et de la comparer à celles décrites dans la littérature pour quelques espèces du genre *Opuntia*.

V.1. Fractionnement et purification du mucilage

V.1.1. Fractionnement

Le mucilage extrait de la pelure du figuier de barbarie renferme essentiellement du galactose et de l'arabinose. Il contient mais en moindre proportions du rhamnose, du xylose, du glucose et des acides uroniques. Ces derniers oses peuvent être des constituants d'une seule macromolécule comme ils peuvent provenir d'un mélange de polysaccharides co-extraits. C'est pourquoi nous avons tenté, avant de l'étudier plus en détail, de le purifier.

La présence des résidus acide uronique dans l'extrait brut confère aux molécules qui les portent une certaine charge ionique. Cette charge est susceptible d'interagir avec un support ionique, c'est pourquoi nous avons purifié le mucilage par chromatographie d'échanges d'ions.

Comme nous le reportons sur la figure III.13, le mucilage a été fractionné sur une résine échangeuse d'ions cationique DEAE Sepharose CL-6B, éluée par un tampon acétate de molarité croissante (force ionique) et à pH constant (5.6). Cinq fractions désignées MP1*, MP2*, MP3*, MP4*, MP5*, ont été éluées successivement avec le tampon à des molarités de 0.01, 0.1, 0.3, 0.5 et 1M respectivement.

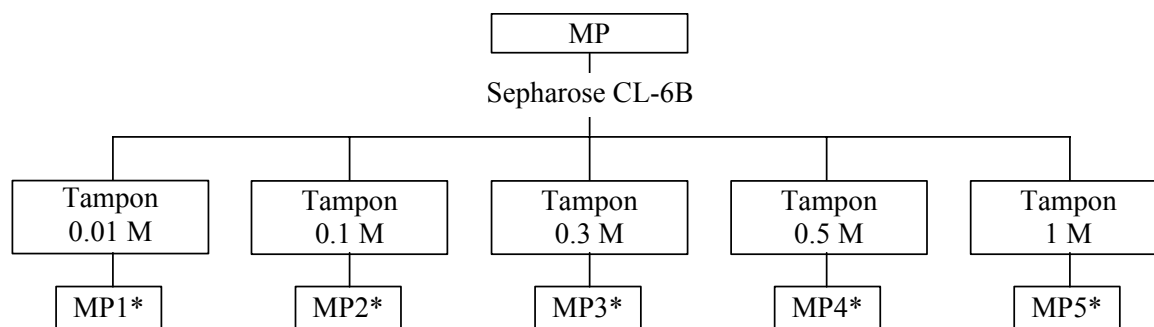


Figure III. 13 : Schéma de fractionnement du mucilage de la pelure du figuier de barbarie

Les pourcentages massiques des fractions récupérées sont reportés dans le tableau III.7. On constate d’après ces résultats que le mucilage est constitué essentiellement d’une fraction, apparemment neutre du fait qu’elle n’a pas été retenue par le support. Cette fraction MP1* constitue, d’un point de vue pondéral 55.2 % de la prise d’essai et qui correspond à 67.4 % de l’ensemble des fractions récupérées. D’autres fractions éluées à des forces ioniques plus ou moins fortes ont été récupérées mais en faibles quantités. Ces fractions sont vraisemblablement acides et proviennent sans doute de polysaccharides de nature pectique. Nous nous sommes intéressés uniquement à l’étude de la fraction prépondérante MP1*. On constate qu’une quantité de produit de l’ordre de 18% est restée accrochée sur la colonne et toutes les tentatives pour la décrocher se sont avérées infructueuses.

Tableau III. 7: Fractionnement chromatographique du mucilage

| Fraction | Eluant | % |
|----------|--------------------------------|------|
| MP1* | Tampon acétate (pH=5.6) 0.01 M | 55.2 |
| MP2* | Tampon acétate (pH=5.6) 0.1 M | 0.3 |
| MP3* | Tampon acétate (pH=5.6) 0.3 M | 4.7 |
| MP4* | Tampon acétate (pH=5.6) 0.5 M | 11.8 |
| MP5* | Tampon acétate (pH=5.6) 1 M | 9.6 |

V.1.2. Purification

La fraction majoritaire MP1* a été purifiée par chromatographie d’exclusion stérique sur une colonne Biogel P6 afin d’éliminer d’éventuels oligosaccharides présents. Par la suite, afin d’apprécier l’homogénéité de la fraction récupérée MP1, elle a été contrôlée par chromatographie d’exclusion stérique haute performance. Le profil de la fraction MP1 indique une bonne homogénéité du polysaccharide (Figure III.14).

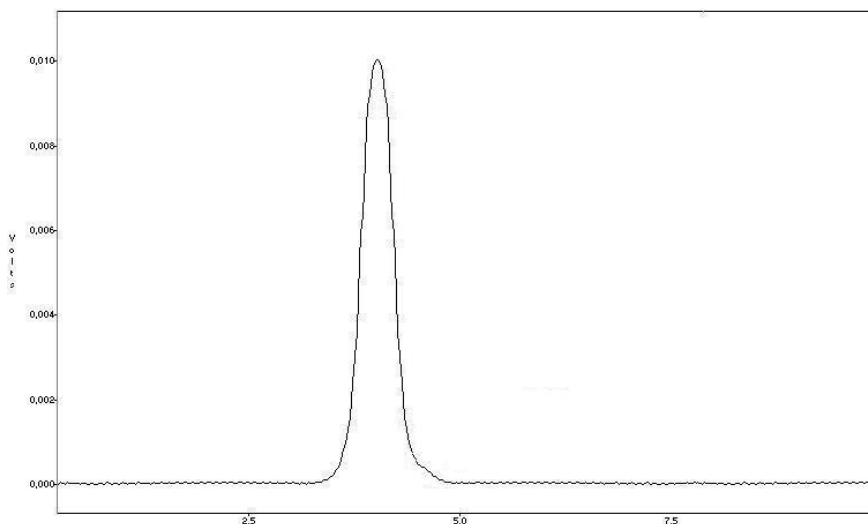


Figure III. 14 : Profil chromatographique (HPSEC) obtenu pour la fraction MP1

V.2. Caractérisation de la fraction majoritaire purifiée (MP1)

V.2.1. Dosage des sucres

La composition globale en sucres neutres et acides de la fraction MP1 est rassemblée dans le tableau III.8. Nous avons reportés, à titre comparatif sur le même tableau, la composition du mucilage brut (MP). Au vu de ces résultats, on constate que le galactose et l'arabinose sont les deux oses majoritaires dans la fraction MP1, leurs pourcentages massiques s'élèvent respectivement à 53.9 % et 38.1 %. On peut constater la présence en quantités minoritaires d'autres sucres neutres, par contre la fraction MP1 est dépourvue d'oses acides. Si l'on compare la composition de la fraction MP1 avec le mucilage brut, on constate un enrichissement en galactose et arabinose et un appauvrissement en sucres acide.

L'absence de résidus rhamnose et acide galacturonique démontre qu'il ne s'agit pas d'une rhamnogalacturonane de type I susceptible d'avoir une telle arabinogalactane comme chaîne latérale comme il a été trouvé par McGarvie et Parolis [214-217]. En effet, les travaux de ces auteurs ont conclu que le mucilage isolé de la cladode de l'*Opuntia ficus-indica* est constitué d'une rhamnogalacturonane hautement ramifiée par des chaînes d'arabinogalactanes dans lesquelles les unités galactose sont liées en β -(1→6) et sont branchées par des résidus arabinose, xylose et rhamnose. La même structure de base a été proposée par les mêmes auteurs pour le mucilage isolé de l'*Opuntia aurantiaca* [218]. Ces résultats avaient été déjà mis en cause par Amin *et coll.* pour qui le mucilage de la cladode de l'*Opuntia ficus-indica* était constitué d'un polysaccharide neutre composé uniquement

d'arabinose et de galactose [219]. Il est fort probable que les conditions d'extraction et de purification aient donc un grand impact sur les structures. La possibilité, dans notre cas, que cette arabinogalactane soit liée sur un squelette rhamnogalacturonane et qu'elle soit libérée en cours de l'isolement, est peu probable étant donné les conditions douces d'extraction et de purification.

Tableau III. 8 : Sucres neutres et acides du mucilage brut et la fraction majoritaire MP1

| Fraction | Sucres neutres et acides (% massique) | | | | | |
|----------|---------------------------------------|-----|-----|------|------|-----|
| | AU | Rha | Glc | Gal | Ara | Xyl |
| MP | 14.2 | 4.2 | 1.5 | 23.5 | 32.7 | 4.5 |
| MP1 | traces | 2.1 | 2.9 | 53.9 | 38.1 | 2.3 |

D'après sa composition en sucres, la fraction MP1 correspond donc à une arabinogalactane, mais à ce niveau de l'étude, il est impossible de déterminer son type. Pour obtenir d'avantage d'informations concernant le type et le mode de liaison, il est nécessaire de réaliser d'autres analyses, par méthylation et par RMN.

V.2.2. Analyse par méthylation

La fraction MP1 a été méthylée puis hydrolysée selon le mode opératoire présenté dans le paragraphe III.3 de la partie expérimentale, afin de mettre en évidence le type de liaisons qui lient les différents oses. Les résultats de cette analyse sont regroupés dans le tableau III.9.

Ces résultats mettent en évidence la prédominance du 2,3,6-Me₃-galactose ce qui indique que le squelette principal du polysaccharide est constitué d'unités galactose liées (1→4). La présence du 2,6-Me₄-galactose peut s'expliquer par la présence d'unités galactose de la chaîne principale qui sont substituées en position O-3 par des chaînes latérales. Les pourcentages de ces deux résidus respectifs (2,3,6-Me₃-galactose et 2,6-Me₄-galactose) sont 35.5 et 21.3 % par rapport à l'ensemble des résidus ce qui correspond à 62.5% et 37.5% par rapport au total du galactose. Ceci signifie, qu'en moyenne, 37.5 % des résidus galactose sont substitués en position O-3 par des chaînes latérales.

Parmi les autres résidus décelés en proportions notables, nous avons identifiés le 2,3-Me₂-arabinose qui correspond à des unités arabifuranose liées (1→5) et le 2,3,5-Me₃-arabinose qui correspond à des unités arabinose terminales. Les pourcentages trouvés pour

ces deux oses sont respectivement de 9.6 % et 20.2 %. Ces deux résidus peuvent provenir d'oligoarabinanes habituellement présents comme ramifications latérales sur la chaîne galactane. Cependant les pourcentages obtenus indiquent qu'il est impossible que les unités terminales soient portées uniquement par les autres unités arabinose. Ceci laisse penser à une répartition irrégulière des unités arabinose sur le squelette principal. D'ailleurs, les proportions égales de galactose substitué (21.3 %) et d'arabinose terminal (20.2%) suggère que les unités arabinose terminales sont soit directement portées par le galactose du squelette principale soit constituent les terminaisons des chaînes latérales d'oligoarabinanes portées elles mêmes par la chaîne galactane. Si l'on considère que toutes les unités arabinose liées (1→5) (9.6%) sont portées en position O-3 sur le galactose et par voie de conséquence ont une unité arabinose terminale. Ceci est cohérent puisque les proportions restantes de galactose substitué et d'arabinose terminal sont équivalentes (environ 11%). Par ailleurs, on constate qu'environ 45% des unités galactose peuvent être substituées par deux unités arabinose, tandis que le reste des unités galactose (55 %) porte une seule unité arabinose.

Tableau III. 9 : Sucres neutres et acides du mucilage brut et la fraction majoritaire MP1.

| Alditol acétates méthylés | % molaire | Mode de liaison |
|---|-----------|------------------|
| 2,3,6-Me ₃ -Gal ^a | 35.5 | →4)-β-Galp-(1→ |
| 2,6-Me ₂ -Gal | 21.3 | →3,4)-β-Galp-(1→ |
| 2,3-Me ₂ -Ara | 9.6 | →5)-α-Araf-(1→ |
| 2,3,5-Me ₃ -Ara | 20.2 | T-Araf |
| 2,3,4-Me ₃ -Rha | traces | T-Rhap |
| 2,3,4-Me ₃ - Xyl | traces | T-Xylp |
| 2,3,4,6-Me ₄ -Glc | traces | T-Glcp |

^a 2,3,6-Me₃-Gal =1,4-di-O-acétyl-2,3,6-tri-O-méthyl-D-Galactitol

L'ensemble de ces résultats suggère que l'arabinogalactane ainsi purifiée est de type I. Elle est constituée d'une chaîne principale d'unités galactose liées (1→4), dans laquelle 37.5 % des unités galactose sont ramifiées et portent des chaînes courtes d'arabinanes. En effet 9.6 % des résidus galactose portent deux unités arabinose liées α-(1→5) et 10.6 % portent une seule unité arabinose.

La structure chimique de notre arabinogalactane diffère de la plupart des structures précédemment publiées par différents auteurs dans le cas des mucilages isolés de l'*Opuntia*. C'est pour cela nous avons décidé, afin de lever toute ambiguïté, d'avoir recours à la RMN.

V.2.3. Analyse par spectroscopie RMN

Le spectre ^{13}C enregistré pour la fraction MP1 est représenté sur la figure III.15. Les principaux signaux observés suggèrent qu'il s'agit d'une chaîne principale d'unités galactose liées β -(1 \rightarrow 4). Les signaux intenses situés à 105.26, 78.49, 75.43, 74.30, 72.86, et 61.73 ppm sont attribués aux carbones C-1, C-4, C-5, C-3, C-2 et C-6 respectivement des unités galactose non substituées. Les unités galactose substituées en position O-3 sont caractérisées par la présence de signaux aux environs de 104.11, 82.22, 79.12 ppm attribués respectivement aux carbones C-1, C-3 et C-4. Les résidus arabinose terminaux sont caractérisés principalement par les signaux à 110.4, 85.26 et 62.44 ppm attribués aux carbones C-1, C-4 et C-5 respectivement. Les signaux à 108,36, 84.94 et 69.7 ppm sont attribués aux carbones C-1, C-4 et C-5 des unités arabinose liées α -(1 \rightarrow 5). Ces différents résultats sont reportés dans le tableau III.10.

Tableau III. 10 : Déplacements chimiques et attributions des signaux RMN ^{13}C des différents résidus de la fraction MP1

| Résidus glycosidiques | Rapport molaire | Déplacements chimiques (ppm) | | | | | |
|---|-----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Galactopyranose | | | | | | | |
| \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow | 5 | 105.26 | 72.86 | 74.30 | 78.49 | 75.43 | 61.73 |
| \rightarrow 3, 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow | 3 | 104.11 | 73.86 | 82.22 | 79.12 | 75.43 | 61.73 |
| Arabinofuranose | | | | | | | |
| \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow | 1 | 108.36 | 81.01 | 77.86 | 84.95 | 69.70 | - |
| α -L-Araf-(1 \rightarrow | 3 | 110.40 | 81.34 | 77.39 | 85.26 | 62.44 | - |

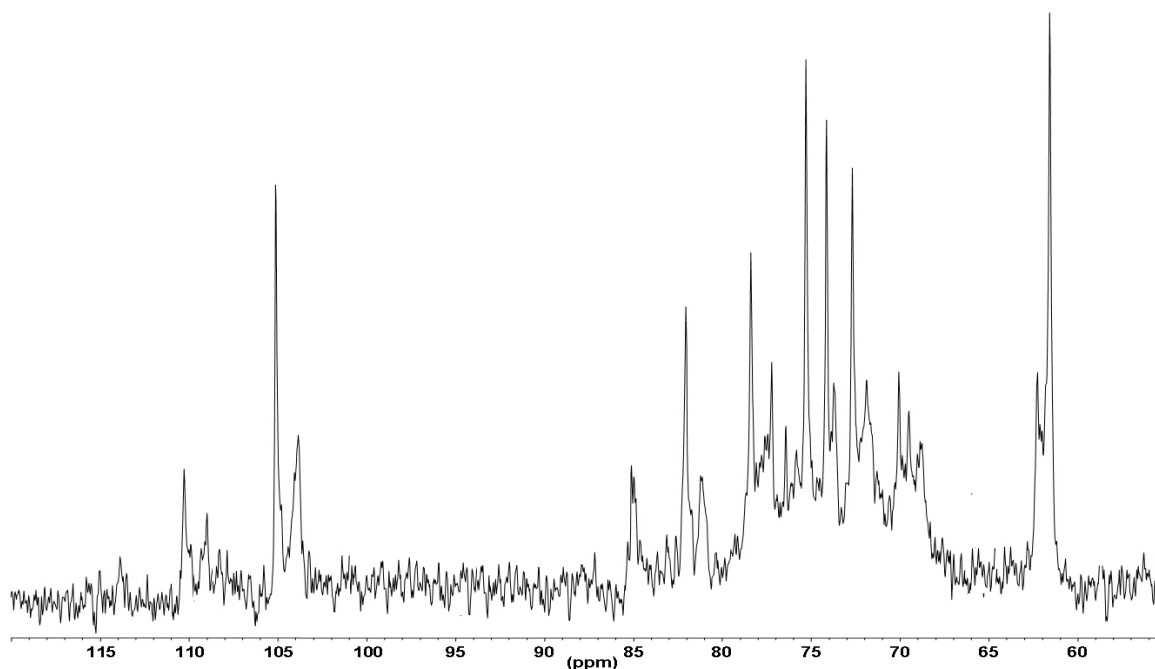


Figure III. 15 : Spectre RMN ^{13}C de la fraction MP1

La RMN ^1H ou la RMN carbone-13, lorsque l'acquisition des données est réalisée dans des conditions quantitatives, permet de déterminer les pourcentages de chacun des différents résidus. La mesure des surfaces des signaux des carbones anomériques des différents résidus dans le spectre ^{13}C quantitatif permet d'établir le rapport entre ces résidus. On peut ainsi déterminer avec précision les pourcentages des ramifications. D'après ce dosage, on obtient les rapports molaires reportés dans le tableau III.10.

D'après les dosages déterminés par RMN ^{13}C , l'unité répétitive est constituée de 8 résidus galactose liés β -(1→4) dont 3 unités sont substituées en position O-3. On a 4 unités arabinose dans l'unité répétitive, qui sont liées en position O-3 du galactose : deux unités galactose portent un seul arabinose, alors que la troisième unités porte un dimère constitué de deux unités arabinose liées α -(1→5).

L'ensemble de ces résultats est en accord avec les résultats de la méthylation. Il s'agit d'une arabinogalactane de type I constituée d'une chaîne principale de β -(1→4)-galactane ramifiée par des unités arabinose. La structure que nous proposons pour l'unité répétitive de cette arabinogalactane est donnée sur la figure III.16. Cependant d'autres structures isomères sont possibles.

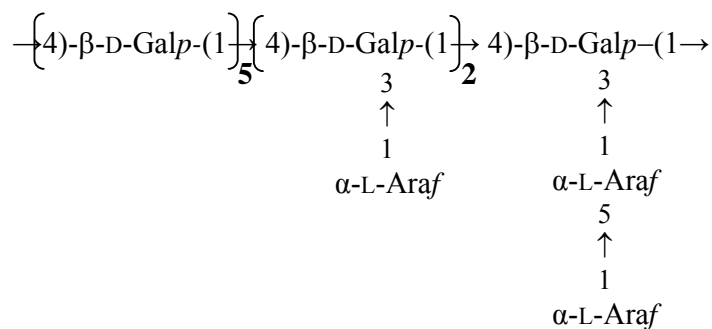


Figure III. 16 : Structure proposée de l’arabinogalactane du mucilage de la pelure de la figue de barbarie

V.3. Conclusion

Le mucilage extrait de la pelure de la figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) a été fractionné et purifié. La fraction majoritaire est constituée d’un polysaccharide neutre et les analyses de sucres montrent une prédominance de galactose et d’arabinose comme pour toutes les espèces *Opuntia*. Cette similitude dans la composition globale n’exclue pas en revanche des différences au niveau de la structure primaire avec les mucilages de quelles que espèces du genre *Opuntia*. En effet, l’analyse par méthylation et par spectroscopie RMN a montré qu’il s’agit d’une arabinogalactane de type I. Le squelette principal est constituée d’un enchaînement linéaire de résidus galactose liés β -(1→4). Les ramifications sont composées d’une ou deux unités arabinose portées en position O-3 des résidus galactose. Comparativement à d’autres études menées sur des mucilages d’autres espèces *Opuntia*, la structure de base que nous proposons pour le mucilage de la pelure de la figue de barbarie est proche de celles décrites par d’autres auteurs avec cependant des différences au niveau des ramifications. Amin *et coll* ont montré que le mucilage de la cladode de l’*Opuntia ficus-indica* dérive d’une arabinogalactane type I où la chaîne principale est constituée d’unités galactose liées en (1→4). Les ramifications sont très complexes, constituées d’arabinose et de galactose [219]. Le mucilage extrait des cosses des graines de l’espèce *Opuntia dillenii* présente le même squelette principal mais avec des ramifications simples. En effet, Srivastava et Pande avaient montré qu’il est constitué d’un squelette linéaire d’unités D-galactopyranose liées β -(1→4). La moitié des unités de la chaîne sont ramifiées en O-3 par une seule unité L-arabinofuranose et parfois par des unités D-galactopyranose [220]. Le taux de ramification indiqué par ces auteurs s’élève à 40%. Dans notre cas, le squelette principal est le même, il est constitué d’une β -(1→4)-galactane dont les ramifications mises en évidence

diffèrent des deux cas cités précédemment. Elles sont constituées d'une ou deux unités arabinofuranose et le taux de ramification, sur la chaîne principale, s'élève à environ 37.5 %. Toutes ces différences peuvent être dues aux conditions d'extraction, qui sont plus au moins drastiques et peuvent entraîner des dégradations, en particulier vis-à-vis des unités arabinofuranose qui sont très fragiles et qui constituent principalement les chaînes latérales.

Les résultats de l'analyse par méthylation ou par RMN excluent la présence dans le mucilage de la pelure de la figue de barbarie de liaisons de type (1→3) et (1→6) pour les résidus galactose. Ce type de liaisons a été mis en évidence dans certains mucilages des *Opuntia*. En effet, Parikh et Jones, en étudiant le mucilage de l'espèce *Opuntia fulgida*, ont constaté qu'il s'agit d'un polysaccharide composé d'une chaîne linéaire de résidus D-galactose liés en β -(1→3), sur laquelle viennent se greffer en O-6 des unités acide D-galacturonique, D-galactose, D-xylose, L-rhamnose et L-arabinose [221-223]. Par ailleurs, d'autres cas ont été cités où certaines espèces *Opuntia* renferment des mucilages dont les structures sont assimilées à des arabinogalactanes mixtes (type I et type II). Le mucilage de l'espèce, par exemple, *Opuntia megacantha* a été purifié par Churms *et coll.* Ils ont montré qu'il ne contient que du galactose et de l'arabinose et que sa structure est d'une grande complexité [224]. Ils ont montré que la chaîne principale contient des résidus galactose liés majoritairement en β -(1→4), et aussi en β -(1→3) et en β -(1→6). Ce squelette mixte porte des chaînes latérales composées d'arabinose.

VI. Etude de la fraction pectique

Comme nous l'avons rappelé précédemment, les pectines sont des polysaccharides complexes formés d'une chaîne principale dans laquelle alternent d'une part des blocs constitués uniquement d'unités acide galacturonique plus ou moins estérifiées (zones lisses) et d'autre part des blocs où alternent unités acides galacturonique et unités rhamnose (GalA-Rha). Certains de ces résidus rhamnose portent des chaînes latérales composées d'oses neutres parmi lesquels le galactose et l'arabinose sont les plus abondants et constituent les zones chevelues. Ces ramifications peuvent également contenir du xylose, du glucose, du mannose et quelques autres sucres plus rares comme du fucose, de l'apiose, du 2-O- méthyle fucose.

Ces polysaccharides pectiques, issus de plusieurs matrices végétales, ont été largement étudiées et font encore l'objet de nombreuses recherches comme c'est le cas pour

les pectines de la betterave sucrière [225-227], des pommes [225], des fibres de lin [228] ou de chanvre [229], etc. Cependant, dans le cas du figuier de barbarie, ces constituants n'ont jamais fait l'objet d'une étude approfondie. Dans la littérature, on connaît uniquement les travaux de Forni *et coll.*, de plus il ne s'agit que d'une étude préliminaire qui donne uniquement la composition en sucres des pectines de la pelure de la figue de barbarie [230].

Nous proposons d'étudier les pectines que nous venons d'extraire de la pelure de la figue de barbarie afin d'en établir la structure chimique, et de la comparer avec la structure de pectines obtenues à partir d'autres végétaux.

Nous avons déterminé la structure chimique de ces pectines par les méthodes classiques d'analyse des polysaccharides à savoir l'hydrolyse acide et la méthylation. Les résultats obtenus ont été confirmés par la résonance magnétique nucléaire (RMN) mono et bidimensionnelle.

VI.1. Fractionnement et purification des polysaccharides pectiques

VI.1.1. Fractionnement

Les fractions pectiques isolées lors de l'extraction des polysaccharides pariétaux de la pelure du figuier de barbarie par extraction à l'eau chaude (fraction WSP), par extraction à l'EDTA (fraction CSP) et par extraction à l'acide chlorhydrique (ASP) représentent 26.5% du poids sec de la pelure. Le pourcentage de chacune de ces trois fractions est de 25%, 45% et 30% respectivement par rapport au total des pectines extraites (tableau III.5). D'après leurs compositions présentées précédemment (tableau III.6), ces trois fractions brutes sont relativement riches en acides uroniques (galacturonique). Elles renferment en quantités plus au moins importante des sucres neutres, essentiellement du galactose et de l'arabinose. Nous avons ainsi tenté de fractionner chacune de ces fractions en fonction de leurs teneurs en acide, par chromatographie d'affinité ionique.

Ces polysaccharides pectiques sont habituellement partiellement estérifiés (méthylés et/ou acétylés). C'est également le cas des fractions brutes que nous avons isolés de la pelure de la figue de barbarie. Afin d'avoir une meilleure séparation et pour faciliter l'analyse ultérieure des composés en particulier par RMN, les trois fractions WSP, CSP et ASP ont été dé-estérifiées par une solution de soude (0.1 M, 0°C, une nuit sous azote). Après neutralisation à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique qui permet d'obtenir respectivement WSP⁺, CSP⁺ et ASP⁺ sous leurs formes acides, elles ont été fractionnées sur un

support anionique. Les échantillons WSP⁺, CSP⁺ et ASP⁺ ont été élués sur une colonne DEAE Trisacryl-M par un tampon phosphate (0.05 M ; pH=6.3) dont la force ionique est augmentée progressivement par ajout de NaCl. Nous avons reporté, à titre d'exemple, le fractionnement de la fraction WSP sur la figure III.17.

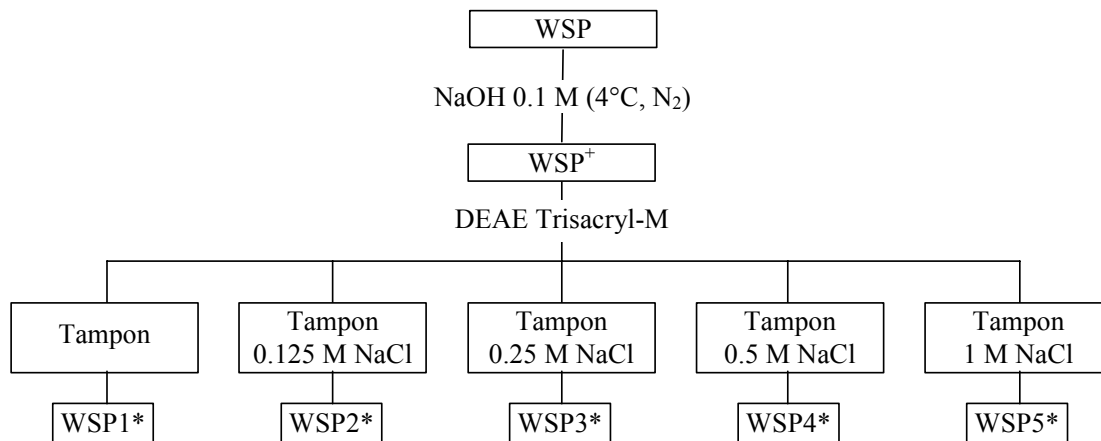


Figure III. 17: Schéma de fractionnement de la fraction WSP

On obtient, dans chaque cas, cinq fractions dont les pourcentages respectifs sont reportés dans le tableau III.11. Nous pouvons constater que les trois fractions apparaissent comme des mélanges de sous fractions plus ou moins acides. Les fractions WSP et CSP ne contiennent que très peu de polysaccharides neutres vu les faibles quantités de produit éluées par le tampon seul. Nous récupérons dans le cas WSP et CSP une fraction largement majoritaire, élue pour toutes les deux à 0.25 M NaCl dans le tampon. Ces fractions représentent 35 % dans le cas de WSP3* et 28 % dans le cas de CSP3* des prises d'essai de WSP et CSP respectivement. Les rendements de fractionnement pour la fraction ASP sont différents des deux fractions précédentes. En effet, nous récupérons trois fractions en quantités notables dont une est vraisemblablement neutre. Ces fractions notées ASP1*, ASP2* et ASP3*, sont élue successivement par le tampon seul, 0.125 M et 0.25 M NaCl dans le tampon. Dans les trois cas nous ne récupérons jamais la totalité de la prise d'essai initiale. En effet, dans chaque cas, une fraction est fortement retenue par le support de séparation probablement à cause d'une très forte teneur en acide dans les substrats.

Tableau III. 11 : Rendement du fractionnement des fractions WSP, CSP et ASP

| Eluant | Fraction | | |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | WSP | CSP | ASP |
| Tampon | 8 % | 4 % | 16 % |
| Tampon + 0,125 M NaCl | 13 % | 11 % | 15 % |
| Tampon + 0,25 M NaCl | 35 % | 28 % | 32 % |
| Tampon + 0,5 M NaCl | 7 % | 6 % | 8 % |
| Tampon + 1 M NaCl | 7 % | 9 % | 7 % |
| Total | 75 % | 58 % | 78 % |

VI.1.2. Purification

Parmi les 15 fractions que nous avons obtenus au cours des fractionnements de WSP, CSP et ASP, nous avons décidé d'étudier uniquement les cinq des fractions majoritaires : WSP3*, CSP3*, ASP1*, ASP2* et ASP3*. Ces cinq fractions ont par ailleurs été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique haute performance avant d'être caractérisées. La purification a été conduite selon le mode opératoire présenté dans la partie expérimentale. Nous avons représenté, sur la figure III.18, un chromatogramme typique. Ces profils indiquent, pour l'ensemble des fractions sélectionnées, qu'elles sont constituées d'un mélange de molécules de différentes masses molaires. Les fractions majoritaires sont, dans tous les cas, celles qui ont les masses molaires les plus élevées. Leur représentativité, déterminée d'après le rapport de leur surface par rapport à la surface totale de l'ensemble, varie de 64 % à 72 % pour les différentes fractions. Nous avons étudié par la suite uniquement les fractions majoritaires qui correspondent aux masses moléculaires les plus élevées. Ces fractions purifiées sont désignées respectivement WSP3, CSP3, ASP1, ASP2 et ASP3.

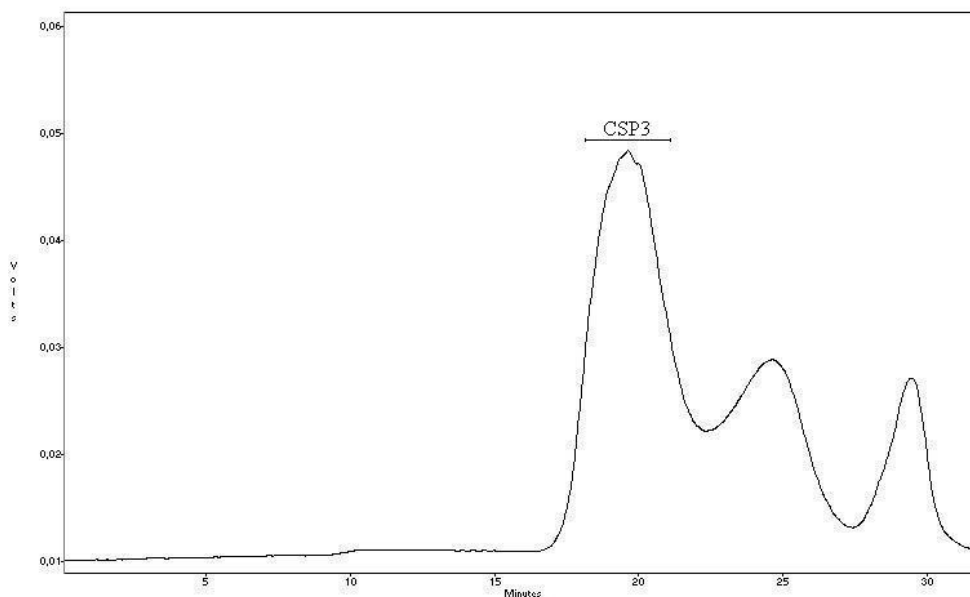


Figure III. 18: Profil chromatographique de la fraction CSP3*

VI.2. Caractérisation des fractions pectiques

Les cinq fractions purifiées ci-dessus ont été caractérisées par les méthodes classiques à savoir le dosage de sucres et la méthylation, ainsi que par RMN du proton et du carbone 13.

VI.2.1. Dosage des sucres

L'hydrolyse acide d'un polysaccharide permet d'avoir une idée sur les différents oses qui sont impliqués dans la structure. Les sucres neutres et acides ont été dosés pour toutes les fractions par CPG et par colorimétrie respectivement, selon les modes reportés dans la partie expérimentale. Par ailleurs, les sucres acides ont été réduits avant l'hydrolyse afin de remédier au problème de l'hydrolyse des liaisons alduroniques qui n'est pas quantitative. Afin de différencier le galactose provenant de la réduction de l'acide galacturonique et le galactose éventuellement présent sur les chaînes latérales, cette réduction a été réalisée en utilisant le borohydrure de sodium deutérié (NaBD_4). Par cette méthode l'acide galacturonique est réduit en galactose marqué par le deutérium et porte ainsi une fonction alcool primaire deutériée (CD_2OH). L'hydrolyse est réalisée après réduction. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III.12.

Tableau III. 12 : Dosage des oses acides et des oses neutres des différentes fractions pectiques avant et après réduction

| Fraction | Osés neutres et acides (% massique) | | | | | | | |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| | GalA | Gal-6,6'-d ₂ | Rha | Gal | Ara | Glc | Xyl | Man |
| WSP3 native | 27 | – | 2 | 5 | 13 | – | – | – |
| WSP3 réduite | – | 25 | 24 | 6 | 41 | – | – | – |
| CSP3 native | 26.4 | – | 3 | 10 | 47 | 2 | 2 | 1 |
| CSP3 réduite | – | 23 | 19 | 9 | 41 | 3 | 1 | 1 |
| ASP1 native | – | – | – | 98.3 | – | – | – | – |
| ASP2 native | 38.5 | – | 3.0 | 18.0 | 1.2 | 3.0 | 1.3 | – |
| ASP2 réduite | – | 34.5 | 30.6 | 15.0 | 1.5 | 2.7 | 1.9 | – |
| ASP3 native | 50 | – | 2 | 0.2 | – | – | – | – |
| ASP3 réduite | – | 51.6 | 42 | 6 | – | – | – | – |

Le dosage des sucres acides dans les fractions non réduites, montre que les fractions WSP3, CSP3, ASP2 et ASP3 qui ont été plus au moins retenues par le support ionique, renferment en quantités variables des résidus acides uroniques. Les pourcentages d'acide galacturonique sont de 27%, 26.4%, 38.5 % et 50 % pour WSP3, CSP3, ASP2 et ASP3 respectivement. Ces fractions contiennent également des quantités plus au moins importantes d'osés neutres. En effet, la fraction WSP3 renferme de l'arabinose (13 %) et du galactose (5 %) tandis que la fraction CSP3 renferme du galactose (10%) et une quantité importante d'arabinose (47%). Ces pourcentages importants d'arabinose par rapport au galactose dans ces deux fractions laissent supposer l'existence des chaînes latérales d'arabinanes. Le galactose peut provenir de chaînes de galactanes ou d'arabinogalactanes. Les fractions ASP2 et ASP3 contiennent uniquement du galactose qui doit provenir de chaînes de galactanes. L'absence d'arabinose est probablement due à l'hydrolyse des liaisons arabinofuranosyles au cours de l'extraction en milieu acide. L'absence de rhamnose alors qu'il est probablement présent dans la structure est due à la résistance de la liaison osidique entre un ose acide et ose neutre, en particulier GalA→Rha, au cours de l'hydrolyse. On peut en effet constater que les rendements d'hydrolyse ne sont pas bons. Ce phénomène a été largement décrit par plusieurs auteurs. Afin d'y remédier on effectue la réduction des

groupements carboxyles des résidus acides (galacturonique ou glucuronique) ce qui permet d'obtenir de meilleurs rendements d'hydrolyse. Après réduction des fractions WSP3 et CSP3, ASP2 et ASP3 une augmentation des pourcentages de rhamnose est observée. Ces résultats indiquent que les fractions WSP3, CSP3, ASP2 et ASP3 renferment respectivement, 24 %, 19 %, 30.6 % et 42 % de rhamnose. Dans les fractions WSP3 et CSP3, les proportions de rhamnose sont approximativement égales à celles de l'acide galacturonique dosé directement ou après réduction. Ces résultats montrent que ces deux fractions sont composées majoritairement de blocs de rhamnogalacturonane. Cependant les fractions ASP2 et ASP3 contiennent davantage d'acide galacturonique que de résidus rhamnose. Ces différences de teneur laissent supposer que ces deux fractions sont constituées à la fois de blocs rhamnogalacturonanes et de blocs d'homogalacturonanes (constitués uniquement de résidus acide galacturonique).

A la différence de ces diverses fractions plus au moins acides, la fraction ASP1 est dépourvue de tout résidu acide et ne contient que du galactose. La présence d'un polysaccharide homogène de type galactane est sans doute à l'origine de cette composition aussi simple.

VI.2.2. Analyse par méthylation

Au cours de la méthylation les hydroxyles libres sont méthylés et ensuite on effectue l'hydrolyse du polysaccharide méthylés. Les monomères ainsi obtenus sont réduits puis acétylés ce qui permet de déterminer les positions qui étaient impliquées dans une liaison glycosidique. De cette façon et après identification et quantification des acétates alditols partiellement méthylés obtenus, on peut déterminer les positions et les pourcentages des liaisons glycosidiques des différents sucres. Afin d'améliorer les rendements d'hydrolyse les acides galacturonique ont été réduit par le borohydrure de sodium deutérié (NaBD₄) avant méthylation comme précédemment. Les résultats de l'analyse par méthylation sont regroupés dans le tableau III.13 suivant :

Tableau III. 13 : Acétates d'alditols partiellement méthylés des différentes fractions natives ou réduites

| Acétates alditols partiellement méthylés | Fraction | | | | |
|--|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | WSP3 réduite | CSP3 réduite | ASP1 native | ASP2 réduite | ASP3 réduite |
| 3,4-Me ₂ -Rha* | 17.4 | 12.4 | – | 21.8 | 26 |
| 3-Me-Rha | 7.2 | 5.2 | – | 6.2 | 6 |
| 2,3,5-Me ₃ -Ara | 10.0 | 18.3 | – | – | – |
| 2,3-Me ₂ -Ara | 11.9 | 18.1 | – | – | – |
| 2-Me-Ara | 2.5 | 4.5 | – | – | – |
| 3-Me-Ara | 3.1 | 2.7 | – | – | – |
| Ara | 5.5 | 6.8 | – | – | – |
| 2,3,4,6-Me ₄ -Gal | 4.8 | 4.1 | – | 6.2 | 6 |
| 2,3,6-Me ₃ -Gal | 5.0 | 10.2 | 99 | 25.2 | – |
| 2,3,6-Me ₃ -Gal-6,6'-d ₂ | 24.0 | 17.6 | – | 40.5 | 62 |

* 3,4-Me₂-Rha = 1,2-di-O-acétyl-3,4-di-O-méthyl-D-Rhamnitol

VI.2.2.1. La fraction WSP3

L'analyse de la fraction WSP3 met en évidence la présence de galactose deutérié (2,3,6-Me₃-Gal-6,6'-d₂) provenant de la réduction de l'acide galacturonique lié (1→4). La proportion de ce résidu (24 %) est égale à la somme des deux monomères du rhamnose (3,4-Me₂-Rha, 17.4% et 3-Me-Rha, 7.2 %). Ce résultat montre donc que la fraction WSP3 est constituée d'une alternance d'unités rhamnose lié (1→2) et d'acide galacturonique lié (1→4). La présence de 3-Me-Rha indique que certains résidus rhamnose portent en position O-4 des chaînes latérales. La proportion de ce dernier, par rapport à l'ensemble des résidus rhamnose, indique que 29 % des unités rhamnose sont substituées. Les chaînes latérales renferment, comme le montre l'analyse, de courtes chaînes de galactanes et d'arabinanes. En effet, l'analyse par méthylation révèle la présence uniquement de deux monomère du galactose dont les proportions relatives sont identiques et peuvent être évaluées à : 4.8 % de galactose lié (1→4) (présence de 2,3,6-Me₃-Gal) et 5% de galactose terminaux (présence de 2,3,4,6-Me₄-Gal). Le rapport entre ces deux résidus étant identiques, on peut en déduire, qu'en moyenne, on a deux unités galactose dans les chaînes latérales et que ces unités galactose sont liées (1→4). D'après les proportions de ces chaînes (≈ 5%), seulement 70 % des

unités rhamnose sont substituées par les chaînes galactanes. Les autres ramifications portées par le reste des unités rhamnose substituées en O-4 (24 %) renferment de l'arabinose comme le montre l'analyse. Plusieurs monomères d'arabinose ont en effet été identifiés en pourcentages différents. Il s'agit, en proportions relatives par rapport à l'ensemble d'unités arabino-3,5 : 30 % d'arabinose terminal (2,3,5-Me₃-Ara) ; 36 % d'arabinose lié (1→5) ; 7.5 % et 9.3 % d'arabinose lié (1→5) et substitué en O-3 et O-2 respectivement ; 16.5 % d'arabinose lié (1→5) et substitué à la fois en O-2 et O-3.

Cette composition suggère donc que la chaîne latérale d'arabinane est constituée d'un squelette principal formé d'unités arabinofuranose, liées entre elles uniquement par des liaisons (1→5), et qui peuvent être substitués en position O-3 et/ou O-2 par une autre unité arabinofuranose. Le pourcentage des résidus arabinose qui constituent la chaîne principale de l'arabinane (23 %) par rapport au reste des unités rhamnose substituées (≈ 2.2 %) permet de remonter à la longueur moyenne de la chaîne qui est estimée à 10 unités arabino-3,5 par chaîne.

VI.2.2.2. La fraction CSP3

La fraction CPS3 présente globalement, d'après l'analyse par méthylation, la même composition que la fraction WSP3 mais avec des différences dans les proportions relatives des différents oses. Il s'agit en effet, d'une rhamnogalacturonane constituée d'une alternance d'unités acide galacturonique liées (1→4) (présence de 2,3,6-Me₃-Gal-6,6'-d₂) et d'unités rhamnose liées (1→2) (présence de 3,4-Me₂-Rha) dont 30 % sont ramifiées en position O-4 (présence de 3-Me-Rha). La nature et le type de liaisons dans les chaînes latérales sont identiques à la fraction WSP3. En effet, l'analyse met en évidence des chaînes constituées de résidus galactose liés (1→4) et qui renferment en moyenne 3 unités galactoses par chaîne. On trouve également des chaînes d'arabinanes qui sont assez semblables à la fraction WSP3, car elles renferment des résidus arabinose liés (1→5) mais elles sont moins ramifiées et plus longues car elles renferment de l'ordre de 25 à 30 unités.

VI.2.2.3. La fraction ASP1

La méthylation de la fraction ASP1 révèle la présence exclusive du monomère 2,3,6-Me₃-Gal, ce qui indique que cette fraction est constituée uniquement d'unités galactose liées (1→4) entre elles. Ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'une (1→4)-galactane.

VI.2.2.4. La fraction ASP2

L'analyse par méthylation de la fraction ASP2, contrairement aux fractions WSP3 et CSP3, est beaucoup plus simple étant donné l'absence de résidus arabinose. Par ailleurs, l'analyse met en évidence la présence uniquement de cinq monomères. Le monomère (2,3,6-Me₃-Gal-6,6'-d₂), qui résulte de la réduction des résidus acide galacturonique liés (1→4), est décelé dans une proportion supérieure à l'ensemble de tous les monomères du rhamnose liés (1→2), substitués ou non (3,4-Me₂-Rha et 3-Me-Rha).

Ceci suggère que cette fraction pectique est constituée d'un squelette contenant à la fois des blocs d'homogalacturonanes [→4)-GalA-(1→] et des blocs de rhamnogalacturonanes [→4)-GalA-(1→2)-Rha-(1→]. Les proportions relatives de ces différents monomères permettent de remonter à la longueur de chaque bloc. Ainsi 31 % des unités acides galacturonique sont impliquées dans les blocs d'homogalacturonanes, et 69% sont impliquées dans des blocs rhamnogalacturonanes. En ce qui concerne les résidus rhamnose, 22% (par rapport au nombre total d'unités rhamnose) portent une ramification en O-4 (3-Me-Rha). Les ramifications sont composées uniquement de chaînes de (1→4)-galactane, caractérisées par la présence des monomères 2,3,6-Me₃-Gal galactose (lié 1→4) et 2,3,4,6-Me₄-Gal (en position terminale). Leurs proportions relatives de l'ordre de 25 % et 6 % respectivement, permettent donc d'estimer la longueur de la chaîne à 4 unités galactose en moyenne.

VI.2.2.5. La fraction ASP3

Les résultats de l'analyse de la fraction ASP3 par méthylation, après réduction des fonctions carboxyliques, indiquent la présence des mêmes monomères que ceux rencontrés dans la fraction ASP2, mais avec des pourcentages différents. Cependant, on constate une quantité plus importante de 2,3,6-Me₃-Gal-6,6'-d₂ (62%). Ce qui s'explique par la présence d'une proportion plus importante des blocs d'homogalacturonanes. Au regard des proportions relatives, on peut conclure qu'en effet 50 % des unités acide galacturonique sont impliqués dans des blocs d'homogalacturonanes [→4)-GalA-(1→] et 50% sont impliquées dans des enchaînements rhamnogalacturonanes. La présence de 2,3,4,6-Me₄-Gal (6%) en faible proportion et en quantité identique au 3-Me-Rha (6%) indique que dans cette fraction, les unités rhamnose substituées en O-4 portent une seule unité galactose. Le pourcentage des

résidus du rhamnose branchés, ou taux de ramification, est de l'ordre de 19 % (par rapport au nombre total d'unités rhamnose).

VI.2.3. Etude par spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN est une technique qui s'est imposée ces vingt dernières années comme la technique indispensable pour étudier, caractériser et déterminer la structure chimique des polysaccharides d'une façon générale. C'est également vrai dans le cas des polysaccharides pectiques, que ce soit pour caractériser les unités acide galacturonique et rhamnose du squelette ou encore pour caractériser les chaînes latérales d'arabinanes, galactanes ou arabinogalactanes [180, 182, 228, 229, 231-241]. En ce qui nous concerne nous avons également fait le choix de caractériser les cinq fractions pectiques que nous avons purifiées, à l'aide de la RMN à une dimension (1D) ou à deux dimensions (2D).

Nous avons reporté, sur les figures III.20 et III.21, les spectres proton (^1H) et carbone-13 de chacune de ces cinq fractions. L'analyse de ces spectres, en particulier pour les fractions WSP3 et CSP3 n'était pas évidente car plusieurs signaux se superposent. C'est pourquoi, et pour une attribution non ambiguë, on a eu recours à des corrélations homonucléaires et hétéronucléaires. Nous avons utilisés les expériences (COSY), (HMQC) ou (HSQC) et (HMBC) qui nous ont permis d'attribuer pratiquement tous les signaux des protons et carbones 13 des différents résidus. Sur les figures III.23, III.24, III.26 et III.28 nous avons reportés, à titre d'exemple, la carte COSY et HMQC de la fraction CSP3, la carte HSQC de la fraction ASP2 et la carte HMBC de la fraction ASP3. Les attributions de l'ensemble de signaux sont reportées dans les tableaux III.14, III.15, III.16, III.17 et III.18.

VI.2.3.1. La fraction WSP3

Dans le spectre du proton on peut facilement identifier deux doublets centrés à 1.2 et 1.26 ppm qui sont attribués, respectivement, aux H-6 des résidus rhamnose. Le signal à 1.2 ppm correspond aux unités uniquement liées (1 \rightarrow 2) à un acide galacturonique. Le signal à 1.26 ppm correspond aux unités rhamnose liées (1 \rightarrow 2) à un acide galacturonique et qui portent en O-4 une ramification. Le rapport des surfaces de ces deux signaux permet d'estimer le taux de substitution, qui s'élève à 30%. Cette valeur est en bon accord avec celle trouvée par méthylation. L'attribution directe des autres signaux du spectre proton s'est avérée difficile, c'est pourquoi on a eu recours à des séquences 2D. Dans le spectre COSY apparaissent, dans la région des protons anomériques, des taches de corrélation aux alentours de 5.21, 5.04, 4.96

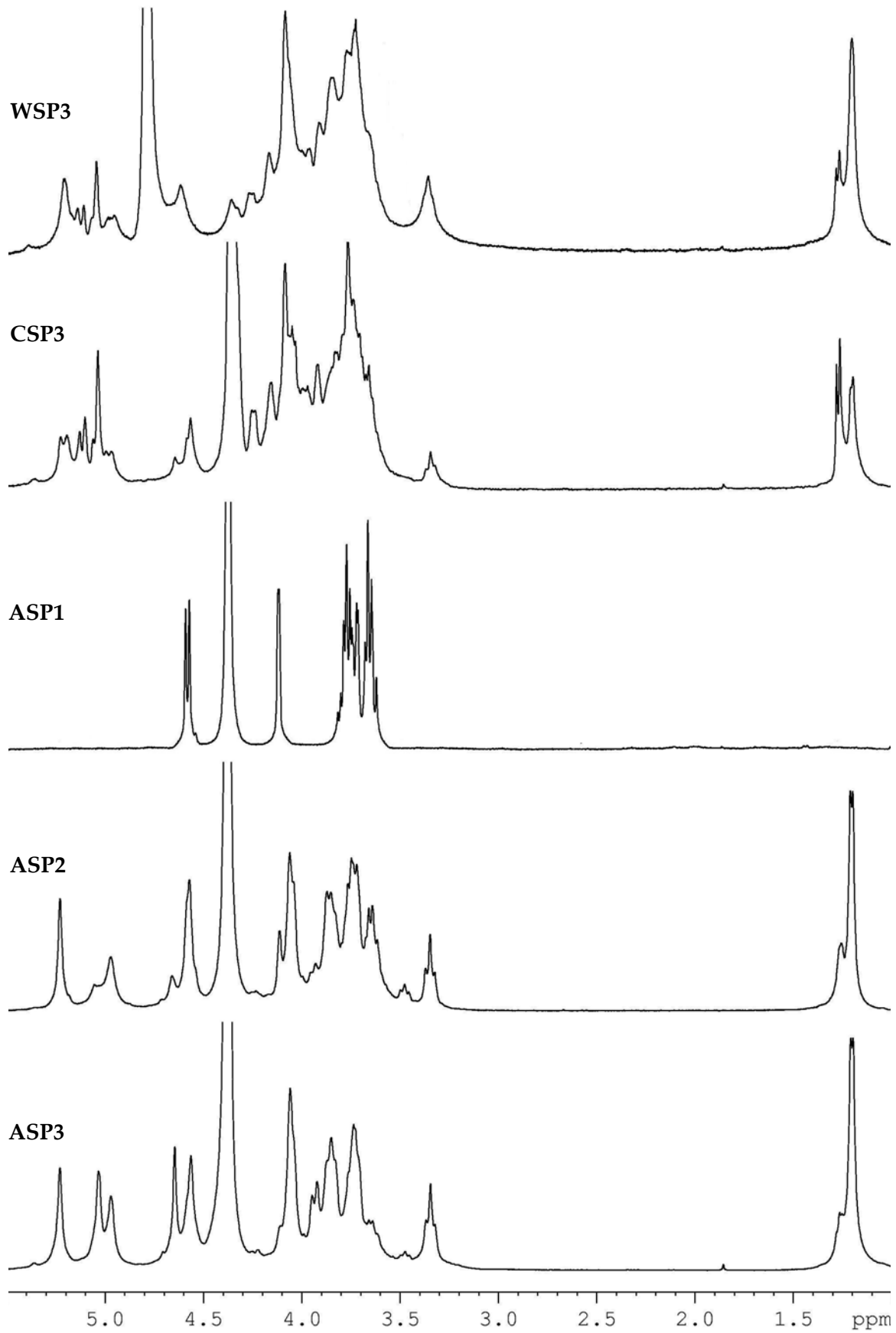


Figure III. 20 : Spectres ^1H des fractions WSP3, CSP3, ASP1, ASP2 et ASP2

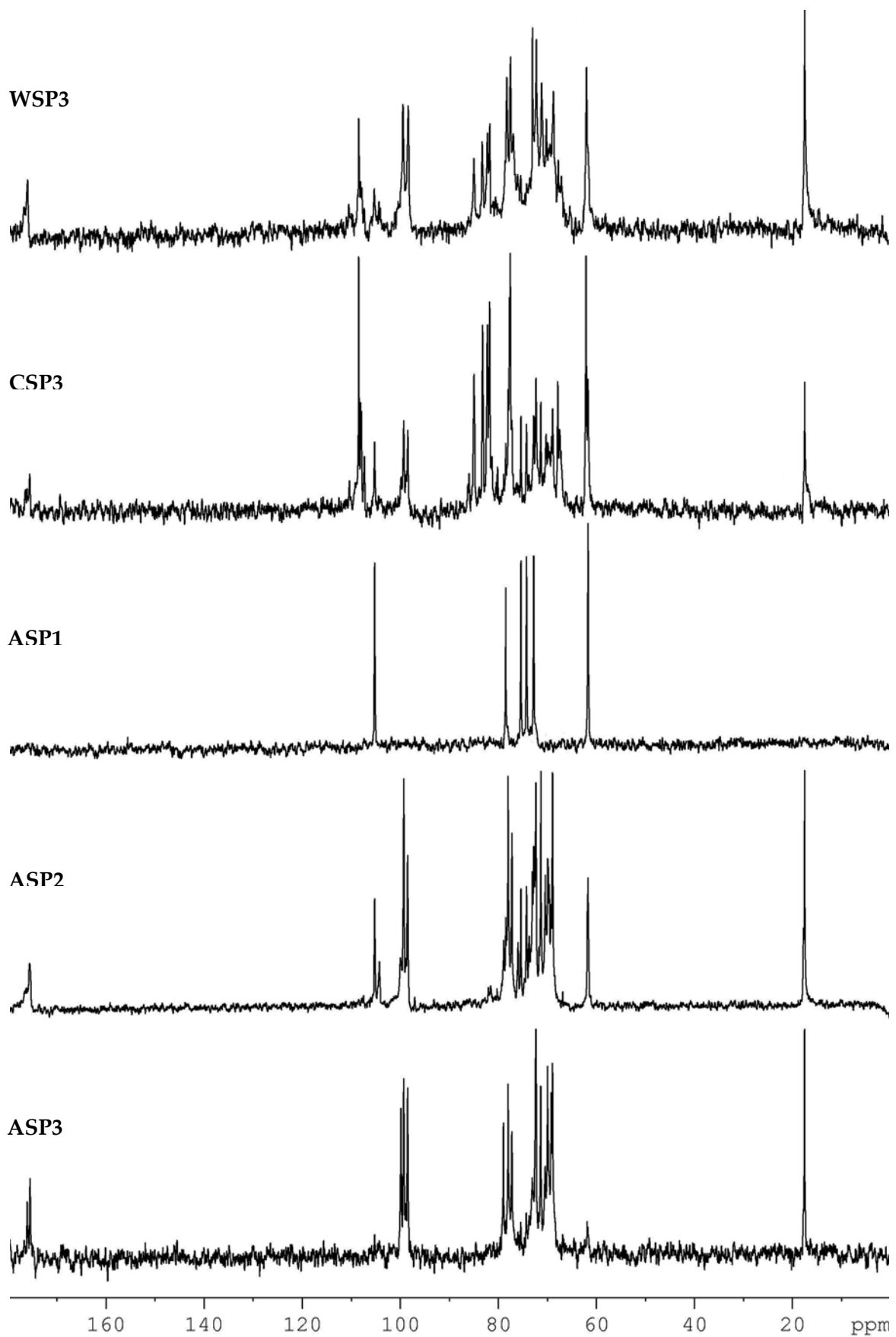


Figure III. 21 : Spectres ^{13}C des fractions WSP3, CSP3, ASP1, ASP2 et ASP2

Tableau III. 14 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction WSP3

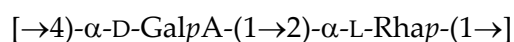
| Résidus glycosidiques | | Déplacements chimiques (ppm) | | | | | |
|---|----------------------------|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Les résidus acide galacturonique | | | | | | | |
| →4)- α -GalpA(1→2)- α -L-Rhap-(1→ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 4.96/98.34 | 3.97/69.10 | 3.95/69.72 | 4.37/77.90 | 4.60/72.01 | 175.40 |
| Les résidus rhamnose | | | | | | | |
| →4)- α -GalpA(1→2)- α -L-Rhap-(1→ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.21/99.40 | 4.09/77.70 | 3.87/70.80 | 3.34/71.30 | 3.78/69.35 | 1.20/17.45 |
| →4)- α -GalpA(1→2,4)- α -L-Rhap-(1→ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.21/98.84 | 4.15/78.75 | 3.87/70.80 | 4.32/80.18 | 3.72/68.47 | 1.26/17.45 |
| Les résidus arabinose | | | | | | | |
| →5)- α -Araf-(1→ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.04/108.46 | 4.08/81.85 | 4.03/77.48 | 4.18/83.06 | 3.87/68.22 | - |
| →3,5)- α -Araf-(1→ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.21/107.82 | 4.32/80.38 | 4.04/84.90 | 4.24/82.82 | 3.72/68.47 | - |
| →2,5)- α -Araf-(1→ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 4.97/108.52 | 4.09/84.96 | 4.16/83.20 | 4.18/83.06 | 3.86/67.92 | - |
| →2,3,5)- α -Araf-(1→ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.13/107.71 | 4.11/84.96 | 3.99/77.56 | 4.03/82.79 | 3.67/68.13 | - |
| T- α -Araf-(1→2 | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.09/107.21 | 4.16/82.62 | 3.91/77.47 | 3.97/84.93 | 3.80/62.26 | - |
| T- α -Araf-(1→3 | | 5.19/110.30 | 4.27/82.82 | | | | |
| Les résidus galactose | | | | | | | |
| →4)- β -Galp-(1→ | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 4.58/105.26 | 3.48/72.89 | 3.70/74.36 | 4.11/78.53 | na | 3.80/61.85 |

VI.2.3.2. La fraction CSP3

Les spectres RMN proton ou carbone-13 de la fraction CSP3 présentent la même allure générale que ceux de la fraction WSP3. Toutefois, les signaux des unités arabinose et galactose des chaînes latérales d'arabinanes et de galactanes sont plus intenses ce qui s'explique par une augmentation des longueurs de chaînes comme il a été déjà observé lors de l'analyse par méthylation. Les enchaînements et le type de liaisons osidiques de ces chaînes latérales sont, d'après les spectres RMN (1D et 2D), les mêmes que pour le polysaccharide de la fraction WSP3.

Le squelette principal de ce polysaccharide est donc constitué d'une alternance d'unités rhamnose liées α -(1→2) (caractérisées par les signaux H-1 à 5.22 ppm et C-1 à 99.24 ppm ; H-6 à 1.20 et 1.25 ppm et C-6 à 17.45 ppm) et d'unités acides galacturonique liées α -(1→4) (caractérisées par les signaux H-1 à 4.96 ppm et C-1 à 98,45 ppm et le C=O des fonctions carboxyles à 175.50 ppm).

La même structure de base que pour WSP3 peut être proposée pour la fraction CSP3, avec cependant des différences au niveau de longueur des chaînes latérales. L'unité répétitive est donc le disaccharide suivant :



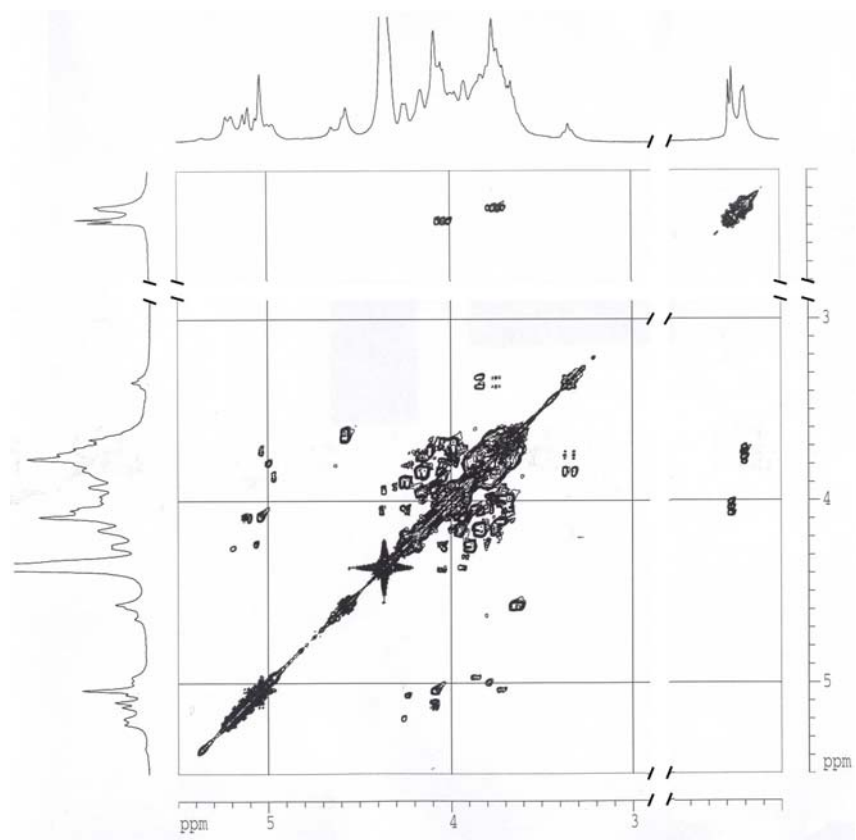


Figure III. 23 : Carte de corrélation homonucléaire ($^1\text{H}/^1\text{H}$) 2D-COSY de la fraction WSP3

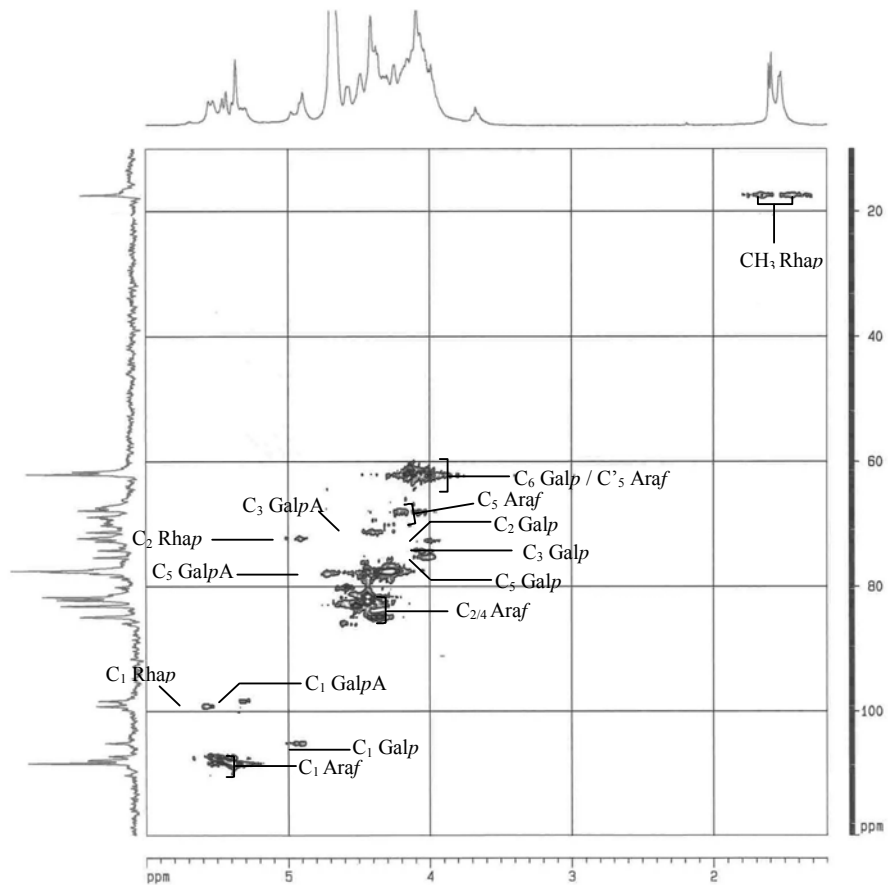


Figure III. 24 : Carte de corrélation hétéronucléaire $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HMQC) de la fraction CSP3

VI.2.3.3. La fraction ASP1

De l'ensemble des fractions étudiées, ASP1 est de loin la plus simple. En effet, on distingue uniquement six signaux dans le spectre proton à 4.58, 4.12, 3.80, 3.77, 3.71 et 3.66 ppm qui sont facilement attribuables par 2D-COSY respectivement à H-1, H-4, H-6, H-3, H-5 et H-2. Dans le spectre carbone-13 on constate la présence de six signaux à 105.1, 78.4, 75.3, 74.2, 72.7 et 61.6 ppm attribués respectivement par des expériences 2D-HSQC aux carbones C-1, C-4, C-3, C-5, C-2 et C-6. Ces résultats sont reportés dans le tableau III.16 et sont en accord avec les données de la littérature concernant une β -(1 \rightarrow 4)-galactane, et viennent confirmer les résultats obtenus par méthylation et hydrolyse.

Tableau III. 16 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction ASP1

| Résidu glycosidique | | Déplacements chimiques (ppm) | | | | | |
|--|-----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| \rightarrow 4)- β -Galp-(1 \rightarrow | ¹ H | 4.58 | 3.66 | 3.77 | 4.12 | 3.71 | 3.80 |
| | ¹³ C | 105.17 | 72.74 | 74.19 | 78.44 | 75.34 | 61.63 |

VI.2.3.4. La fraction ASP2

Les spectres ¹H et ¹³C de la fraction ASP2 sont eux aussi plus simples que ceux des fractions WSP3 et CSP3. Cette simplicité est due à l'absence de chaînes latérales d'arabinanes. On retrouve, que ce soit dans le spectre du ¹H ou dans le spectre du ¹³C, les signaux caractéristiques des unités rhamnose qui sont liés (1 \rightarrow 2) et à la fois (1 \rightarrow 2,4) et des unités acide galacturonique. Dans le spectre ¹H par exemple, deux doublets centrés aux environs de 1.25 et 1.2 ppm sont facilement identifiables. Ils sont attribués respectivement aux unités rhamnose lié (1 \rightarrow 2) substituées en position O-4 et aux unités rhamnose non substituées. Par contre au niveau des protons anomérique, nous n'arrivons pas à différencier entre ces deux résidus rhamnose même par des expériences 2D corrélées. En effet, un seul signal est présent à 5.22 ppm qui correspond à une superposition des deux signaux H-1 de deux résidus rhamnose. En ce qui concerne le proton anomérique H-1 de l'acide galacturonique (à 4.97 ppm) on voit apparaître vers 5.05 ppm un signal moins intense attribué par plusieurs auteurs à des unités acide galacturonique impliquées dans des blocs d'homogalacturonanes. Cette observation est en bon accord avec les résultats obtenus par méthylation et qui montre que la fraction ASP2 renferme des blocs d'homogalacturonanes. Ces blocs sont repérés facilement

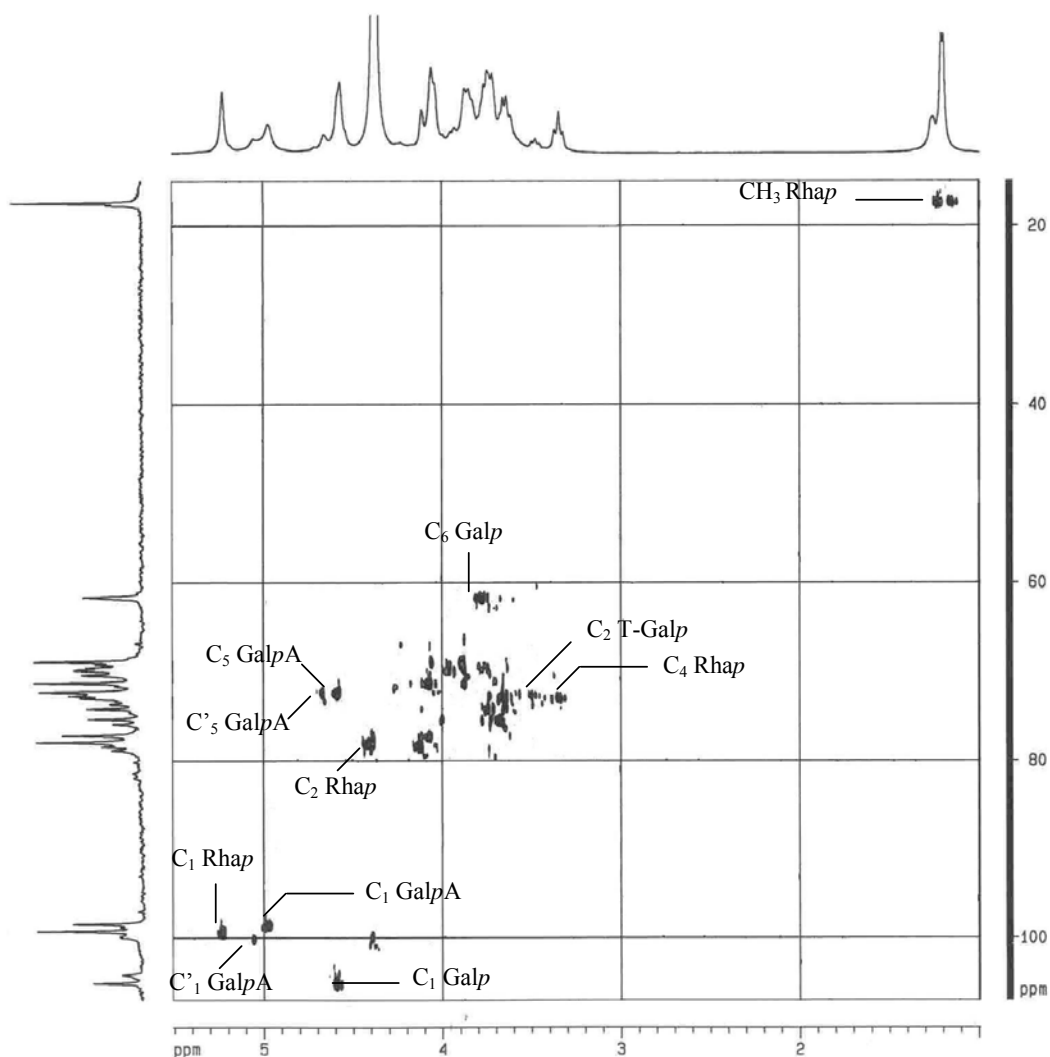


Figure III. 26: Carte de corrélation hétéronucléaire $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HSQC) de la fraction ASP2

VI.2.3.5. La fraction ASP3

La fraction ASP3 présente une grande similitude de composition avec la fraction ASP2, et elle donne des spectres RMN semblables. Toutefois, les intensités de certains signaux diffèrent. En effet, les signaux attribués aux résidus acides galacturonique liés α -(1 \rightarrow 4) des blocs homogalacturonanes, qui étaient minoritaires dans la fraction ASP2, sont plus intenses dans la fraction ASP3. Par contre les signaux attribués à la chaîne latérale galactane sont beaucoup moins importants dans ASP3 que dans ASP2. Ceci suggère que la fraction ASP3 est plus riche en blocs d'homogalacturonanes et porte des chaînes de ramifications galactane moins longues.

Ainsi, on distingue nettement dans le spectre ^1H trois signaux dans la région des protons anomériques à 5.22, 5.03 et 4.96 ppm, attribués respectivement aux H-1 des unités

rhamnose, aux H-1 des unités acides galacturonique impliquées dans des blocs d'homogalacturonanes et aux H-1 des unités acides galacturonique impliquées dans des blocs rhamnogalacturonanes. A partir de ces signaux H-1 on peut remonter successivement aux signaux H-2, H-3,... et H-5 des différents résidus. De la même façon, dans le spectre ¹³C on distingue trois signaux anomères à 99.77, 99.22, 98.40 ppm attribués respectivement aux carbones anomériques des unités acides galacturonique impliquées dans des blocs d'homogalacturonanes, des unités rhamnose et des unités acides galacturonique impliquées dans des blocs rhamnogalacturonanes.

Les unités rhamnose présentent des signaux méthyles caractéristiques à 1.2 et 1.25 ppm. Le signal à 1.2 ppm est attribué aux résidus rhamnose liés (1→2) et non substitué alors que le signal à 1.25 ppm est attribué aux unités rhamnose liés (1→2) et qui portent des ramifications en position O-4. Les surfaces respectives de ces deux signaux permettent d'évaluer le taux de ramification qui est de 30% par rapport à l'ensemble des unités rhamnose.

Ces ramifications sont constituées, en moyenne, d'une unité galactose qui se caractérise dans le spectre ¹³C par la présence de petits signaux à 105.17, 75.34, 74.19 et 61,64 ppm attribués au C-1, C-5, C-3 et C-6 respectivement. Cette étude structurale est en accord avec la méthylation et l'hydrolyse et nous conduits à proposer pour l'unité répétitive du polysaccharide de la fraction ASP3 la structure ci-dessous :

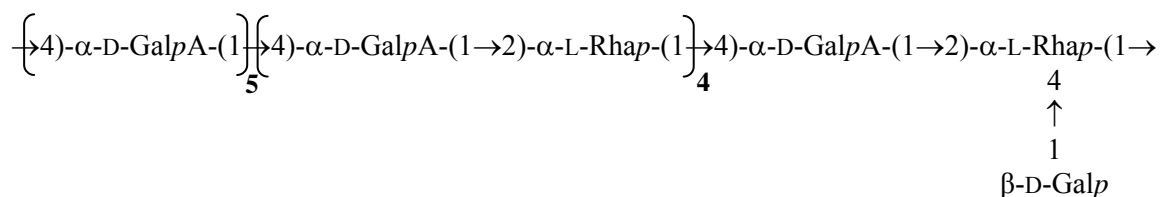


Figure III. 27 : Structure proposée pour la fraction ASP3

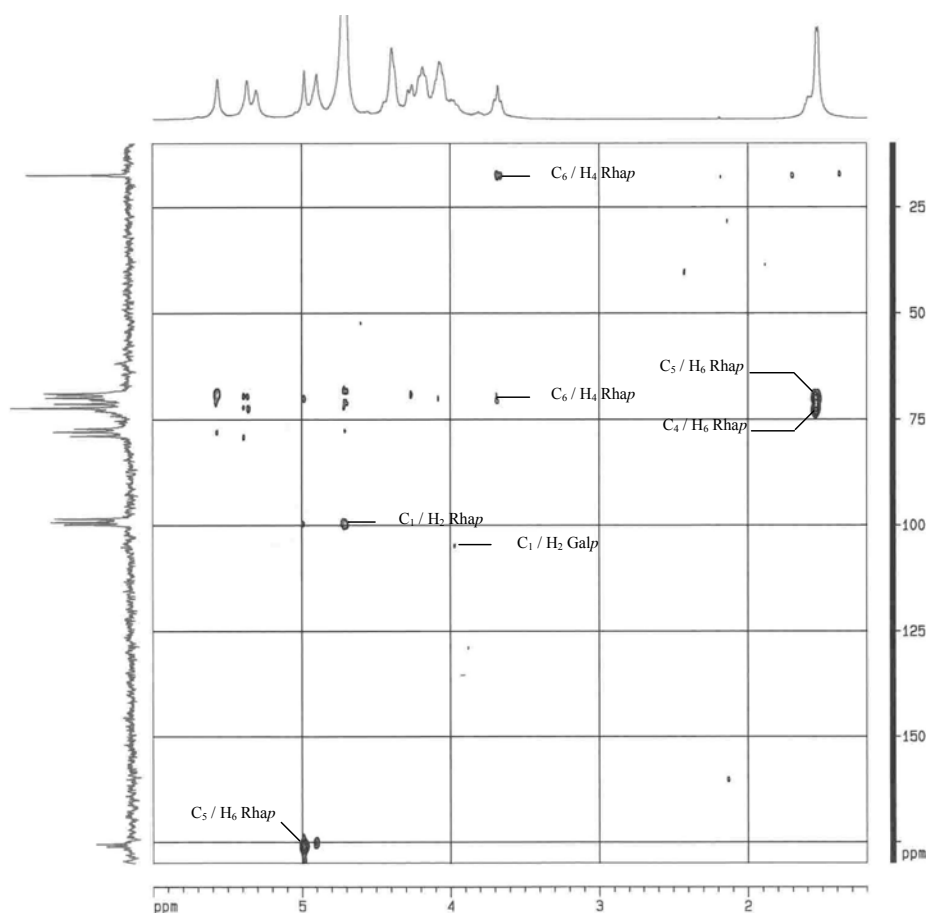


Figure III. 28: Carte de corrélation hétéronucléaire $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HMBC avec filtre ^1J) de la fraction ASP3

Tableau III. 18 : Déplacement chimiques des résidus glycosidiques de la fraction ASP3

| Résidus glycosidiques | | Déplacements chimiques (ppm) | | | | | |
|--|----------------------------|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Les résidus acide galacturonique | | | | | | | |
| $\rightarrow 4$)- α -GalpA-(1 \rightarrow | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.03/99.79 | na/69.85 | 3.97/69.90 | 4.37/78.92 | 4.65/72.29 | 176.05 |
| $\rightarrow 4$)- α -GalpA-(1 $\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 4.96/98.40 | 3.95/69.11 | 4.00/69.70 | 4.35/77.13 | 4.56/72.28 | 175.48 |
| Les résidus rhamnose | | | | | | | |
| $\rightarrow 4$)- α -GalpA-(1 $\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.22/99.24 | 4.06/77.90 | 3.88/70.30 | 3.33/72.26 | 3.78/68.79 | 1.2/17.47 |
| $\rightarrow 4$)- α -GalpA-(1 $\rightarrow 2,4$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 5.22/99.01 | 4.12/78.35 | nd | nd/81.02 | nd | 1.25/17.65 |
| Les résidus galactose | | | | | | | |
| $\rightarrow 4$)- β -Galp-(1 \rightarrow | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ | 4.56/105.16 | 3.63/72.73 | 3.92/74.21 | 4.06/68.84 | nd/75.38 | 3.78/61.74 |

VI.3. Conclusion

Les quatre fractions polysaccharidiques de nature pectique (WSP3, CSP3 ASP2 et ASP3) que nous avons isolé et caractérisé peuvent être considéré comme des modèles de la structure des pectines sécrétées dans la paroi de la pelure du fruit de la figue de barbarie. Les

fractions WSP3 et CSP3 présentent des structures similaires et correspondent à une rhamnogalacturonane de type I (RG-I). La composition chimique a montré que le rhamnose n'est pas l'unique ose neutre présent dans ces deux fractions. Elles contiennent aussi de l'arabinose et du galactose qui ont déjà été rencontrés dans la littérature comme étant impliqués dans les chaînes latérales portées en position O-4 du rhamnose de la chaîne principale. Néanmoins, des différences ont été mises en évidence quant aux structures de ces chaînes latérales dans diverses RG-I et qui font encore l'objet de débats scientifiques. Plusieurs cas sont rencontrés où ces chaînes latérales sont constituées d'un seul édifice moléculaire composé d'arabinose et de galactose (arabinogalactane), ou formées exclusivement d'unités arabinofuranose pour former des chaînes d'arabinanes, ou d'unités galactose pour former des chaînes de galactanes

Pour les chaînes arabinogalactanes, il a été largement considéré que dans les RG-I, les arabinogalactanes ne peuvent adopter qu'une structure de type I. C'est la forme la plus répandue dans le monde végétal où elle a été rencontrée dans plusieurs matrices végétales en l'occurrence, la pomme de terre [242], les graines de soja [39, 234], le lupin, le marc de pommes, les oignons, les tomates, le chou [239, 243]. Quant aux arabinogalactanes de type II, elles ont été considérées avant comme des molécules « libres » ou liées aux protéines membranaires (arabinogalactane-protéines). Mais plusieurs études menées à l'aide d'enzymes sur des RG-I ont mis en évidence l'existence aussi de ce type d'arabinogalactane dans les chaînes latérales portées par le rhamnose du squelette principal des RG-I. Elles ont été rencontrées, par exemple, dans les pommes [244, 245], la betterave rouge [246, 247] et les raisins [240].

Dans le cas où l'arabinose et le galactose forment deux branches latérales distinctes (arabinanes, galactane) portées séparément sur la chaîne principale, on constate des différences au niveau des longueurs de chaînes, par contre les structures restent plus au moins identiques. Les arabinanes constituent les chaînes latérales des RG-I les plus répandues, où elles existent sous forme d'un enchaînement linéaire d'unités arabinofuranose liées entre elles par des liaisons α -(1 \rightarrow 5). Ce squelette peut être plus au moins ramifié en position O-3 et/ou O-2 par un autre α -L-arabinofuranose à l'exception de quelques cas particuliers où deux unités arabinose sont présentes en branchement. Les chaînes latérales d'arabinanes ont des longueurs variables pouvant aller d'une unité à trente unités

maximum. Cependant dans le cas des galactanes, différents auteurs ont mis en évidence ce type de chaîne latérale dans le cas de plusieurs RG-I. Elles ont toujours la même structure de base à savoir des β -(1→4)-galactanes avec des longueurs différentes qui se situent entre 1 et 8 unités galactose.

D'après les résultats obtenus au cours de cette étude par les différentes méthodes d'analyse, nous n'avons pas mis en évidence de chaînes latérales de type arabinogalactanes dans les RG-I des pectines de la pelure de la figue de barbarie surtout dans les deux fractions renfermant de l'arabinose et du galactose (WSP3 et CSP3). Les chaînes latérales sont constituées soit de chaînes d'arabinanes soit de chaînes de galactanes. Comparativement aux structures citées dans la littérature, les chaînes latérales présentent dans les pectines de la pelure de la figue de barbarie, en particulier WSP3 et CSP3, adoptent des structures classiques avec des DP usuels. Quant au taux de ramification des arabinanes, elles présentent une grande similitude avec celles des RG-I extraites de la pulpe de betterave sucrière [226, 227].

Dans la structure chimique que nous avons proposé pour les fractions ASP2 et ASP3 on retrouve les chaînes galactanes avec cependant des différences aux niveaux des DP. Cette différence ainsi que l'absence des chaînes arabinanes trouve sans doute son origine dans la nature des conditions d'extraction. En effet, ces deux fractions ont été extraites dans des conditions acides et les liaisons osidique, en particulier les liaisons α -arabinofuranose, sont sensibles et s'hydrolysent très facilement. Il faudrait effectuer d'autres modes d'extraction afin de prouver la présence ou non d'arabinose dans ces protopectines intimement associées aux microfibrilles de la paroi cellulaire.

Par contre, dans ces deux fractions nous avons mis en évidence la présence de blocs homogalacturonanes avec des longueurs plus au moins importantes. Ces blocs jouent un rôle déterminant dans le processus de gélification des pectines, et plusieurs auteurs se sont intéressés à leur présence ou non dans d'autres pectines. Dans les pectines extraites des graines de soja par exemple, aucune alternance de blocs d'acide galacturonique n'a pu être mise en évidence [234]. Par contre, Thibault a identifié et comparé les longueurs de ces blocs d'homogalacturonanes à l'aide de procédés enzymatiques dans des pectines isolées du marc de pommes, des citrus et de la pulpe de betterave sucrière. Des longueurs comparables à celles de la fraction ASP3 ont été retrouvées dans les pectines de la pulpe de betterave.

La présence d'une β -(1→4)-galactane dans l'extrait acide (ASP1) est inhabituelle, c'est la première fois qu'une galactane est isolée au cours d'une extraction acide. Le DP estimé pour cette galactane est supérieur à 40, ce qui laisse supposer qu'il ne s'agit pas d'une chaîne latérale d'une RG-I qui aurait été libérée au cours de l'extraction. Par contre, une incertitude demeure, à savoir si dans la paroi végétale cette galactane n'était pas en fait impliquée dans une arabinogalactane dont les unités arabinoses auraient pu être hydrolysées au cours de l'extraction acide.

VII. Etude des hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides composés essentiellement de sucres neutres (xylose, glucose, mannose,...) et qui peuvent renfermer des teneurs plus au moins importantes d'acides uroniques. Il s'agit en général de polysaccharides qui peuvent être extraits des parois végétales par des traitements alcalins. Dans les parois primaires des monocotylédones les hémicelluloses majoritaires sont des glucuroarabinoxylanes, tandis que les dicotylédones, selon plusieurs auteurs, contiennent essentiellement des xyloglucanes et dans des proportions moindres des xylanes et des β -(1→3), β -(1→4) glucanes [25, 248, 249]. Ces xyloglucanes jouent vraisemblablement un rôle très important dans le processus d'extension de ces parois cellulaires. Ceci a été prouvé par l'absence des xyloglucanes lorsque la croissance cellulaire est achevée c'est-à-dire quand la paroi primaire est terminée et que c'est la paroi secondaire qui se met en place. Les principaux composés hémicellulosiques constitutifs de ces parois secondaires sont des xylanes [249].

Dans les parois primaires à tissus parenchymateux, les proportions des hémicelluloses sont généralement faibles, comme c'est le cas de la pelure de la figue de barbarie que nous nous proposons d'étudier dans cette partie de l'étude.

VII.1. Fractionnement et purification

VII.1.1. Fractionnement

L'extrait alcalin SSP (Soda Soluble Polysaccharide, Figure III.10) est composé essentiellement du xylose (36.6%) et il renferme aussi une quantité importante d'acides uroniques (49.4%). Cette composition laisse supposer l'existence soit d'une xylane fortement acide, soit d'un mélange de polysaccharides plus au moins acides contenant du xylose. C'est pourquoi nous avons tenté de fractionner cet extrait en fonction des teneurs en acide. Un tel

fractionnement peut être réalisé par chromatographie d'échange d'ions comme pour les polysaccharides pectiques. C'est ainsi le même mode opératoire, sans l'étape de saponification, a été adopté (Figure III.25).

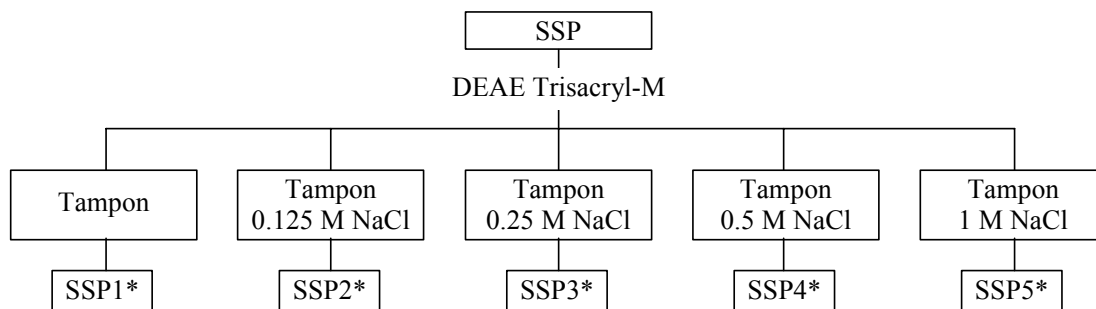


Figure III. 29: Schéma de fractionnement de l'extrait alcalin (SSP)

Le tableau III.19 regroupe les pourcentages des fractions récupérées lors de ce fractionnement.

Tableau III. 19 : Rendement du fractionnement chromatographique de la fraction SSP

| Eluant | Fraction | % (massique) |
|-----------------------|----------|--------------|
| Tampon | SSP1* | 47 % |
| Tampon + 0,125 M NaCl | SSP2* | 13 % |
| Tampon + 0,25 M NaCl | SSP3* | 25 % |
| Tampon + 0,5 M NaCl | SSP4* | 3 % |
| Tampon + 1 M NaCl | SSP5* | traces |

D'après ces rendements, on constate qu'effectivement l'extrait alcalin SSP est composé d'un mélange de plusieurs fractions plus au moins acides. La fraction majoritaire SSP1* a été éluée avec le tampon seul. Cette fraction constitue, d'un point de vue pondéral, 44,7 % de la prise d'essai, ce qui correspond à 53,4 % de l'ensemble des fractions récupérées.

D'autres fractions éluées avec une force ionique croissante ont été récupérées avec des rendements plus au moins importants. Ces fractions sont vraisemblablement acides et proviennent sans doute des protopectines résiduelles qui étaient intimement associées à la paroi cellulaire et qui n'ont pas été extraites à l'acide. Le spectre carbone-13 de la fraction SSP3* est reporté sur la figure III.26, et il montre que cette fraction est composée d'un oligosaccharide de nature pectique riche en acide galacturonique. C'est pourquoi on peut considérer que la

fraction SSP1* représente à elle seule la fraction hémicellulosique proprement dite et par conséquent nous nous sommes intéressés uniquement à l'étude de cette fraction.

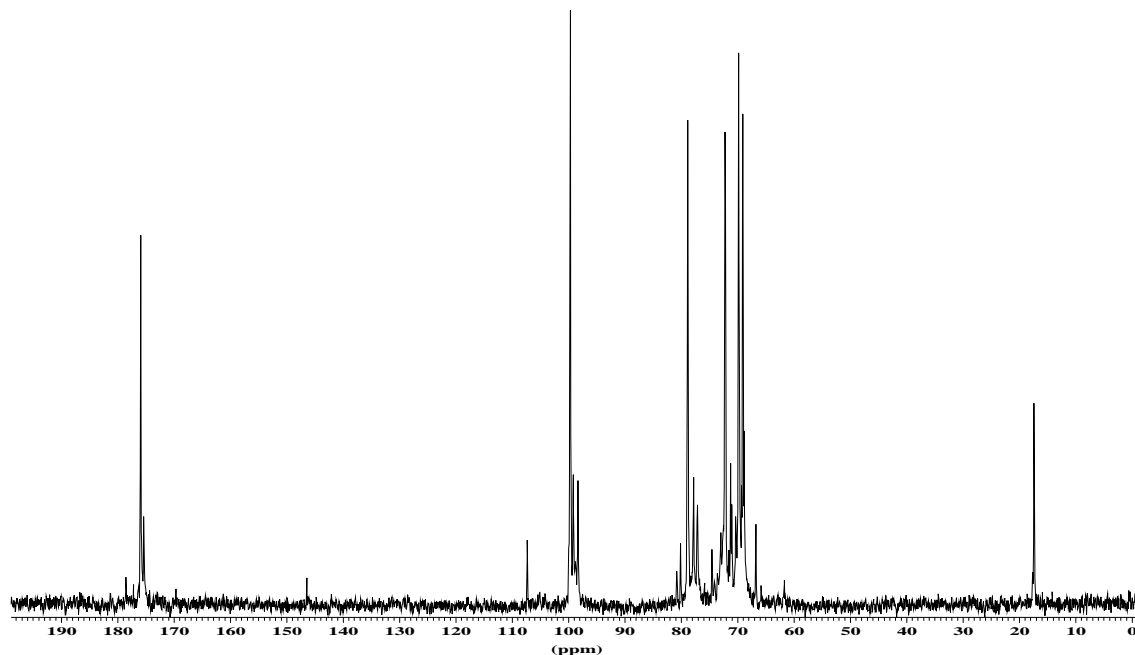


Figure III. 30: Spectre ^{13}C de la fraction SSP3* (D_2O à 333K, 300 MHz)

VII.1.2. Purification

La fraction hémicellulosique SSP1* a été purifiée par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Biogel P-6 comme décrit sur le paragraphe VII de la partie expérimentale. La fraction purifiée est notée SSP1.

VII.2. Caractérisation

VII.2.1. Dosage de sucres

Les sucres neutres et acides ont été déterminés par les méthodes classiques décrites dans le paragraphe III de la partie expérimentale. Le tableau III.20 regroupe les résultats obtenus et nous avons reportés aussi la composition de l'extrait alcalin brut à titre comparatif.

Tableau III. 20: Composition en sucres de la fraction hémicellulosique SSP1

| Fraction | Sucres neutres et acides (% massique) | | | | | |
|----------|---------------------------------------|-----|------|--------|-----|------|
| | AU | Rha | Glc | Gal | Ara | Xyl |
| SSP | 49.4 | – | 0.9 | traces | 1.3 | 36.6 |
| SSP1 | 26.6 | – | 2.09 | – | – | 71.4 |

L'analyse des sucres neutres et acides a révélé une prédominance du xylose (71.4 %) dans la fraction SSP1 et l'existence, tout de même, d'une teneur importante en acide uronique (26.6%), bien que cette fraction n'ait pas été retenue par le support ionique. Une augmentation de la teneur en xylose et une diminution de la teneur en acide uronique par rapport à l'extrait brut sont constatées.

La composition en oses neutres et acides de la fraction hémicellulosique SSP1 laisse supposer que la fraction est constituée d'une xylane acide. L'acide qui peut éventuellement exister est soit l'acide glucuronique soit son dérivé 4-O-méthylé, mais à ce stade de l'étude on ne peut pas démontrer l'existence de l'un ou l'autre.

Le rapport molaire entre le xylose et l'acide est une des caractéristiques des glucuronoxylanes. Pour notre cas, et d'après l'analyse des sucres, ce rapport est estimé à $Xyl/AU = 6.5$.

L'analyse par méthylation de cette fraction ne nous a pas semblé nécessaire dans la mesure où nous avons effectué une caractérisation par spectroscopie RMN.

VII.2.2. Etude par spectroscopie RMN

Le spectre ^{13}C , reporté sur la figure III.31, est d'une grande simplicité. On constate la présence de cinq signaux majoritaires à 102.39, 77.17, 74.47, 73.45 et 63.74 ppm qui correspondent respectivement aux carbones C-1, C-4, C-3, C-2 et C-5 des résidus xylose liés β -(1 \rightarrow 4). D'autres signaux moins intenses sont aussi présents dont des signaux caractéristiques de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique qui sont facilement repérables à 98.30, 83.05, 72.12, 177.16 et 60.31 ppm. Ces signaux sont attribués respectivement aux carbones C-1, C-4, C-2, fonctions carboxyliques et au groupement méthyle. Ces résidus acides sont, habituellement, portés en position O-2 de certains résidus xylose de la chaîne principale. Ces unités xylose substituées sont caractérisées par la présence de signaux caractéristiques à 101.97 et 77.42 ppm attribués aux carbones C-1 et C-2 respectivement.

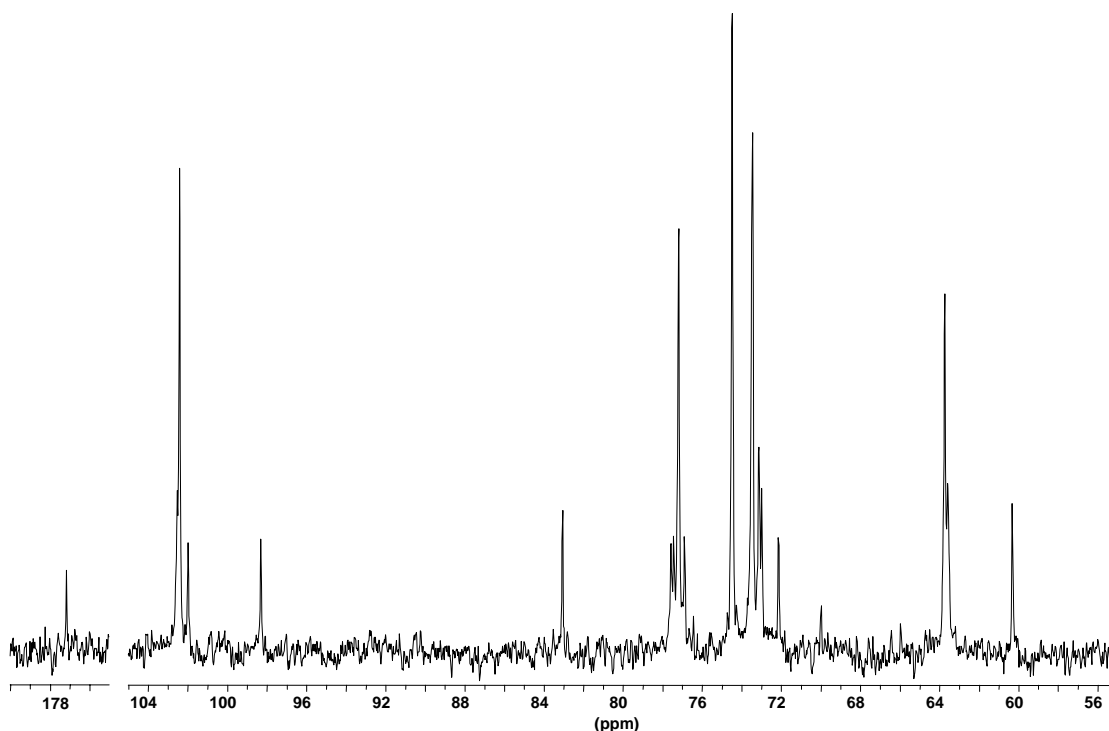


Figure III. 31: Spectre ^{13}C de la fraction SSP1 (D_2O à 333K, 300 MHz)

Sur le spectre ^1H , reporté sur la figure III.32, on retrouve la même situation, c'est-à-dire, des signaux majoritaires attribués aux résidus xylose de la chaîne principale et non substitués, et d'autres signaux minoritaires attribués aux résidus xylose de la chaîne principale substitués en position O-2 et aux unités acide 4-O-méthyl-glucuronique qui constituent les ramifications. Dans la région des anomériques par exemple on constate la présence de trois doublets à 4.38, 4.53 et 5.16 ppm attribués respectivement aux protons anomériques (H-1) des résidus : xylose liés β -(1 \rightarrow 4) non substitués, xylose liés β -(1 \rightarrow 4) substitués en position O-2 et acide 4-O-méthyl-glucuronique. L'attribution de l'ensemble des résidus est reportée sur le tableau III.21.

La mesure des surfaces des signaux protons ou des signaux ^{13}C , lorsque les acquisitions ont été réalisées dans des conditions quantitatives, permet d'établir les pourcentages relatifs de chaque résidu d'une façon assez précise. Nous avons effectué ces mesures au niveau des protons et des carbones anomériques. D'après les dosages déterminés par RMN ^{13}C quantitatif on trouve un rapport Xyl/4-O-Me-GlcA = 5.8. Le rapport trouvé d'après le spectre ^1H est cohérent car il est de Xyl/4-O-Me-GlcA = 6.

D'après l'ensemble de ces résultats on peut conclure que la fraction hémicellulosique SSP1 est une 4-O-Me-glucuronoxylane dont un résidu xylose sur six est substitué par un acide 4-O-Me-glucuronique.

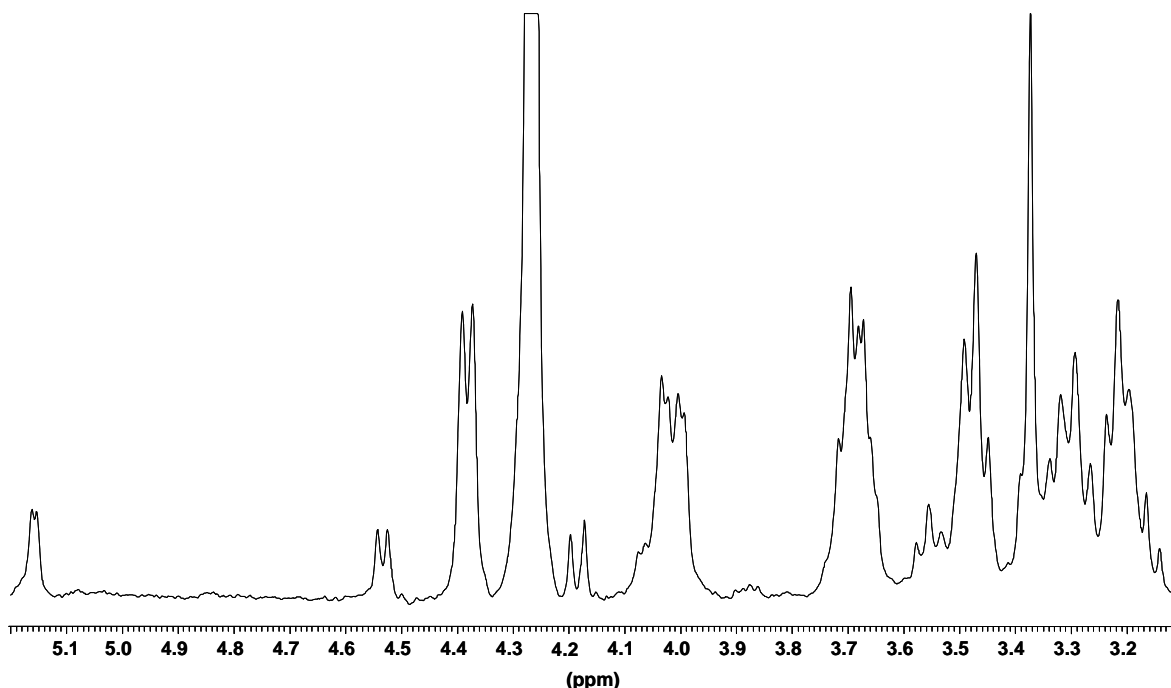


Figure III. 32: Spectre ^1H de la fraction SSP1 (D_2O à 333K, 300 MHz)

Tableau III. 21: Déplacements chimiques des différents résidus glycosidiques de la fraction SSP1

| Résidus glycosidiques | Déplacements chimiques (ppm) | | | | | |
|-----------------------|------------------------------|--------|-------|-------|-------|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| →4)-β-D-Xylp-(1→ | ^1H | 4.38 | 3.21 | 3.47 | 3.69 | H_{eq} : 4.00 / H_{ax} : 3.29 |
| | ^{13}C | 102.39 | 73.45 | 74.47 | 77.17 | 63.74 |
| →2.4)-β-D-Xylp-(1→ | ^1H | 4.53 | 3.44 | 3.55 | 3.71 | H_{eq} : 4.03 / H_{ax} : 3.33 |
| | ^{13}C | 101.97 | 77.42 | 72.95 | 76.88 | 63.59 |
| 4-O-Me-α-D-GlcpA-(1→ | ^1H | 5.16 | 3.49 | 3.67 | 3.16 | 4.18/ OCH_3 : 3.37 |
| | ^{13}C | 98.30 | 72.12 | 77.56 | 83.05 | 73.10 |
| | | | | | | OCH_3 : 60.31/C-6: 177.16 |

V.II.3. Conclusion

L'étude de la fraction alcalino-soluble extraite de la pelure de la figue de barbarie a montré qu'elle est composée majoritairement d'un polysaccharide de nature hémicellulosique. L'analyse par dosage de sucres et par spectroscopie RMN du proton et du carbone-13 de cette fraction hémicellulosique nous a permis de déterminer et d'élucider sa

composition et sa structure. Cette étude a confirmé qu'il s'agit d'une 4-O-méthyl-D-glucurono-(1→2)-β-D-(1→4)-xylane dont un résidu xylose sur six est substitué par l'acide 4-O-méthylglucuronique. Nous n'avons pas mis en évidence dans nos fractions de polysaccharide de nature xyloglucanes comme c'est le cas dans les parois primaires des dicotylédones.

Dans le tableau II.10 du chapitre précédent, nous avons reportés des exemples de 4-O-méthylglucuronoxylanes isolées de différentes sources végétales et nous pouvons remarquer que la plupart d'entre elles sont isolées de tissu de parois secondaire ou de mucilages. Parmi ces exemples, seuls Dinand *et coll.* ont mis en évidence, pour la première fois en surface des microfibrilles de parenchyme de la pulpe de betterave, la présence d'une 4-O-Me-glucuronoxylane de structure et de taux de ramification similaires [111]. Ces composés (xylanes) sont considérés comme des constituants des parois secondaires. Elles sont en général peu fréquentes dans les parois primaires, où les hémicelluloses sont en majorité composés de xyloglucanes.

VIII. Etude de la fraction cellulosique

A la différence des « cellules nues » des animaux, dont le cytoplasme est seulement limité par la membrane cytoplasmique (*plasmalemme*), les cellules des plantes et des bactéries sont des « cellules revêtues » car elles secrètent autour de leur plasmalemme une enveloppe continue et solide formant un écran périphérique : la paroi. Cette paroi est un édifice hétérogène toujours constitué chez les plantes vasculaires par une armature microfibrillaire de cellulose enrobée dans une matrice amorphe de composition polysaccharidique variable et complexe. Cette paroi assure à la fois une double fonction qui peut paraître paradoxale : elle doit assurer à la fois l'extension de la cellule c'est à dire le développement de la plante, et permettre le soutien c'est à dire le squelette. Les microfibrilles de cellulose jouent un rôle clé dans la consolidation et le maintien de cette structure cellulaire [250].

Après les différentes étapes d'extraction on récupère un résidu cellulosique constitué d'un ensemble de parois cellulaires que nous nous proposons de caractériser.

VIII.1. Microscopie

À l'issue de la séquence d'extraction réalisée sur la pelure de la figue de barbarie, on obtient un résidu enrichi en cellulose. Ce résidu constitue jusqu'à 27% de la matière sèche et d'un point de vue composition osidique il est constitué essentiellement de glucose (92%).

Dans la pelure de la figue de barbarie, les parois végétales sont constituées d'un empilement de cellules dont la cohésion est assurée par des ciments, essentiellement de nature pectique, qui constituent la lamelle mitoyenne (Figure III.33). Cette charpente cellulaire a été, au cours des différentes extractions, progressivement déstructurée suite à la solubilisation de ces polysaccharides pectiques et on obtient finalement des cellules individualisées.

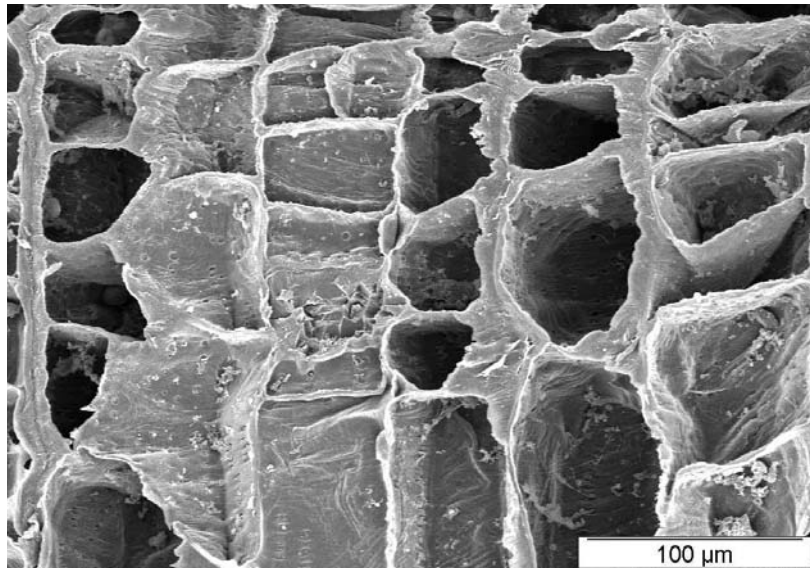


Figure III. 33 : Coupe transversale de la pelure (MEB)

Ce résidu cellulosique apparaît au microscope optique comme un ensemble de cellules individualisées (Figure III.34). Il s'agit, en fait, de parois cellulaires désincrustées de tout autre polysaccharide pariétal.

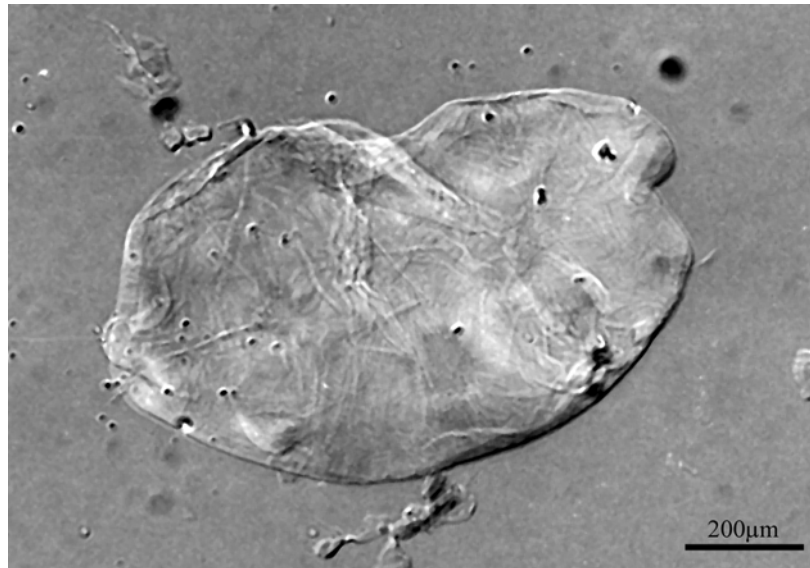


Figure III. 34: Cellule de parenchyme individualisée après purification (M. optique)

L'observation au microscope électronique à transmission (MET) de la surface de la paroi d'une cellule (Figure III.35) fait apparaître la constitution microfibrillaire de cette paroi. Les microfibrilles sont associées entre elles en lanières de tailles variables entrecroisées entre elles sans aucune orientation privilégiée. Cette texture est caractéristique des parois primaires.

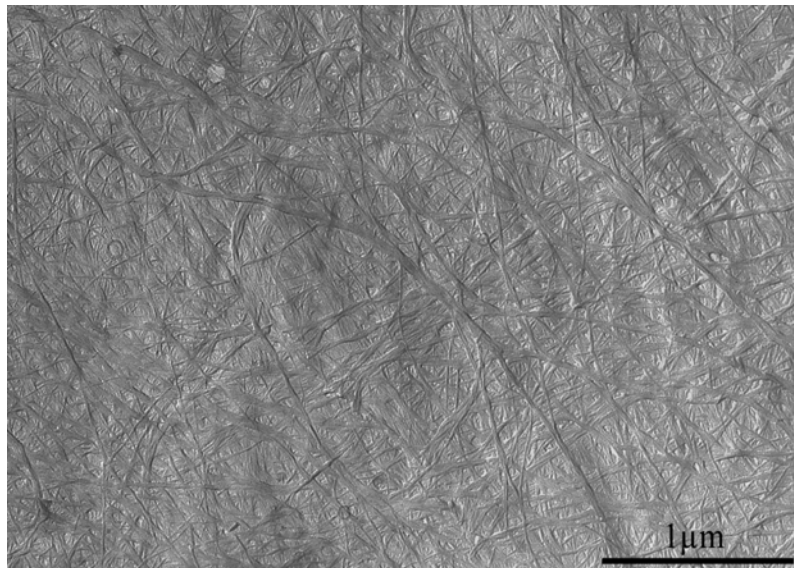


Figure III. 35 : Surface de la paroi cellulaire (MET)

VIII.2. Individualisation

Le résidu final CR (Cellulosic Residue) est composé d'un ensemble de parois cellulaires constituées elles mêmes d'une trame de microfibrilles. Ces microfibrilles sont stabilisées entre elles par des liaisons hydrogène qui peuvent être rompues par apport d'une énergie

chimique ou mécanique. Comme nous l'avons vu précédemment, le traitement à l'aide de l'homogénéisateur Manton-Gaulin consiste en un cisaillement mécanique qui permet une destruction de la structure des parois cellulaires. Les lanières constituées de microfibrilles de cellulose sont progressivement dissociées les unes des autres, puis elles mêmes déstructurées progressivement pour donner des microfibrilles plus ou moins désenchevêtrées.

La photographie reportée sur la figure III.36 est celle du résidu cellulosique obtenu à l'issue de traitement mécanique (à comparer à la figure III.34). On n'observe plus la structure d'enchevêtrement de la paroi mais des microfibrilles individualisées. L'homogénéisateur Manton-Gaulin permet donc de transformer une suspension de cellules en une suspension de microfibrilles de cellulose plus ou moins individualisées.

Ces microfibrilles sont des éléments fins ayant des dimensions de taille très hétérogènes. Leur largeur moyenne est de l'ordre de 2-3 nm et dont la longueur peut atteindre plusieurs microns.

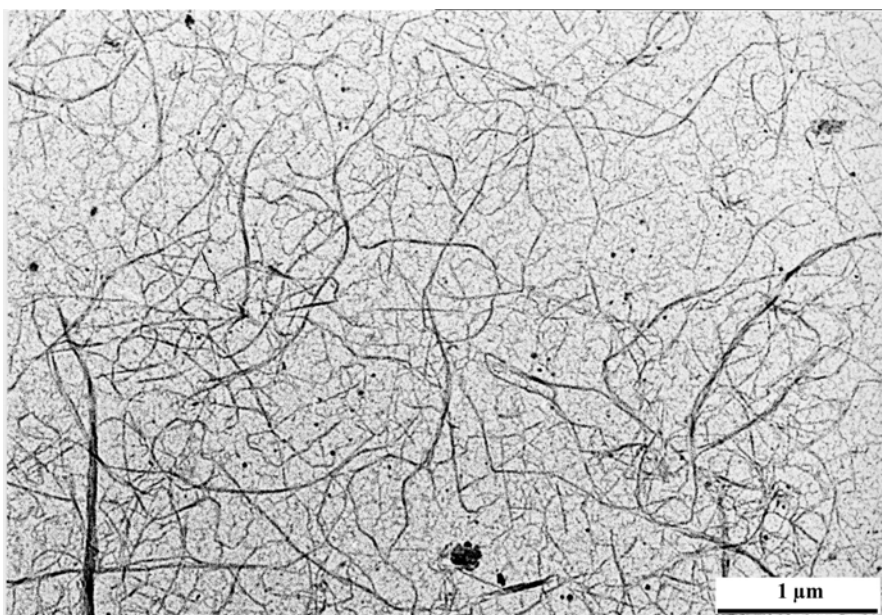


Figure III. 36: Microfibrilles de cellulose individualisées à l'issue du traitement mécanique au Maton-Gaulin

L'observation après coloration par l'acétate d'uranyle révèle que ces lanières sont constituées elles mêmes d'un assemblage de plusieurs microfibrilles élémentaires (Figure III.37). Les largeurs de ces microfibrilles élémentaires sont de l'ordre de 30-50 Å. Cette association en plusieurs microfibrilles existe depuis la biosynthèse de la cellulose dans la

cellule. Le traitement à l'homogénéisateur Manton-Gaulin permet de séparer plus au moins ces entités élémentaires.

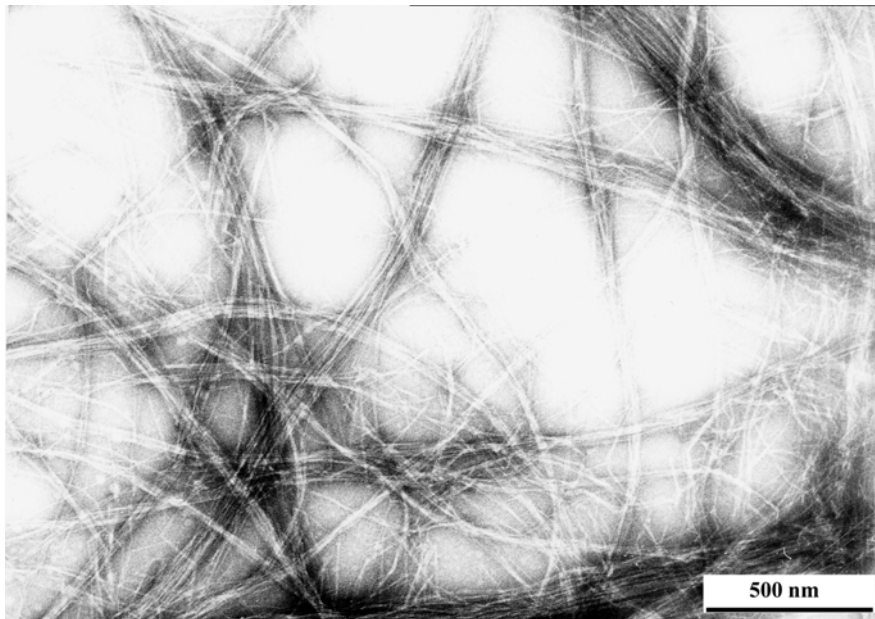


Figure III. 37: Microfibrilles de cellulose individualisées colorées à l'acétate d'uranyle

VIII.3. Caractérisation des microfibrilles de cellulose

VIII.3.1. En suspension

Après différentes étapes de purification chimique, on obtient des suspensions de parois cellulaires purifiées et bien individualisées. Ces suspensions dans l'eau ne sont pas stables car elles décantent avec le temps. Cependant après le traitement mécanique à l'aide de l'homogénéisateur Manton-Gaulin, qui permet d'extraire les lanières des parois et d'individualiser progressivement les microfibrilles de cellulose, on obtient des suspensions dans l'eau qui sont stables avec le temps (Figure III.38). A faible concentration (de l'ordre de 2 %) les suspensions ont l'aspect d'un gel consistant et opaque et possèdent des propriétés rhéologiques intéressantes.

Ce procédé de préparation a fait l'objet d'un brevet d'innovation [251], et les propriétés de suspensions ont été exhaustivement étudiées par Dinand *et coll.* dans le cas des microfibrilles de cellulose issue de la pulpe de betterave [56, 163, 252]. Les auteurs ont démontré que ces suspensions de microfibrilles ont des propriétés rhéologiques supérieures à certains polysaccharides (xanthane, caroube, carboxyméthylcellulose...) utilisés dans l'industrie. Nous avons une situation similaire et une grande ressemblance entre les deux matériaux qui semblent avoir les mêmes propriétés. D'ailleurs, les auteurs ont mis en

évidence que ce sont les glucuronoxylanes résiduelles en surface des microfibrilles qui sont à l'origine de cette stabilité. Ces mêmes glucuronoxylanes que nous avons pu isoler et caractériser au cours de cette étude.



Figure III. 38 : Photographie d'une suspension ($\approx 0.3\%$) de microfibrilles de cellulose

VIII.3.1. Degré de polymérisation

La masse moléculaire ou le degré de polymérisation ont été déterminés par viscosimétrie en utilisant la CED comme solvant de la même façon que pour la cellulose du péricarpe de la graine. La masse viscosimétrique trouvée est en moyenne de 130000 g/mol ce qui correspond à un degré de polymérisation viscosimétrique de l'ordre de 850.

VIII.3.2. Cristallinité

VIII.3.2.1. Diffraction des rayons- X

Le cliché de diffraction des rayons-X obtenu pour les microfibrilles de cellulose de la pelure est représenté sur la figure III.39. On distingue quatre anneaux à 3.9, 4.4, 5.4 et 6.0 Å qui correspondent respectivement aux plans (020), (102), (110) et (110) et qui confirme qu'il s'agit de la cellulose I. Nous avons reporté le cliché de diffraction enregistré dans les mêmes conditions pour les monocristaux de la cellulose de tunicier. On remarque nettement la différence de définition des raies entre les microfibrilles et la cellulose de tunicier. On constate que pour les microfibrilles de cellulose, les deux anneaux les plus proches du centre et qui correspondent aux plans équatoriaux, sont confondus. Ceci traduit un ordre latéral faible qui est lié au fait que les microfibrilles ont de faibles sections et donc une faible

crystallinité. Ainsi, on se référant à l'équation de Segal, l'indice de cristallinité de la cellulose de microfibrilles issues de la paroi primaire de cellules de parenchyme de la pelure est de l'ordre de 35%.

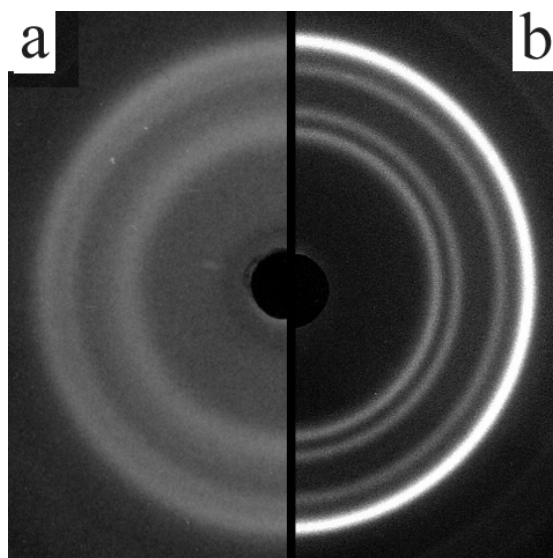


Figure III. 39 : Clichés de diffraction des rayons-X (a) microfibrilles de cellulose de la pelure (b) cellulose de tunicine

VIII.3.2.2. Spectroscopie RMN du solide

Le spectre RMN du solide du résidu cellulosique homogénéisé au Manton-Gaulin est reporté sur la figure III.40. On remarque que ce spectre est moins bien résolu que celui de la cellulose du péricarpe, ou que les spectres obtenus dans le cas des deux phases I_{α} et I_{β} (représentés sur les figures II.23 et II.24). On constate cependant la présence des signaux caractéristiques des différents résidus de la cellulose. Au niveau des signaux attribués aux carbones C-4 et C-6, on peut remarquer que les épaulements caractéristiques des chaînes désordonnées ou de surface sont plus importants pour cette cellulose ce qui suggère qu'elle renferme plus de chaînes de surface.

De la même façon que pour la cellulose du péricarpe, la déconvolution de ce spectre permet d'estimer d'une part les proportions des deux phases I_{α} et I_{β} constitutives de la cellulose native et d'autre part le degré de cristallinité (IC). On trouve par RMN du solide pour les microfibrilles de cellulose issues de la pelure de la figue de barbarie les résultats ci-dessus:

$$I_{\alpha} = 60 \% \quad I_{\beta} = 40 \% \quad IC = 36 \%$$

Comme toutes les plantes supérieures la cellulose de la pelure du figuier de barbarie est riche en phase I_{α} . Par ailleurs la valeur de l'indice de cristallinité est proche de celle trouvée par la relation de Segal par rayons-X. En général pour les plantes à fleur les proportions des chaînes de surface, qui déterminent aussi le degré de cristallinité, sont importantes en raison des faibles dimensions latérales des microfibrilles constitutives. Ces valeurs sont identiques à celles trouvées pour les microfibrilles de cellulose de parenchyme de la pulpe de betterave sucrière.

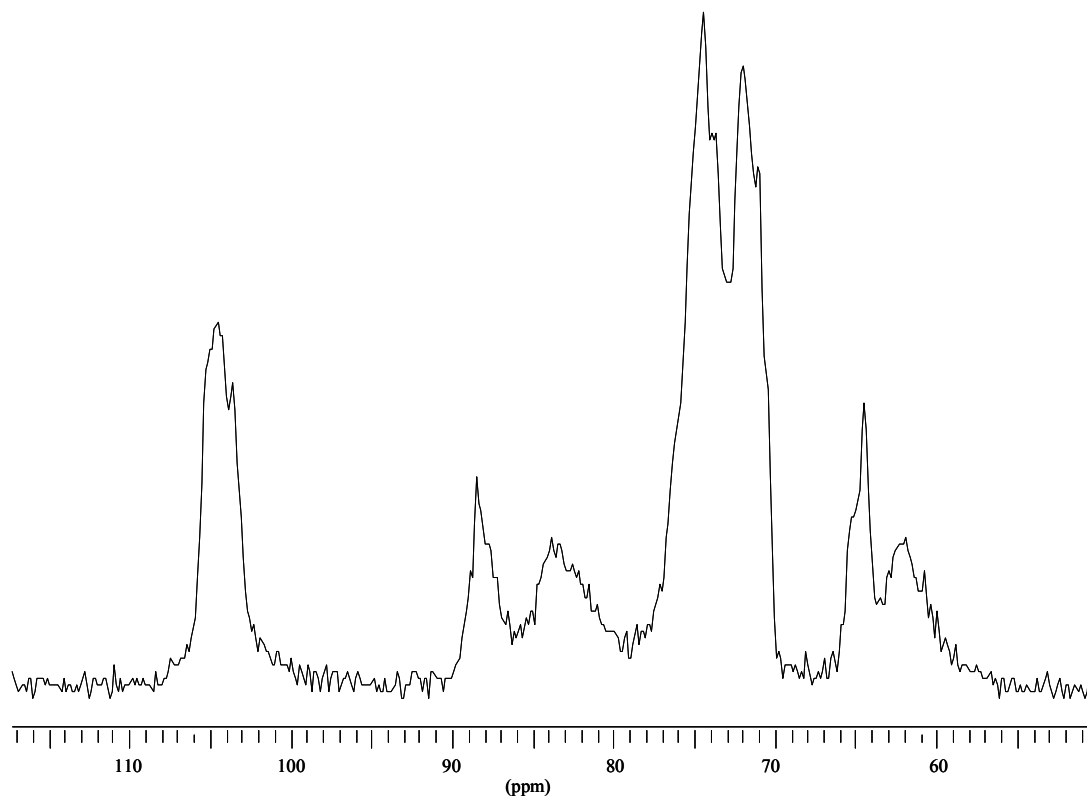


Figure III. 40 : Spectre CP/MAS de la cellulose de la pelure du figuier de barbarie

VIII.3.3. Conclusion

Le résidu cellulosique obtenu à partir de la pelure de la figue de barbarie après solubilisation des autres polysaccharides et purification a été caractérisé par dosage de sucres et par microscopie. Il apparaît qu'il est constitué de parois cellulaires constituées d'une trame de lanières de microfibrilles de cellulose associées entre elles sans orientation privilégiée. Après déstructuration et défibrillation de cette armature à l'aide de l'homogénéisateur mécanique Manton-Gaulin on observe une individualisation progressive de ces microfibrilles de cellulose. L'analyse de ces éléments microfibrillaires par microscopie a révélé une large distribution en taille. La caractérisation par RMN du solide et par diffraction

des rayons-X a montré que ces microfibrilles sont moyennement cristallines avec une grande proportion de chaînes de surface étant donné leurs dimensions latérales qui correspondent à une association de 15 à 30 chaînes de cellulose par microfibrilles.

IX. Conclusion générale

Les différents polysaccharides pariétaux de la pelure de la figue de barbarie ont été isolés et étudiés. Nous avons pu montrer la richesse de cette pelure en différentes familles de polysaccharides. Le mucilage, largement répandu dans les cactacées, a été structurellement caractérisé. Il est constitué majoritairement d'une arabinogalactane de type I. Ce polysaccharide peut trouver de multiples applications en vertu de ses propriétés émulsifiantes ou médicales. Par ailleurs, une étude pharmacologique de ce polysaccharide est en cours.

Quant aux polysaccharides de nature pectique, la pelure renferme une quantité importante de pectines dont la structure est proche de la plupart des autres pectines. Ces pectines sont constituées d'une alternance de blocs d'homogalacturonanes et de rhamnogalacturonanes. Ces derniers blocs portent par endroit des ramifications constituées de courtes chaînes de galactane et/ou d'arabinanes.

Les hémicelluloses majoritaires dans la pelure du figuier de barbarie appartiennent à la famille des 4-O-méthylglucuronoxylanes dont le taux de ramification est estimé à une unité acide pour six unités xylose.

Le résidu cellulosique est constitué de microfibrilles de cellulose dont les suspensions dans l'eau sont très stables et dotées de propriétés rhéologiques intéressantes. Ceci, ainsi que leur biocompatibilité, permet d'envisager leur valorisation dans plusieurs domaines (agroalimentaire, médical, pharmaceutique et cosmétique) comme des agents de maintien, de texture, de stabilisation ou comme excipient dans le cas d'aliments, de pommades, de médicaments et de crèmes.

A l'exception du mucilage, nous avons pu constater au cours de cette étude une grande similitude entre les polysaccharides pariétaux de la pelure du figuier de barbarie et ceux de la pulpe de la betterave sucrière.

Au cours de cette étude structurale nous avons mis au point un mode opératoire pour extraire des fractions pectiques hautement gélifiantes tout en isolant le mucilage et en préservant les propriétés rhéologiques des microfibrilles de cellulose.

CHAPITRE IV

MODIFICATION CHIMIQUE DE LA

CELLULOSE

I. Introduction

La protection de l'environnement est devenue aujourd'hui une priorité de tous les gouvernements. Il est important de préserver les ressources naturelles, en particulier les matières fossiles et de promouvoir l'exploitation des bio-ressources renouvelables, en particulier végétales. Les cultures de cellules végétales, les fermentations ou la modification chimique ou enzymatique sont autant de procédés biotechnologiques substitutifs attrayants visant le développement de nouveaux débouchés pour ces bio-ressources.

La cellulose est le polymère naturel le plus abondant synthétisé sur terre au cours de chaque cycle photosynthétique. Son abondance naturelle est estimée à 50-100 milliards de tonnes par an. En vertu de ses potentialités chimiques bien connues, la cellulose demeure, malgré l'essor considérable des polymères synthétiques, le matériau renouvelable le plus utilisé dans l'industrie. Depuis le tout début du siècle dernier, alors que les connaissances sur la structure et la morphologie qui gouverneraient éventuellement la réactivité de la cellulose progressaient, sa modification chimique s'est développée malgré le peu d'informations disponibles. Avec les avancées technologiques connues ces dernières années ainsi que le développement de l'état des connaissances des différents aspects de la cellulose, les dérivés de la cellulose se sont multipliés avec une croissance considérable. Ces dérivés qui trouvent des applications dans divers domaines pharmaceutiques, agroalimentaires, papeteries, textiles ou chimiques....

Parmi les réactions développées, l'oxydation des fonctions alcools contenus dans les carbohydrates et en particulier dans la cellulose, a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années. D'une part pour les propriétés intéressantes de ces polysaccharides oxydés, et d'autre part pour la possibilité de poursuivre la modification sur le support polysaccharidique oxydé par une vaste gamme de produits via, entre autres, des estérifications ou des amidations. C'est ainsi que nous avons opté, dans le but de modifier chimiquement la cellulose, pour l'oxydation dans un premier temps puis l'amidation, des fonctions carboxyliques ainsi créés. Cette partie sera donc consacrée à des données bibliographiques sur ces deux réactions chimiques, suivies d'une partie expérimentale.

II. Première partie : oxydation sélective de la cellulose

II.1. Généralités sur l'oxydation des alcools

L'oxydation d'un alcool, en aldéhyde ou acide correspondant, est réalisée selon plusieurs procédés et la liste des réactifs utilisés est loin d'être limitée. Cependant, le choix devient restreint si l'on impose des critères de sélectivité ou de conditions opératoires douces.

Il existe un grand nombre de méthodes pour oxyder sélectivement un alcool secondaire en présence d'un alcool primaire, mais relativement peu d'entre elles décrivent l'oxydation sélective des alcools primaires sans affecter les alcools secondaires. On retient, parmi les rares oxydants hydrosolubles capables d'atteindre de tel objectif, les sels d'oxoammonium. Ces médiateurs chimiques des réactions d'oxydation sont eux même générés *in situ* par oxydation des radicaux nitroxydes.

II.1.1. Les radicaux nitroxydes et leurs sels d'oxoammonium

Les radicaux nitroxydes sont des radicaux organiques qui continuent à jouer un rôle central parmi les radicaux libres stables. Le premier radical nitroxyde, le sel de Frémy, fut isolé en 1845, et très tôt après il a été utilisé pour oxyder les phénols en quinones. Cependant l'intérêt pour ces radicaux s'est considérablement accru avec le développement de la RPE, où ils ont été introduits comme marqueurs de spin (spin label). Ils ont également été utilisés dans les processus de polymérisation radicalaire où ils servent de pièges de radicaux. Actuellement, d'autres applications très prometteuses se développent, en particulier pour les radicaux nitroxydes dotés d'un centre chiral. Ils sont utilisés dans l'élaboration de cristaux liquides paramagnétiques, ou dans les réactions de couplages stéréosélectifs de radicaux prochiraux et surtout dans la catalyse énantiosélective d'oxydation [253].

II.1.1.1. Structure

Leur structure chimique de base est représentée sur la figure IV.1 où l'atome d'azote du radical peut être substitué par des groupements alkyles (primaires, secondaires ou tertiaires), des fonctions éthers, thioéthers, amines, des dérivés du phosphore ou du silicium...

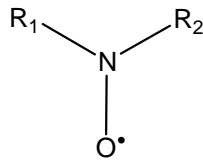


Figure IV. 1 : Structure primaire d'un radical nitroxyde

II.1.1.2. Stabilité

Certains de ces nitroxydes se classent parmi les rares radicaux libres stables qui peuvent être isolés sous forme pure, stockés et manipulés. La distribution de trois électrons π sur deux centres atomiques, selon les formules de résonances mésomères de la figure IV.2, explique cette stabilité. Elle est gouvernée par la nature des substituants en α, α' de l'azote. Par exemple, des réactions de dismutation, conduisant à l'hydroxylamine et une nitrone, sont observées quand un ou plusieurs hydrogènes sont présents. Parmi les nitroxydes connus, ceux qui présentent des hétérocycles azotés comme les pyrrolidines, oxazolidines et pipéridines sont généralement très stables.

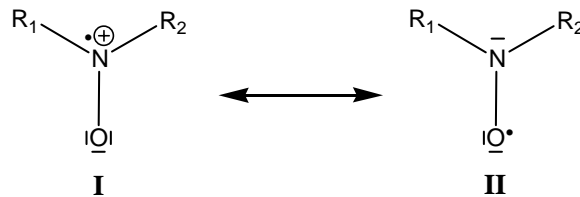


Figure IV. 2 : Formes mésomères limites d'un radical nitroxyde

II.1.1.3. Réactivité

La nature des substituants en α, α' de l'azote peut moduler la réactivité de ces radicaux nitroxydes. C'est ainsi que des groupements électro-donneurs rendent le radical pratiquement inerte chimiquement, alors que des groupements électro-attracteurs vont lui conférer une forte réactivité chimique, en favorisant la formation du mésomère II. Cette forme mésomère peut être aussi bien oxydée en ion oxoammonium que réduite en hydroxylamine selon les processus suivants :

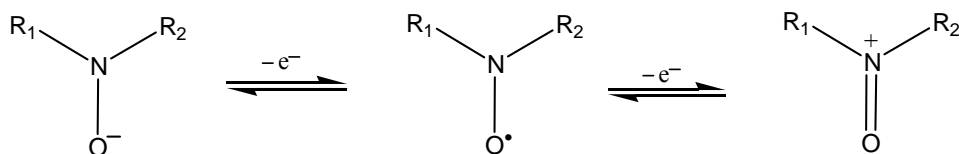


Figure IV. 3 : Oxydoréduction du radical nitroxyde

La stabilité de l'ion oxoammonium ainsi formé est assurée par la présence du contre-ion qui porte et la nature des substituants en γ de l'azote. Sa principale instabilité est due à la

présence en cette position d'un groupement attracteur d'électrons en l'occurrence un carbonyle. En effet, en présence d'une base même très faible, une élimination de type Hofmann peut avoir lieu conduisant à la formation de dérivés nitrosés. Pour cette raison les sels d'oxoammonium sont généralement préparés *in situ* à partir du radical.

C'est ainsi que les di-*tert*-alkyl nitroydes sont devenus d'un emploi courant dans les réactions d'oxydation. Cependant, les sels d'oxoammonium les plus étudiés ont été, de très loin les sels de 1-oxo-2,2,6,6-tétraméthylpipéridinium, issus du radical 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle appelé communément TEMPO, et ses dérivés substitués en position 4.

Ces sels d'oxoammonium réagissent avec de nombreux groupes fonctionnels comme les alcools, amines, phosphines, phénols, cétones, sulfures, par contre ils sont inertes vis-à-vis des éthers et des oléfines. Ils peuvent être employés en quantité stoechiométrique ou catalytique.

II.1.2. Oxydation des alcools par les sels d'oxoammonium

Les sels d'oxoammonium di-*tert*-alkylés, TEMPO en particulier, formés *in situ* oxydent les alcools primaires et secondaires dans des conditions douces, catalytiques, et sont chimio et régiosélective. Dans certaines conditions, il est possible d'oxyder sélectivement un alcool primaire en présence d'un alcool secondaire et permettent d'obtenir l'aldéhyde sans sur-oxydation en acide carboxylique, ou d'obtenir l'acide directement à partir des alcools primaires. Cependant, cette dernière oxydation met en jeu deux électrons et nécessite donc l'emploi d'un oxydant auxiliaire capable de régénérer l'ion oxoammonium introduit en quantité catalytique, bien qu'une oxydation de l'hydroxylamine soit possible.

Parmi les divers oxydants secondaires utilisés, le système [hypochlorite de sodium/bromure de sodium] avec le radical TEMPO reste le plus étudié actuellement. L'ion hypobromite est beaucoup plus réactif que l'ion hypochlorite et permet ainsi la régénération rapide de l'ion oxoammonium, d'où l'introduction du bromure de sodium.

Le cycle réactionnel adopté pour l'oxydation des alcools primaires est largement schématisé sur la figure IV.4. Néanmoins, le mécanisme de l'étape d'oxydation de l'alcool par l'ion oxoammonium est mal élucidé. Certains suggèrent la formation d'un intermédiaire de type carbocation, alors que la plupart des auteurs retiennent plutôt la formation d'un état de transition cyclique.

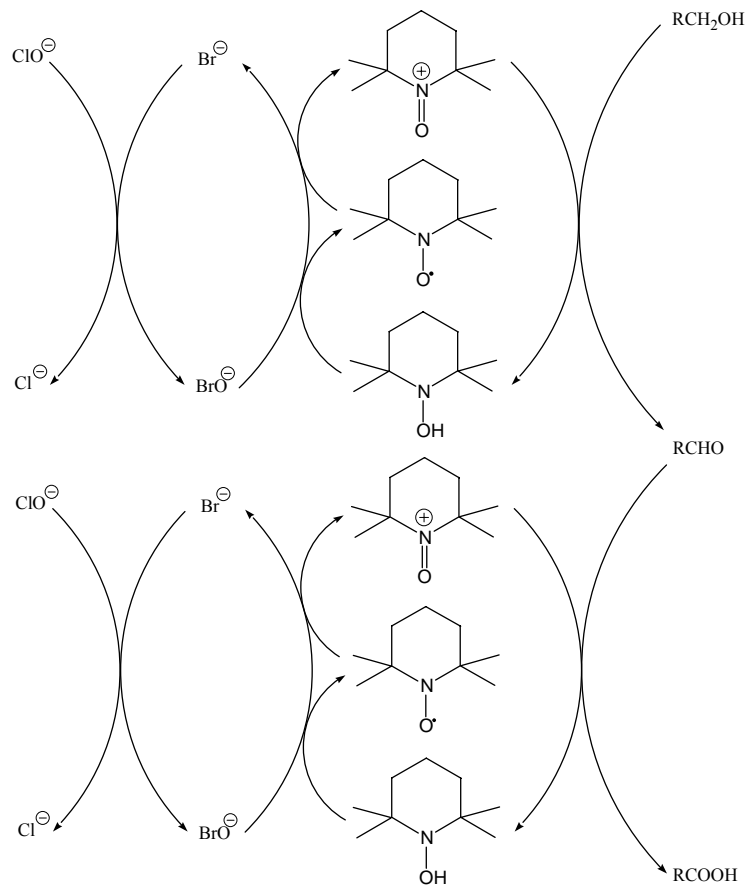


Figure IV. 4 : Cycle catalytique de l'oxydation des alcools primaires par le système TEMPO-NaOCl-NaBr

II.1.3. Oxydation des hydroxyles de la cellulose

Un grand intérêt s'est manifesté ces dernières années pour l'oxydation des hydroxyles des polysaccharides en carboxylates. Ceux-ci confèrent aux polysaccharides oxydés des propriétés gélifiantes, ou d'agents complexant des ions métalliques voire de super-absorbants avec de multiples applications allant de la détergence à la médecine.

Ainsi plusieurs méthodes d'oxydation ont été mises au point en vue d'oxyder les hydroxyles, parfois sélectivement, de divers polysaccharides tels que l'amidon, les pullulanes, l'amylose [254], les cyclodextrines [255, 256], ...

Comme tous les diols vicinaux, les hydroxyles secondaires en C-2 et C-3 du cycle glycosidique ont été oxydés par le périodate de sodium ou le tétraacétate de plomb en aldéhyde conduisant à une ouverture du cycle glycosidique. L'ajout de l'hypochlorite de sodium a permis d'atteindre les acides correspondants.

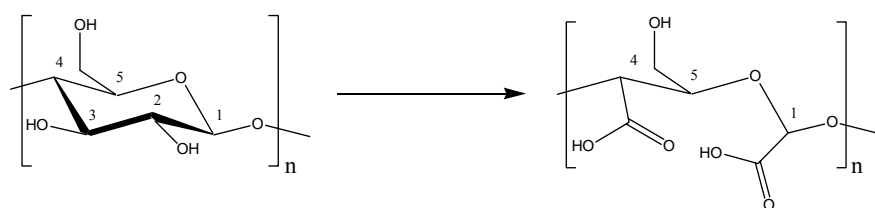


Figure IV. 5 : Oxydation des alcools en C-2 et C-3

Quant à l'oxydation sélective des hydroxyles primaires, deux voies principales de synthèse ont été utilisées depuis le début du siècle. Il s'agit, pour la première, de l'oxydation à l'aide du dioxyde d'azote gazeux [257, 258]. Cette dernière réaction se déroule dans des conditions sévères ce qui génère des réactions de dépolymérisation. Elle a donc été remplacée par l'utilisation du nitrite de sodium dans l'acide phosphorique. La véritable entité oxydante, l'oxyde d'azote NO^+ , est formée *in situ* à partir du nitrite de sodium qui est employé en quantités stœchiométriques. Cette méthode a été reconnue moins sélective et conduisant aussi à l'oxydation des hydroxyles secondaires, ce qui provoque des ouvertures de cycles et ainsi des dépolymérisations récurrentes. C'est pourquoi elle a été améliorée en utilisant le nitrate de sodium en quantités stœchiométriques au lieu du nitrite de sodium. Ce dernier n'est introduit qu'en quantités catalytiques dans le milieu pour amorcer le cycle réactionnel.

Plus récemment et étant donné leur grande sélectivité vis-à-vis de l'oxydation des alcools primaires, l'utilisation des sels oxoammonium, en particulier le radical TEMPO, ou plus précisément le système TEMPO–NaOCl–NaBr s'est généralisée. La première utilisation de ce système pour l'oxydation de quelques polysaccharides solubles dans l'eau (amidon, amylopectine et pullulane) a été reportée par De Nooy *et coll.* en 1995 [259].

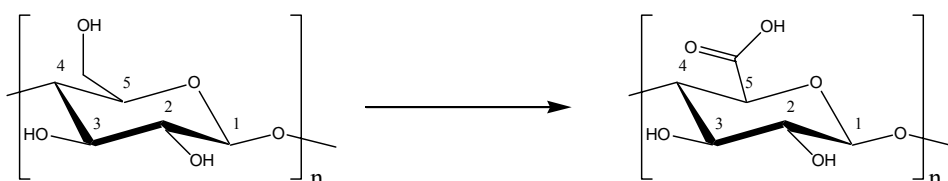


Figure IV. 6 : Oxydation des alcools primaires en C-6

II.1.4. Synthèse de l'acide polyglucuronique

La souche mutante M5N1 CS de *Rhizobium meliloti* produit un β -(1→4)-D-glucuronane partiellement acétylé. Ce polysaccharide est utilisé pour ses propriétés immunostimulantes. Plusieurs auteurs se sont intéressés, avant même la découverte de cette bactérie, à le

synthétiser chimiquement via l'oxydation de la cellulose. L'utilisation du nitrite de sodium s'est avérée une méthode de choix, mais elle est de plus en plus abandonnée au profit des sels d'oxoammonium en particulier le système TEMPO-NaBr-NaOCL. Le principal obstacle est l'insolubilité de la cellulose dans l'eau ou dans des solvants usuels. C'est pourquoi, en oxydant la cellulose native en phase hétérogène (solide-liquide), les rendements sont médiocres et les masses molaires du produit fini sont faibles. Pour pallier cet inconvénient, plusieurs auteurs ont eu recours à l'oxydation de substrats de cellulose régénérée. Ainsi de la viscosité à la cellulose mercerisée, les résultats se sont améliorés [260, 261].

Très récemment dans notre laboratoire, les premiers essais de l'oxydation de la cellulose issue de plusieurs sources et préalablement traitée à l'ammoniac (cellulose III) ont donné des résultats très encourageants et les rendements obtenus en acide polyglucuronique sont très satisfaisants.

Objectifs du travail

Nous avons utilisé la voie de synthèse en utilisant le système TEMPO-NaOCl-NaBr pour l'oxydation des alcools primaires à partir de cellulose de parenchyme préalablement traitée à l'ammoniac afin de préparer l'acide polyglucuronique.

II.2. Préparation et caractérisation de la cellulose III

II.2.2. Préparation de la cellulose III

La conversion de la cellulose native (allomorphe I) en cellulose III est réalisée par des traitements à l'aide de l'ammoniac ou encore à l'aide des amines (primaire, secondaire ou tertiaires). Cet allomorphe a été mis en évidence pour la première fois vers les années 1890. Il a ensuite été préparé par Bonner en 1905 en traitant la cellulose par l'ammoniac. Le produit fini a été décrit comme un complexe extrêmement réactif, et fut ainsi désigné par « cellulose activée ». En raison de cette réactivité accrue, cet allomorphe est largement utilisé pour préparer des dérivés esters ou éthers de la cellulose, par exemple pour préparer l'acétate de cellulose [62].

L'utilisation de l'ammoniac gazeux pour préparer la cellulose III est recommandée étant donné la facilité d'élimination de l'excès du réactif. A l'état gazeux, la réaction se déroule sous pression et à haute température, nécessitant ainsi du matériel adéquat dont nous ne disposons pas. C'est pourquoi nous avons plutôt utilisé l'ammoniac liquide. En imprégnant, les échantillons de cellulose dans l'ammoniac liquide pendant quelques heures

et en éliminant le reste de cet ammoniac, on arrive à des résultats satisfaisants. Le mode opératoire est détaillé dans la partie expérimentale.

II.2.3. Caractérisation de la cellulose III

II.2.3.1. Par diffraction des rayons X

Le passage [cellulose I → cellulose III] n'est en effet qu'un changement de l'état cristallin dû à un désordre dans l'orientation des chaînes moléculaires suite à la rupture des liaisons hydrogène par l'ammoniac. Il s'agit en fait de deux allomorphes de la cellulose. Cette transformation cristalline peut être donc contrôlée par diffraction des rayons-X.

Les clichés de diffraction des RX obtenus avant et après traitement à l'ammoniac liquide sont reportés sur la figure IV.7. Nous avons représentés également en tant que références, des clichés des échantillons commerciaux de cellulose I et III de linters de coton enregistrés dans les mêmes conditions.

Nous observons bien le changement de l'allure du cliché correspondant à la cellulose native après le traitement à l'ammoniac. En effet, on observe la disparition des quatre anneaux centraux caractéristiques de la cellulose I et l'apparition de trois anneaux caractéristiques des plans équatoriaux d'une maille monoclinique de la cellulose III. Ce cliché correspond parfaitement au cliché de référence d'un échantillon de cellulose. Nous pouvons ainsi dire qu'après imprégnation dans l'ammoniac liquide on a effectivement réalisé la transformation de la cellulose en cellulose III.

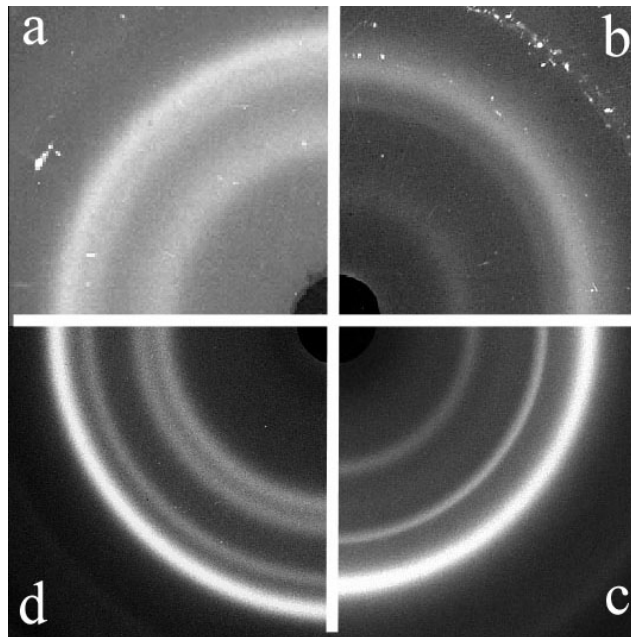


Figure IV. 7 : Clichés de diffraction des rayons-X de la cellulose :

Parenchyme (a)- native, (b)-traitée à l'ammoniac,

Linters de coton commerciales (c) : allomorphe III, (d): allomorphe-I

II.2.3.2. Par RMN solide

Comme il a été déjà mentionné précédemment, la RMN du solide est devenue une méthode de choix pour caractériser les polysaccharides cristallins ou semi-cristallins. Elle permet de déterminer, entre autres, la nature des allomorphes de cellulose en présence ainsi que leur proportions relatives. C'est pourquoi nous avons contrôlé la conversion de nos échantillons de cellulose après le traitement à l'ammoniac.

Sur la figure IV.8 nous représentons les spectres enregistrés pour les échantillons de cellulose de parenchyme avant et après le traitement à l'ammoniac. Les six signaux sont présents mais à des déplacements différents. On remarque que les signaux attribués aux carbones C-2, C-3 et C-5 sont confondus dans la cellulose traitée à l'ammoniac. Ceci peut être expliqué par un désordre important dans les chaînes de cellulose ou encore par une faible proportion de la phase cristalline, ce qui est aussi confirmé par la proportion du signal attribué au carbone C-4. Isogai et Usada ont constaté que le traitement avec l'ammoniac liquide à basse température ne permet pas de récupérer la totalité de la phase cristalline et crée un désordre important dans les échantillons de cellulose, contrairement à un traitement à l'aide de l'ammoniac à haute température et sous pression [262, 263]. En effet les échantillons traités ainsi gardent un haut degré de cristallinité. Cette diminution de l'ordre

cristallin est observée dans nos échantillons qui sont au départ déjà peu cristallins (36% environ).

Les signaux attribués aux carbones C-6 ont subi un déplacement significatif. En effet, ils sont déplacés vers les champs forts (d'environ 65 ppm à 62 ppm). Ce phénomène a été interprété par d'autres auteurs et il est dû au changement de la configuration spatiale du groupement CH₂-OH. Au cours de la conversion cellulose I → cellulose III, les liaisons hydrogène en particulier intermoléculaires sont rompues par l'ammoniac, et ce groupement qui est en configuration *trans-gauche* se trouve temporairement « libre ». Au moment de la recristallisation, il reprend sa configuration la plus stable c'est-à-dire *gauche-trans*. Cette nouvelle configuration se traduit sur le spectre RMN d'un déplacement important du signal correspondant [264].

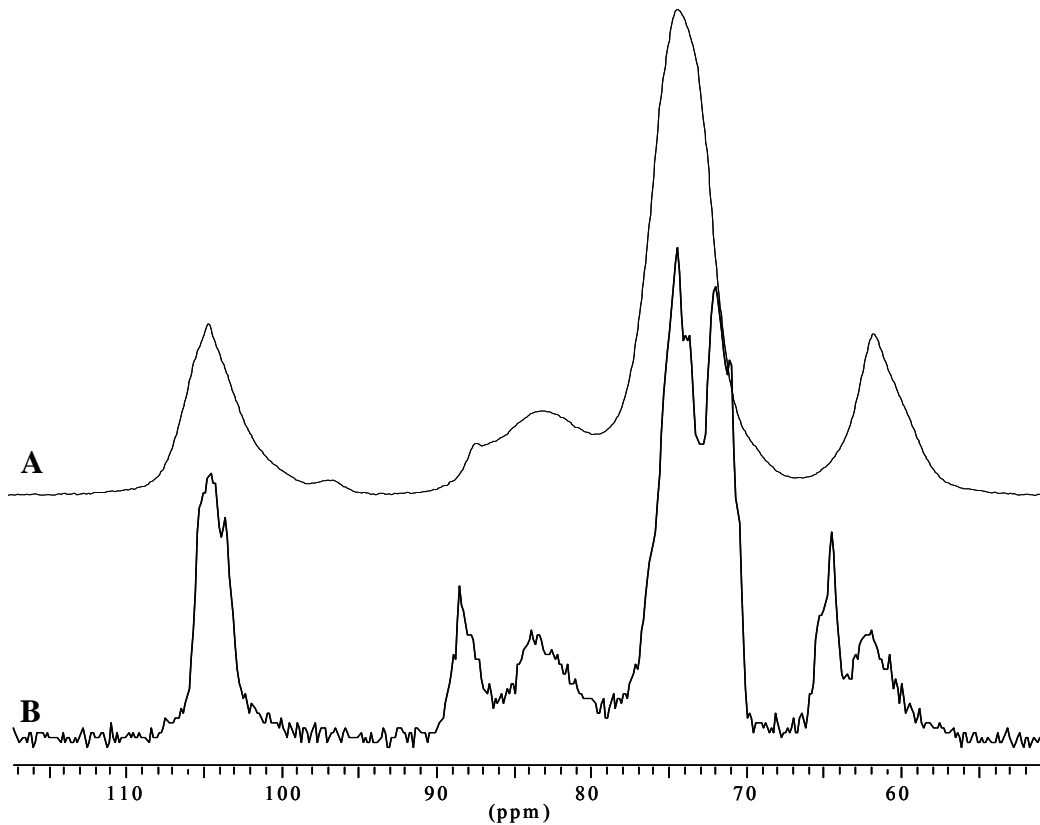


Figure IV. 8 : Spectres CP/MAS de microfibrilles de cellulose de parenchyme : A-traitées à l'ammoniac, B- natives

II.3. Oxydation de la cellulose

II.3.1. Comparaison des deux allomorphes I et III de la cellulose

Afin de mettre l'accent sur la différence de réactivité entre les deux allomorphes de cellulose I et III, une étude préliminaire comparative en vue de préparer l'acide polyglucuronique s'avère évidente. Pour cela, nous avons soumis les deux allomorphes aux mêmes conditions opératoires et nous avons contrôlé les rendements de la réaction ainsi que son déroulement.

Conditions générales

Quantité de NaOCl: L'oxydation d'un seul hydroxyle primaire avec le système [TEMPO–NaOCl–NaBr], nécessite d'après le mécanisme de l'oxydation, deux équivalents de NaOCl.

pH: Le pH est un facteur primordial quant à la sélectivité du radical TEMPO. Son maximum de sélectivité est observé à pH compris entre 9.5 et 10.5. C'est pourquoi nous maintenons le pH du milieu à 10 pour toutes les expériences.

Température: Les réactions ont été réalisées à température ambiante.

Remarque: On appelle équivalent (désigné par la suite par éq.) le rapport entre le nombre de mole de réactif par rapport au nombre de mole d'unité anhydroglucose dans l'échantillon de cellulose.

II.3.1.1. Rendements des réactions

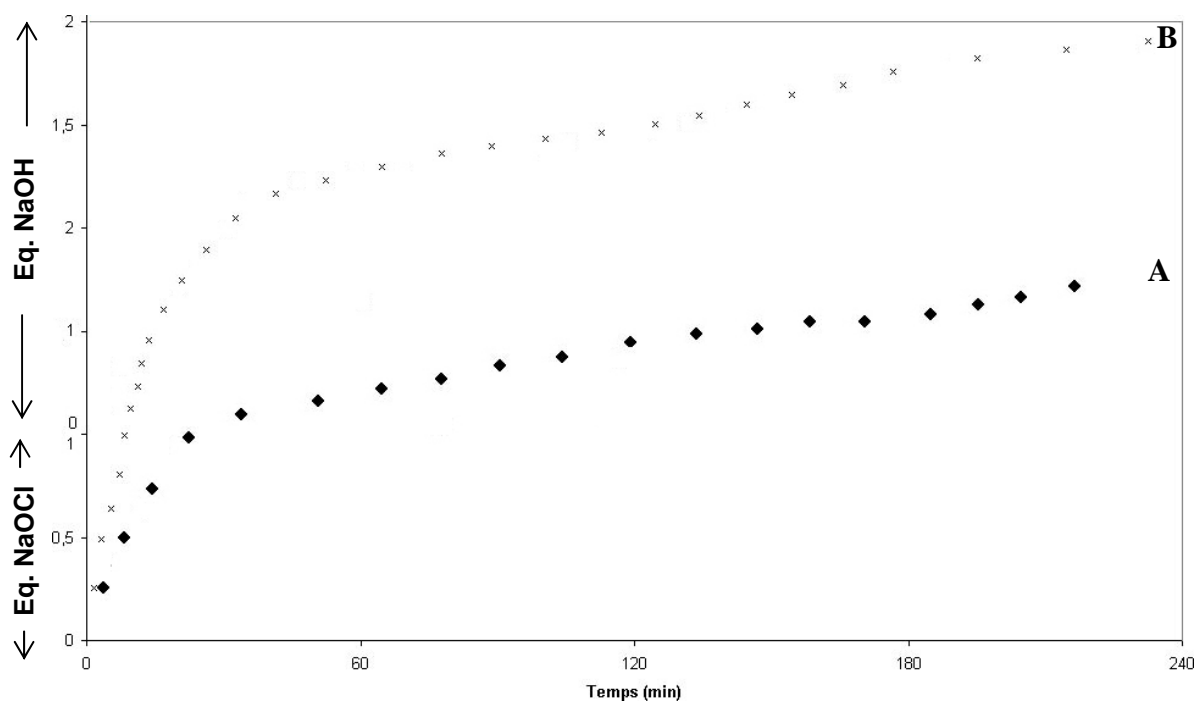
L'oxydation des deux allomorphes donne deux fractions, une fraction soluble (qui représente l'acide polyglucuronique) et une fraction insoluble. Le tableau IV.1 regroupe les conditions opératoires ainsi que les rendements des différentes fractions obtenues et ce pour les deux allomorphes. On peut constater que les meilleurs rendements en acide polyglucuronique (76 %) sont obtenus à partir de l'allomorphe III.

Tableau IV. 1 : Les rendements massiques obtenus pour les deux allomorphes I et III de cellulose

| Eq. NaOCl | Allomorphe I | | Allomorphe III | |
|-----------|--------------|---------------|----------------|---------------|
| | Soluble (%) | Insoluble (%) | Soluble (%) | Insoluble (%) |
| 0,5 | 13,1 | 83,6 | 10,5 | 85,2 |
| 1 | 17 | 78,1 | 22 | 75,4 |
| 1,5 | 21 | 75,0 | 45 | 50 |
| 2 | 23 | 73,4 | 67 | 29,5 |
| 2,5 | 23,4 | 71,2 | 76 | 21 |

II.3.1.2. Cinétique de la réaction

Nous avons également suivi le déroulement de la réaction en fonction du temps entre les deux allomorphes. La figure IV.9 représente les volumes ajoutés de NaOCl (jusqu'à 1 équ.) puis de la soude afin de neutraliser les acides formés. Cette évolution reflète en effet la cinétique de la réaction. On peut constater que la réaction est beaucoup plus rapide, et que l'on a formation d'une quantité plus importante de groupements carboxyles dans le cas de l'allomorphe III.

**Figure IV. 9 :** Avancement de la réaction avec le temps : A- allomorphe I, B- allomorphe III

II.3.1.3. Conclusion

Au vu de ces résultats on peut constater la réactivité importante de l'allomorphe III par rapport à l'allomorphe I. Les rendements en soluble, c'est-à-dire en acide polyglucuronique sont plus importants pour l'allomorphe III que pour l'allomorphe I et ils augmentent au fur et à mesure de l'ajout de NaOCl dans le milieu. Pour l'allomorphe I, les rendements en fraction soluble stagnent aux environs de 22 % et ce à partir de 0.7 éq. en NaOCl. En plus des rendements en solubles, l'avancement de la réaction, comme le montre la figure IV.9, est beaucoup plus rapide pour l'allomorphe III que pour l'allomorphe I. Ceci montre que l'allomorphe III est extrêmement réactif vis-à-vis de l'oxydation par le système TEMPO–NaOCl–NaBr, ce qui a été reporté par Da Silva *et coll.* [265].

Cette réactivité accrue de l'allomorphe III par rapport à l'allomorphe I est expliquée par la différence entre les structures cristallines primaires des deux allomorphes I et III de la cellulose. La figure IV.10 représente un modèle cristallin des deux allomorphes I et III de cellulose. Dans la cellulose native c'est-à-dire l'allomorphe I les chaînes de cellulose sont orientées parallèlement, et deux unités anhydroglucose successives sont décalées l'une par rapport à l'autre d'un angle de 180°. Cette configuration entraîne donc un édifice cristallin très compact et un hydroxyle primaire sur deux en surface du cristal peut réagir. Dans l'allomorphe III, la configuration *trans-gauche* adopté par le groupement CH₂OH engendre une augmentation des distances interplanaires ce qui rend presque tous les hydroxyles primaires accessibles et de ce fait augmente la réactivité de cet allomorphe.

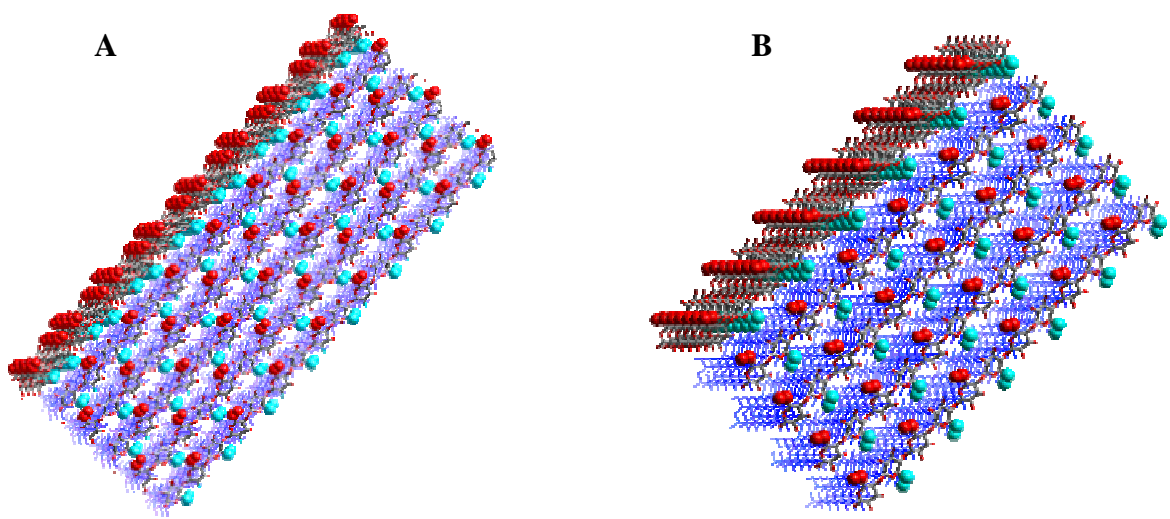


Figure IV. 10 : Représentation schématique d'un cristal de cellulose : A)- allomorphe I, B)- allomorphe III (réalisé par K. Mazeau)

II.3.2. Optimisation de l'oxydation de la cellulose III

Nous avons mis en évidence la forte réactivité de l'allomorphe III par rapport à l'allomorphe I vis-à-vis de l'oxydation par le système TEMPO–NaOCl–NaBr. Par la suite, nous nous sommes intéressés à optimiser la synthèse de l'acide polyglucuronique à partir de la cellulose de parenchyme préalablement traitée à l'ammoniac. Pour cela, nous avons étudié l'influence de la température, de la quantité du radical TEMPO, de la quantité de NaBr ainsi que la durée de la réaction. Les autres paramètres sont maintenus comme suit :

Conditions générales

Quantité de NaOCl: La préparation de l'acide polyglucuronique à partir de la cellulose nécessite l'oxydation de tous les hydroxyles primaires de la cellulose. Selon le mécanisme de l'oxydation à l'aide du système [TEMPO–NaOCl–NaBr] on a besoin de deux équivalents de NaOCl pour oxyder un seul hydroxyle. Nous avons choisi de travailler avec 2.2 équivalents afin de s'assurer de l'oxydation complète de tous les hydroxyles.

pH: Le pH est maintenu à 10 par ajout d'une solution de soude 0.5 M après l'addition totale de NaOCl si nécessaire.

Durée de la réaction: La durée de la réaction correspond à la fin de l'addition de la soude, c'est-à-dire au moment où le pH est stable.

Les degrés de polymérisation des produits de la réaction ont été calculés à partir des masses molaires déterminées par chromatographie d'exclusion stérique haute performance en considérant comme unité répétitive l'acide anhydroglucuronique.

II.3.2.1. Influence de la température

Les réactions d'oxydation à l'aide du système TEMPO–NaOCl–NaBr sont réalisées généralement à température ambiante. Mais afin de minimiser les risques de la β -élimination les auteurs préconisent, pour l'oxydation des polysaccharides en solution, de travailler à basse température. Pour cette raison nous avons décidé d'étudier l'influence de la température sur les rendements ainsi que les masses molaires des produits de la réaction.

Tableau IV. 2 : Effet de la température

| Température | TEMPO | NaOCl | NaBr | Durée (min) | % en Soluble | DP _w |
|-------------|----------|---------|---------|-------------|--------------|-----------------|
| Ambiante | 0.03 éq. | 2.2 éq. | 0.5 éq. | 60 | 78 % | 75 |
| 4°C | 0.03 éq. | 2.2 éq. | 0.5 éq. | 60 | 54 % | 125 |

Conclusion

D'après ces résultats, il apparaît que la température est un facteur important dans l'oxydation. Les rendements de la réaction sont plus importants à température ambiante qu'à basse température mais au détriment des masses molaires. En effet, les degrés de polymérisation des produits obtenus à température ambiante, même à des durées réduites (60 min) sont inférieurs à ceux obtenus à basse température.

En prolongeant le temps de la réaction (240 min) nous avons observé des chutes importantes des masses molaires à température ambiante. Pour cela nous avons opté par la suite de travailler à basse température.

II.3.2.2. Influence de la quantité de NaBr

Il ressort d'après le mécanisme de la réaction (figure IV.4) que le NaBr est utilisé pour former l'entité NaOBr qui joue le rôle d'un oxydant auxiliaire. Le sel NaBr est donc régénéré en continu dans le milieu et il peut être employé en quantité catalytique. Sa concentration ne devrait en aucun cas influer sur les rendements de la réaction. Pour vérifier cela, nous avons étudié l'influence de la quantité de NaBr sur les rendements de la réaction ainsi que les masses molaires. Le tableau IV.3 regroupe les conditions opératoires et les résultats obtenus :

Tableau IV. 3 : Rendements et degrés de polymérisation en fonction de la quantité de NaBr

| NaBr | Température | Durée (min) | TEMPO | NaOCl | % en Soluble | DP _w |
|----------|-------------|-------------|----------|---------|--------------|-----------------|
| 0.03 éq. | 4°C | 60 | 0.03 éq. | 2.2 éq. | 5 % | Non déterminé |
| 0.1 éq. | 4°C | 60 | 0.03 éq. | 2.2 éq. | 19 % | 102 |
| 0.3 éq. | 4°C | 60 | 0.03 éq. | 2.2 éq. | 42 % | 110 |
| 0.5 éq. | 4°C | 60 | 0.03 éq. | 2.2 éq. | 60 % | 125 |
| 1 éq. | 4°C | 60 | 0.03 éq. | 2.2 éq. | 68 % | 105 |

Conclusion

Nous constatons à travers ces résultats, bien que le bromure de sodium soit régénéré en continu dans le milieu, que sa concentration influe d'une façon notable sur les rendements de la réaction. En quantités catalytiques les rendements en produits solubles sont médiocres, par contre ces rendements s'améliorent avec l'augmentation de la quantité de NaBr. Ceci peut s'expliquer par la différence de la cinétique de régénération de l'ion hypobromite par l'hypochlorite et l'oxydation de l'alcool par l'ion oxoammonium. En effet la réaction d'oxydation est très rapide d'autant que le recyclage de l'ion hypobromite n'a pas le temps de se faire. En augmentant les quantités de bromure de sodium dans le milieu on compense le manque en ion hypobromite et ainsi le cycle catalytique ne se trouve pas interrompu. Un bon rendement est obtenu à partir d'une quantité de l'ordre de 0.5 éq..

Par contre la quantité de NaBr n'a pas une grande influence sur les masses molaires des produits de la réaction et les degrés de polymérisation oscillent entre 125 et 100. Ceci est en contradiction avec les constatations reportées par de Nooy *et coll.* qui suggèrent que le NaOBr formé in situ est à l'origine, avec la β élimination, de la dépolymérisation produite lors de l'oxydation de polysaccharides solubles tels que l'amidon. Les auteurs ont proposé alors d'autres alternatives ne nécessitant pas l'utilisation de NaBr, en opérant à des pH plus bas ou en remplaçant plutôt le NaOCl par des peracides. Selon Shibata et Isogai, il était impossible d'oxyder des substrats de cellulose régénérée avec le système TEMPO-NaOCl sans NaBr et pour eux ce n'est pas le NaOBr qui est la principale cause de dépolymérisation lors de l'oxydation de cellulose mais plutôt la β élimination observée à des pH élevés et à

température ambiante. Ces divergences peuvent s'expliquer par la nature de la liaison osidique (α ou β) ; la liaison α étant plus sensible à NaOBr que la liaison β .

II.3.2.3. Influence de la quantité du TEMPO

En présence de l'hypochlorite de sodium, le radical TEMPO joue le rôle du médiateur de l'oxydation et il devrait être utilisé en quantité catalytique. Afin de déterminer le seuil minimal nécessaire pour l'oxydation de la cellulose activée à l'ammoniac en vue de préparer l'acide polyglucuronique, nous avons étudié l'influence de la quantité du radical TEMPO. L'étude portera sur l'influence sur les rendements et les masses molaires des produits obtenus.

Tableau IV. 4 : Rendements et degrés de polymérisation en fonction de la quantité du radical TEMPO

| TEMPO | Température | NaBr | NaOCl | Durée (min) | % en Soluble | DP _w |
|----------|-------------|---------|---------|-------------|--------------|-----------------|
| 0.01 éq. | 4°C | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 60 | 22 % | 130 |
| 0.03 éq. | 4°C | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 60 | 54 % | 125 |
| 0.05 éq. | 4°C | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 60 | 75 % | 115 |
| 0.07 eq. | 4°C | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 60 | 82 % | 55 |
| 0.1 éq. | 4°C | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 60 | 100 % | 40 |

Conclusion

On peut constater, d'après ces résultats, que la quantité du radical TEMPO a un grand impact sur les rendements de la réaction. Ainsi, nous pouvons remarquer que les rendements en acide polyglucuronique augmentent avec la quantité de TEMPO introduite ; et un bon rendement est obtenu à partir de 0.05 éq. Par contre la quantité du TEMPO a une grande incidence sur les degrés de polymérisation des produits finis de la réaction. A partir d'une concentration de 0.07 équivalent de TEMPO on observe une chute considérable des masses molaires. Nous avons également remarqué qu'à partir de cette quantité de TEMPO la réaction est très rapide et difficile à contrôler.

Pour mettre en évidence la cause de cette dépolymérisation nous avons examiné les produits obtenus dans les différentes conditions par RMN. La figure IV.12 regroupe les spectres correspondants aux produits solubles obtenus à 0.01, 0.05 et 0.1 éq. en TEMPO.

Nous constatons, pour le produit obtenu avec 0.01 éq. de TEMPO (Figure IV.12-A), la présence uniquement de six signaux à 175.11, 102.56, 81.04, 75.53, 74.45 et 73.05 ppm qui correspondent aux différents carbones, C-6 (COO⁻), C-1, C-4, C-5, C-3 et C-2 de l'acide polyglucuronique respectivement. Lorsque la quantité du radical TEMPO augmente, on constate l'apparition de signaux de faibles intensités (Figure IV.12-B) vers 174.42, 94.47, 92.17, 71.75 70.55 et 68.45 ppm. Ces signaux peuvent être attribués soit à des produits issus de l'oxydation des carbones C-2 et C-3, ou à des unités terminales réductrices. La présence d'unités terminales est peu probable étant donné le DP de ce produit. En plus il est impossible d'observer les extrémités réductrices car l'aldéhyde de la fonction hémiacétal va elle aussi être oxydée.

L'absence de signaux entre 120-150 ppm caractéristiques d'une double liaison exclue la possibilité d'une β élimination.

En augmentant davantage la quantité de TEMPO (Figure IV.12-C) on constate une augmentation de l'intensité de ces signaux accompagné d'un effondrement des signaux attribués aux carbones C-2 et C-3. Ceci est en faveur de l'oxydation des hydroxyles OH-2 et OH-3 qui s'accompagne de l'ouverture du cycle glycosidique entre C-2 et C-3 et ce d'une façon irrégulière sur la chaîne de polymère (Figure IV.11).

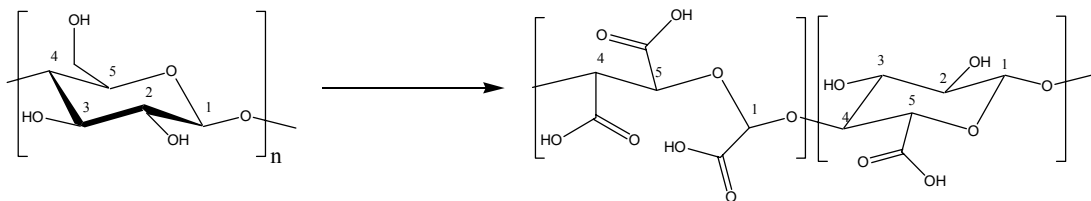


Figure IV. 11 : Dégradation au cours de l'oxydation par le système TEMPO-NaOCl-NaBr

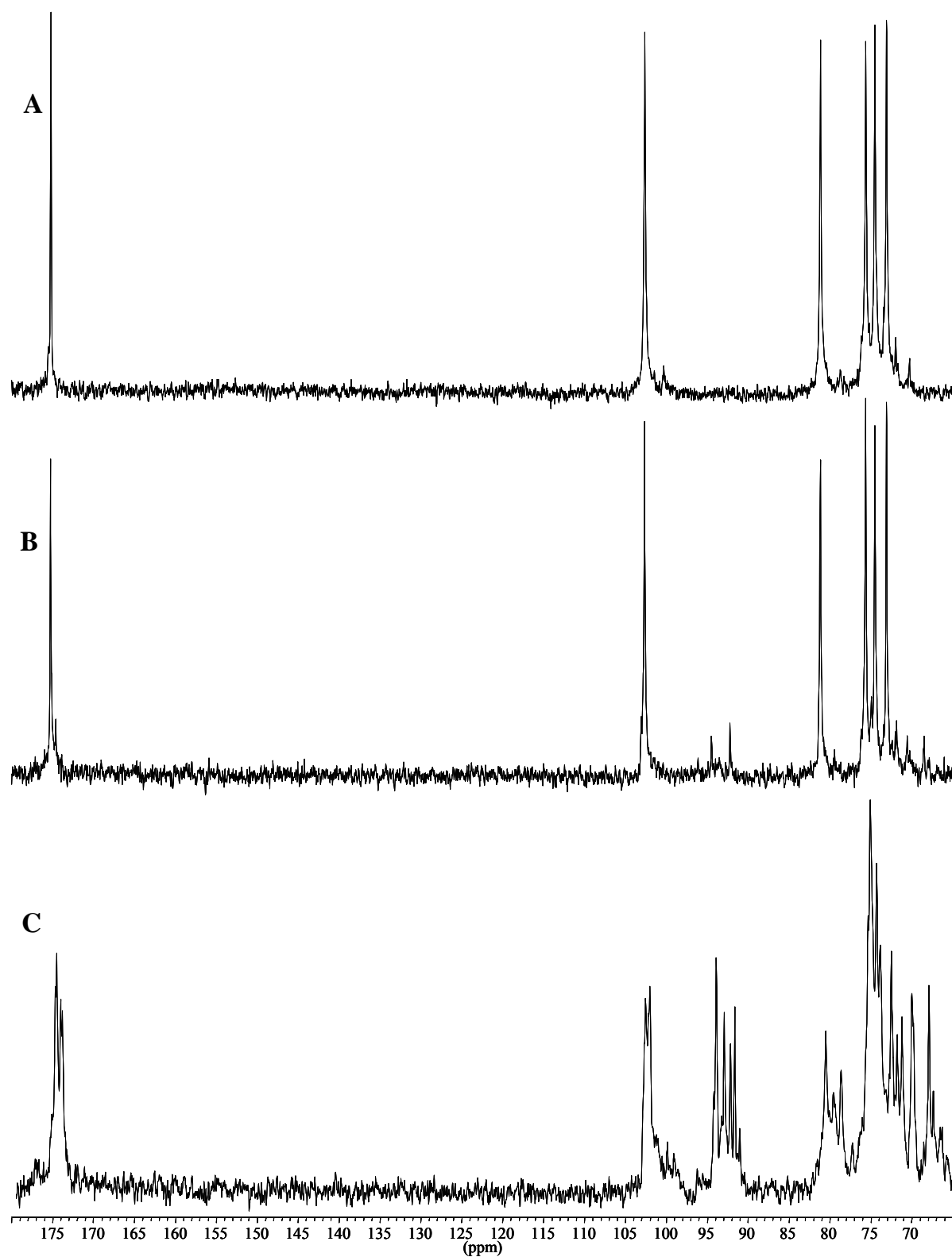


Figure IV. 12 : Spectres RMN ^{13}C des produits de réactions : A-0.01 éq. TEMPO, B-0.05 éq. TEMPO, C-0.1 éq. TEMPO

II.3.2.4. Influence de la durée de la réaction

L'oxydation de l'allomorphe III de la cellulose est très rapide. Afin de déterminer le temps idéal qui permet d'atteindre à la fois un bon rendement et DP élevé, nous avons étudié l'influence du temps de réactions sur les rendements et les masses molaires. Le tableau IV.5 regroupe les résultats obtenus.

Tableau IV. 5 : Influence de la durée de réaction

| Durée (min) | Température | TEMPO | NaBr | NaOCl | % en Soluble | DP _w |
|-------------|-------------|----------|---------|---------|--------------|-----------------|
| 30 | 4°C | 0.05 éq. | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 43 % | 120 |
| 60 | 4°C | 0.05 éq. | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 75 % | 125 |
| 90 | 4°C | 0.05 éq. | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 80 % | 122 |
| 120 | 4°C | 0.05 éq. | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 82 % | 120 |
| 180 | 4°C | 0.05 éq. | 0.5 éq. | 2.2 éq. | 85 % | 110 |

Conclusion

A travers ces résultats on peut conclure qu'à partir d'une heure de réaction après la fin de l'ajout de NaOCl dans le milieu réactionnel, on obtient un bon rendement. La prolongation de la réaction améliore peu les rendements de la réaction. Le prolongement du temps de séjour des produits soluble dans le milieu à pH alcalin n'a pas de grand effet sur les masses molaires. En effet, après consommation de NaOCl, la principale source de dépolymérisation est la β élimination, qui est minimisée à basse température.

II.4. Conclusion

Nous avons montré dans cette partie du travail que la cellulose activée à l'ammoniac est extrêmement réactive par rapport à la cellulose native vis-à-vis de l'oxydation à l'aide du système TEMPO-NaOCl-NaBr. Cette réactivité importante constitue donc un bon atout pour l'utilisation de la cellulose activée à l'ammoniac pour la préparation de l'acide polyglucuronique. Cette voie de synthèse a été optimisée en mettant l'accent sur les quantités de réactifs à manipuler ainsi que sur les conditions permettant d'éviter les dégradations du produit fini.

III. Deuxième partie : couplage de la cellulose oxydée

Les fonctions carboxyliques créées par oxydation des alcools primaires de la cellulose, sont susceptibles d'être modifiées chimiquement par le biais d'une estérification ou d'une amidation. Les liaisons amides sont plus stables que les liaisons esters d'où le choix de l'amidation dans notre étude. Nous avons choisi de coupler la cellulose oxydée (acide polyglucuronique) par des oligomères d'un polymère appartenant à la classe des polymères dits stimulables, le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM).

Cette partie sera donc consacrée, à un bref rappel bibliographique sur les polymères stimulables, et en particulier au PNIPAM, ainsi qu'aux méthodes de couplage peptidique, suivi d'un essai de couplage sur la cellulose oxydée.

III.1. Les polymères stimulables

III.1.1. Définition

On définit comme stimuable un matériau qui subit un changement brutal de ses propriétés lors d'une faible variation d'un paramètre chimique ou physique (stimulus). Typiquement, le stimulus peut être un changement de la température, du pH, de la force ionique, l'ajout d'une espèce chimique, l'exposition à la lumière ou à un champ électrique, etc... Les interactions mises en jeu lors de la transition sont de types Van der Waals, hydrophobe, liaison hydrogène ou interaction ionique. Un système idéal doit présenter une transition nette, rapide et réversible [266].

Dans la littérature, on note une nette domination des systèmes thermostimulables par rapport aux autres modes de stimulation car la température est facile à imposer. Elle est particulièrement intéressante lorsque la transition recherchée a lieu autour de la température ambiante. On distingue deux types de systèmes thermosensibles : les systèmes pour lesquels la transition se produit en abaissant la température (système à température critique supérieure de solution, UCST) ou bien les systèmes pour lesquels la transition se produit en augmentant la température (système à température critique inférieure de solution, LCST) [266].

Ces matériaux trouvent des applications dans les systèmes à mémoire, la transduction d'énergie (muscles artificiels) ou la distribution déclenchée de produits actifs.

III.1.2. Exemples de polymère thermosensibles

Les polymères hydrosolubles à LCST jouent un rôle central dans les matériaux stimulables. De nombreux polymères hydrosolubles non-ioniques ont un comportement à LCST. Ils sont solubles dans l'eau à basse température et ils présentent une séparation de phases aux températures plus élevées. Ces polymères portent sur leur chaîne à la fois des groupes hydrophobes et des groupes polaires (hydroxyles, amides, éthers, ...). Leur solubilité en solution aqueuse est due à la formation de liaisons hydrogène entre les groupes polaires et les molécules d'eau. L'augmentation de la température provoque la rupture des liaisons hydrogène et réduit leur affinité pour l'eau. Quelques exemples de polymères à LCST sont donnés dans le tableau IV.6.

Tableau IV. 6 : Quelques exemples de polymère thermostimulables

| Polymère | LCST (°C) |
|-----------------------------|---|
| Polyoxyéthylène | ≈ 100 |
| Poly(vinylméthyléther) | 32 |
| Poly(N-isopropylacrylamide) | 32 |
| Poly(N-éthylacrylamide) | 72 |
| Méthylcellulose | 40 |
| Ethyl hydroxyéthylcellulose | ≈ 30-70, selon le degré de substitution |

III.1.3. Le poly(N-isopropylacrylamide)

Parmi les polymères hydrosolubles à LCST, le poly(N-isopropylacrylamide) PNIPAM, occupe une place d'excellence, comme il a été reporté par Schild dans sa revue consacrée au PNIPAM. En effet ce polymère a été cité dans la littérature depuis les premiers brevets en 1956 avec une fréquence croissante [267]. Sa structure de base est représentée sur la figure IV.13.

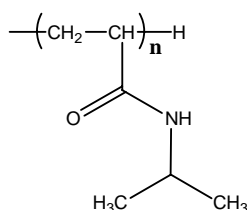


Figure IV. 13 : Structure chimique du PNIPAM

Ce polymère présente plusieurs avantages qui justifient son choix dans cette étude :

- Sa LCST (32°C) est facilement accessible et elle est suffisamment proche de celle du corps humain pour permettre d'envisager des applications biomédicales.
- Son monomère (NIPAM) se copolymérise facilement avec d'autres monomères permettant ainsi d'ajuster la LCST à des valeurs respectivement plus basses ou plus élevées que 32°C.
- Il est facile de synthétiser des oligomères monofonctionnels qui peuvent, par la suite, être greffés ou incorporés dans la structure d'un autre polymère hydrosoluble.

III.2. Méthodes de couplage peptidiques

La création d'une liaison amide entre un acide carboxylique et une amine, communément appelé couplage peptidique, n'est pas directe. En effet la réaction se fait par l'intermédiaire d'une activation, le plus souvent de l'acide carboxylique. Les techniques d'activation ou de couplage sont nombreuses mais celles couramment employées dans le cas des polysaccharides utilisent les carbodiimides comme agent de couplage. La réaction de l'acide sur le carbodiimide conduit à la formation intermédiaire d'une O-acylurée. Le produit de couplage est ensuite obtenu par attaque nucléophile de l'amine sur ce composé intermédiaire (Figure IV.14).

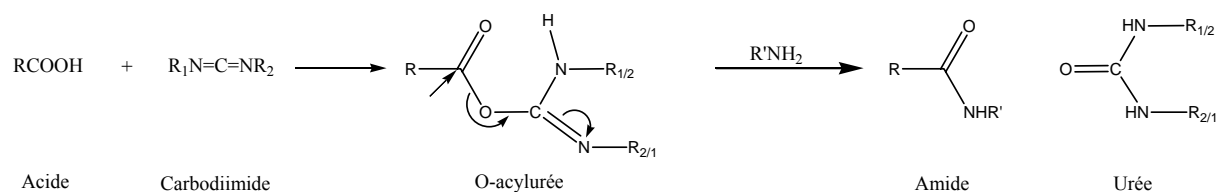


Figure IV. 14 : Couplage peptidique à l'aide d'un carbodiimide

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCC (R₁=R₂=cyclohexane)) fut le premier composé utilisé mais en raison de l'insolubilité de l'urée formée, il a été substitué par d'autres dérivés. Parmi ces dérivés, le N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC (R₁= éthyle, R₂=3-diméthylaminopropyl)), est utilisé avec succès pour remédier à ce problème car le dérivé urée formé est soluble. Néanmoins, des réactions secondaires sont observées en particulier dans le cas où les amines sont moins nucléophiles. Le N-acylurée formé par le réarrangement de l'O-acylurée est le principal produit secondaire observé (Figure IV.15) :

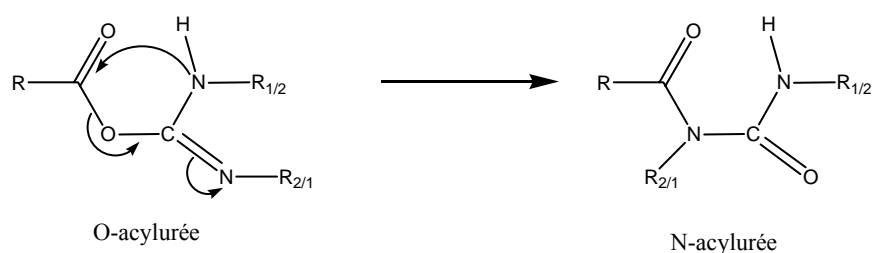


Figure IV. 15 : Réarrangement de l'O-acylurée

Pour réduire la durée de vie de l'O-acylurée intermédiaire et éviter ainsi ce réarrangement, des agents d'activation ont été associés aux carbodiimides pour former des esters activés. Parmi ces agents, les dérivés succinimides et triazoles sont les plus utilisés à l'heure actuelle. Le N-hydroxysuccinimide (NHS), le 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) et le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) sont devenus d'un usage courant dans les réactions de couplage peptidique.

Le NHS, par exemple, va former un ester plus réactif où aucun réarrangement n'est possible. L'attaque du doublet libre de l'amine sur cet ester conduira au produit de couplage désiré (Figure IV.16).

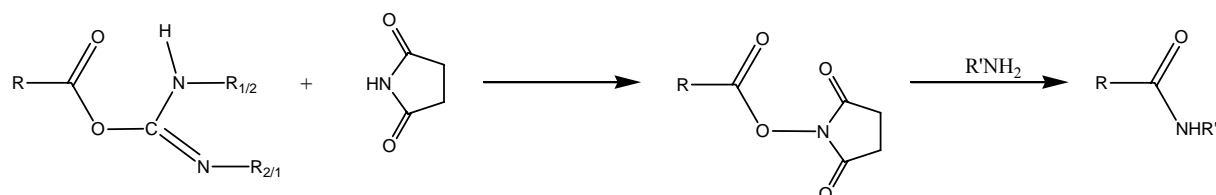


Figure IV. 16: Activation de l'O-acylurée par le NHS

Pendant la dernière décennie, d'autres agents de couplage de types sels phosphoniums, sels d'uronium, sels amidiniums et sels immoniums (Figure IV.17) ont été développés. Ces quatre familles sont actuellement les plus développées dans le domaine de la synthèse peptidique.

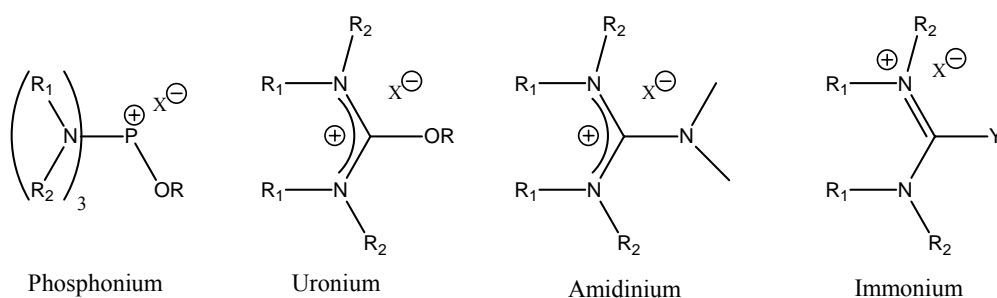


Figure IV. 17: Exemples d'agents de couplage peptidique

Objectifs du travail

Dans le cas de systèmes fondés sur des chaînes macromoléculaires hydrosolubles, le stimulant peut être une séquence ou un groupe incorporé ou greffé sur la chaîne macromoléculaire. Dans le cas où le greffon thermosensible est à LCST, les systèmes produits forment une classe très intéressante de gels, ce sont les gels thermostimulables. Ces gels présentent un caractère assez original du fait qu'ils sont solubles à basse température, et qu'ils deviennent visqueux ou gélifient à des températures élevées suite à l'association interchaînes des greffons thermosensibles (Figure IV. 18).

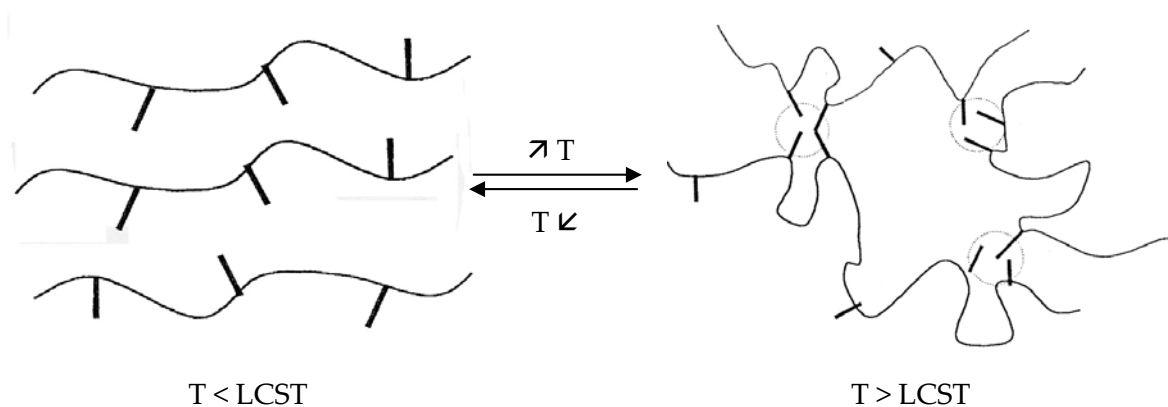


Figure IV. 18 : Représentation schématique d'un système thermoassociatif

Afin de parvenir à des systèmes thermosensibles à base d'acide polyglucuronique nous avons décidé de greffer des oligoNIPAM par le biais d'un couplage peptidique.

III.3. Synthèse et caractérisation du PNIPAM

III.3.1. Synthèse

Plusieurs voies de synthèse du PNIPAM ont été décrites dans la littérature dont les polymérisations radicalaire, anionique ou photochimique [267]. Nous souhaitons, afin de poursuivre le couplage peptidique sur la cellulose, introduire une fonction amine en position terminale. La polymérisation radicalaire nous semble la plus adéquate pour synthétiser des oligoNIPAM fonctionnalisés en position terminale par une amine primaire. L'initiateur étant le 2,2'-azobis(2-méthyl-propionitrile) (AIBN), nous avons choisi la mercaptamine (2-aminoéthanthiol (AESH)) comme agent de transfert afin d'introduire la terminaison amine. Le mode opératoire est détaillé dans la partie expérimentale et le schéma réactionnel s'écrit comme suit :

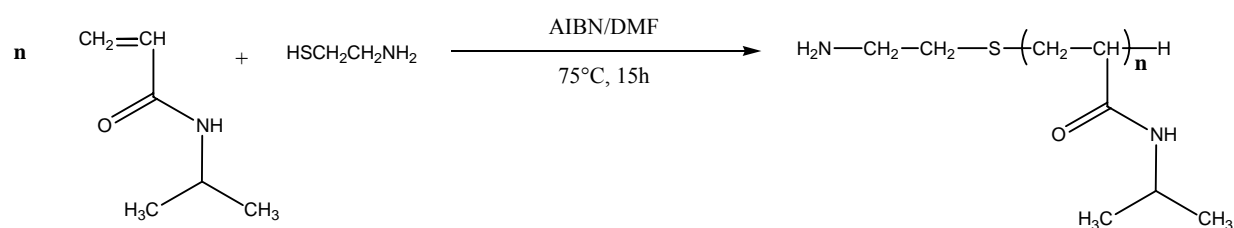


Figure IV. 19 : Synthèse de l'amino-oligoNIPAM

En vue de préparer des oligoNIPAM de différentes masses, les quantités des réactifs mises en jeu sont reportées dans le tableau IV.7 en fonction de la masse désirée.

Tableau IV. 7 : Récapitulatif des conditions et résultats de la synthèse des oligoNIPAM

| NIPAM (g) | AESH (g) | AIBN (g) | DMF (mL) | Rendement (%) | M _w (g/mol) |
|-----------|----------|----------|----------|---------------|------------------------|
| 5,795 | 0,5505 | 0,0887 | 22,3 | 75 | 1000-1200 |
| 5,795 | 0,2173 | 0,0887 | 22,3 | 61 | 2000-2500 |

III.3.2. Caractérisation

La caractérisation des oligoNIPAM amino terminals a été réalisée par RMN et par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOFF.

III.3.2.1. Par RMN

La figure IV.20 regroupe les spectres ¹³C du monomère NIPAM et du NH₂-oligoNIPAM. On constate la disparition des signaux de résonance à 129.7 et 127 ppm caractéristiques de la double liaison après réaction, ce qui montre que la polymérisation a eu lieu. Sur le spectre correspondant au NH₂-oligoNIPAM, les signaux les plus intenses à 22 et 42.5 ppm sont attribués aux carbones CH₃ et CH respectivement du groupement isoproyle. Les signaux entre 42.9 et 43.5 ppm sont attribués aux groupements CH dans la chaîne principale, tandis que l'ensemble des signaux entre 27 et 39 ppm peut être attribué aux groupements CH₂ de la mercaptamine et de la chaîne principale du PNIPAM. Ceci a été confirmé par le spectre DEPT mais il était ainsi difficile de prouver avec certitude la présence du greffon mercaptamine.

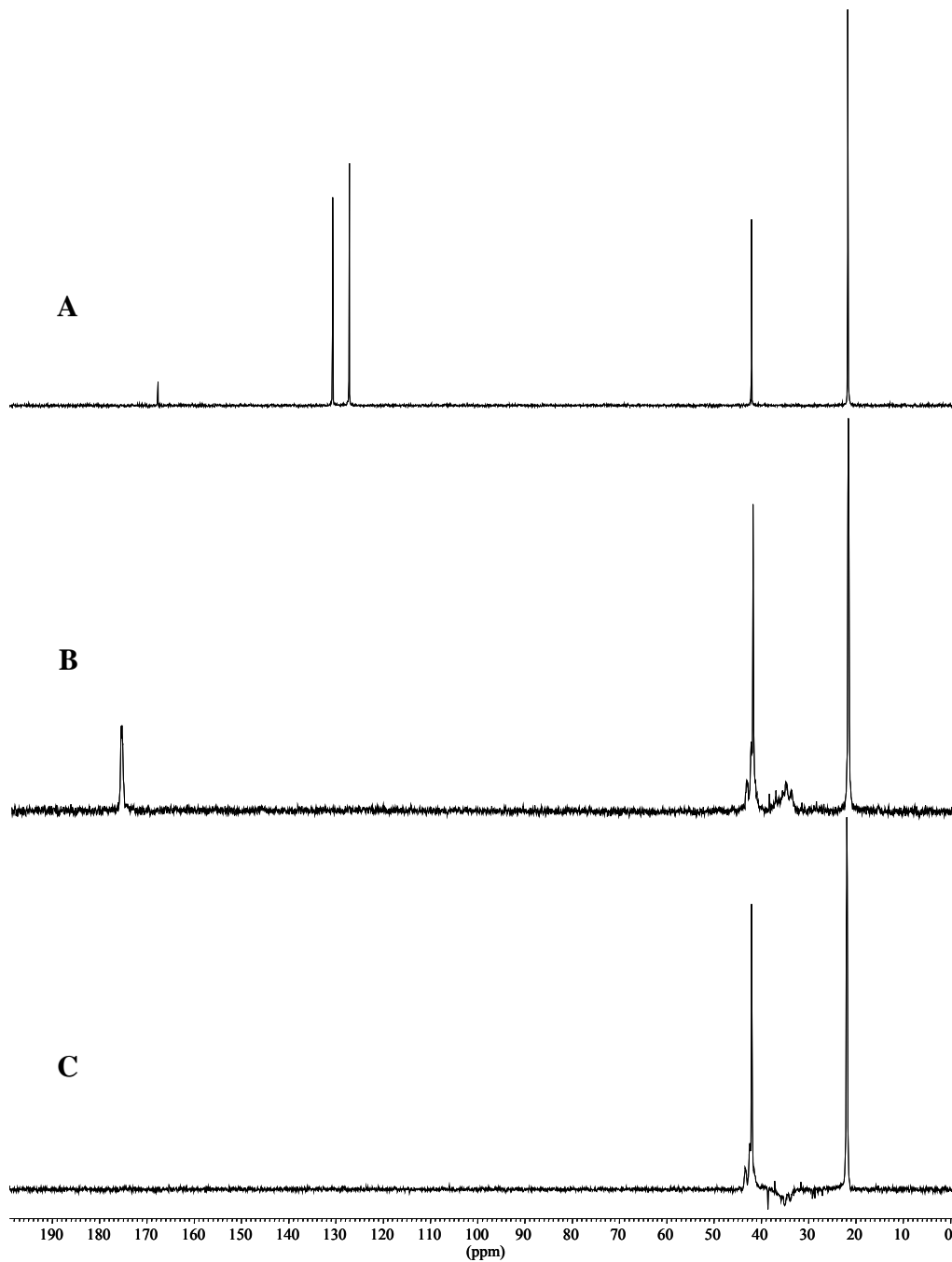


Figure IV. 20: Spectres RMN ^{13}C : (A) monomère NIPAM, (B) NH_2 -oligoNIPAM, (C) ^{13}C -DEPT NH_2 -oligoNIPAM (D_2O à 298K, 300 MHz)

Sur la figure IV.21, nous avons représentés les spectres RMN du proton des oligoNIPAM amino terminales dans deux solvants différents de façon à visualiser les protons interchangeable. Les attributions sont représentées sur la figure IV.21, et nous pouvons constater la présence, en plus des signaux du PNIPAM, de deux triplets centrés à 2.75 et 3.11 ppm et qui peuvent être attribués aux protons éthylène ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}$) de la

mercaptamine. Le tableau IV.8 récapitule l'ensemble des déplacements chimiques ainsi que les attributions des différents résidus.

D'un point de vue quantitatif, les mesures de surfaces des signaux correspondants aux groupements méthyles de l'isopropyle et aux groupements méthylène de la mercaptamine permettent d'estimer les degrés de polymérisation des oligoNIPAM préparés. Les masses molaires déterminées par RMN correspondent parfaitement aux valeurs désirées (Tableaux IV.8).

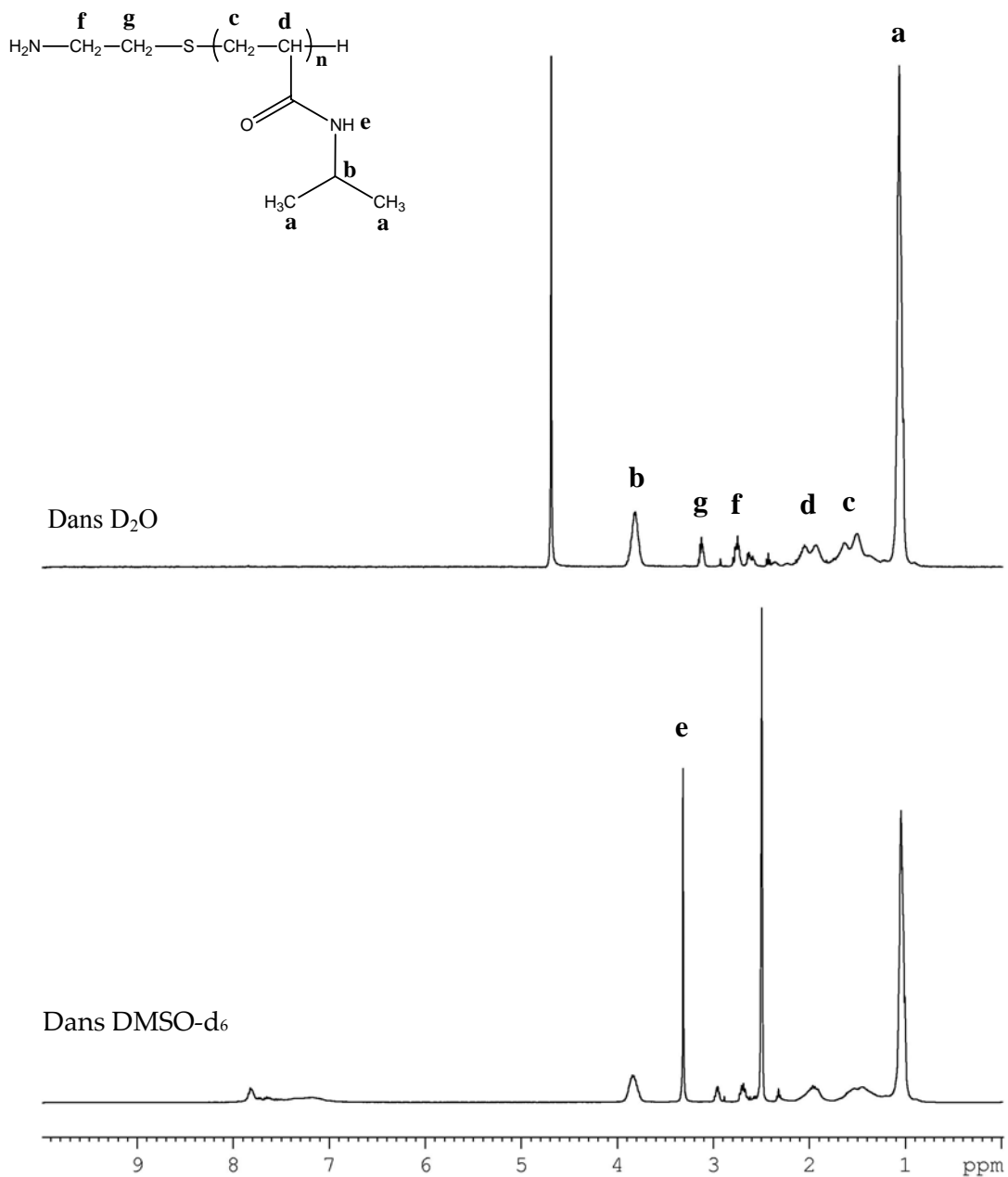


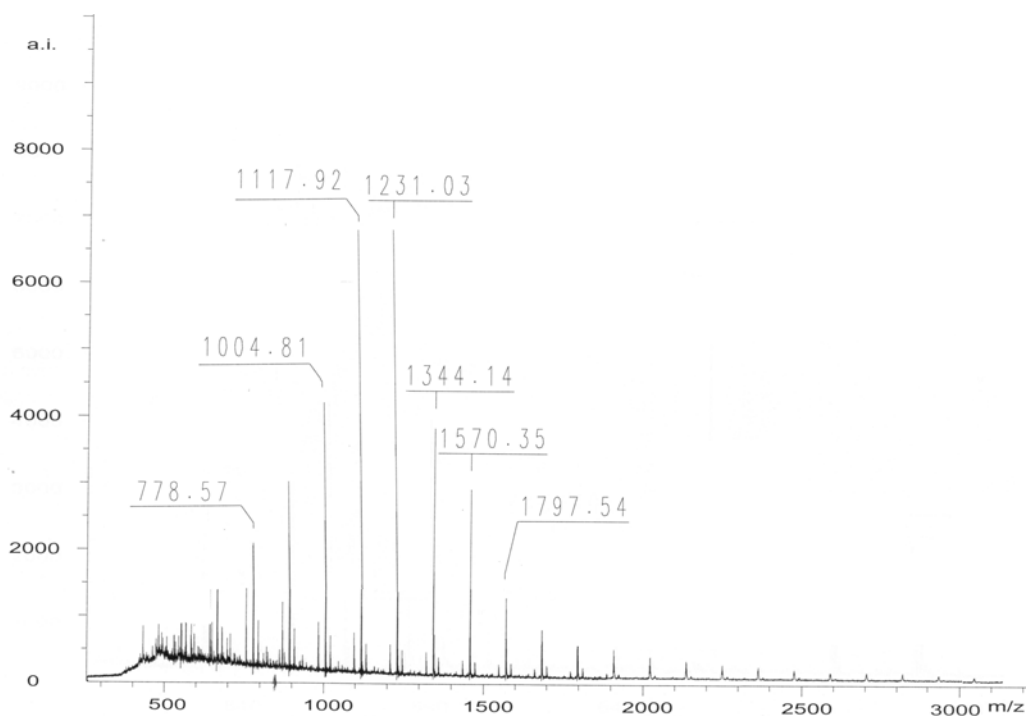
Figure IV. 21 : Spectres RMN proton de NH₂-oligoNIPAM

Tableau IV. 8 : Déplacements chimiques et attributions de différents résidus de NH₂-oligoNIPAM

| Groupement | Déplacements chimiques (ppm) | |
|------------|------------------------------|-----------------|
| | ¹ H | ¹³ C |
| a | 1.02 | 22 |
| b | 3.81 | 42.5 |
| c | 1.5-1.75 | 27-39 |
| d | 2.04-2.11 | 42.9-43.5 |
| e | 3.31 | - |
| f | 2.75 | - |
| g | 3.11 | - |
| C=O | - | 175 |

III.3.2.2. Par spectrométrie de masse

Pour démontrer la présence du greffon mercaptamine sur les oligoNIPAM préparés et vérifier leurs masses, nous avons également eu recours à la spectrométrie de masse. La figure IV.22 représente le spectre de masse obtenu pour l'échantillon de masse moléculaire moyenne 1000 g/mol.

**Figure IV. 22 :** Spectre de masse (MALDI-TOFF) du NH₂-oligoNIPAM

La masse du fragment détecté par le spectromètre comprend :

$$M[\text{Fragment}] = x M(\text{NIPAM}) + y M(\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2) + M(\text{NH}_4)$$

avec $M(\text{NIPAM}) = 114$, $M(\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2) = 76$, $M(\text{NH}_4) = 18$ (provient de la matrice utilisée)

Si on prend par exemple la valeur de 1231.03 observée sur le spectre :

$$M[\text{Fragment}] = 10 M(\text{NIPAM}) + 1 M(\text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2) + 1 M(\text{NH}_4)$$

Ce qui prouve que les oligoNIPAM préparés portent bien le greffon mercaptamine.

Les masses molaires trouvées par cette technique correspondent également aux masses souhaitées.

III.4. Essai de couplage de la cellulose oxydée

Nous avons par la suite essayé de greffer par un couplage peptidique ces oligoNIPAM avec l'acide polyglucuronique en utilisant l'EDAC comme agent de couplage.

Conditions opératoires

Les réactifs ont été introduits dans les quantités suivantes :

EDAC : 2 éq. pour 1 éq. d'unités acide anhydroglucuronique.

NH₂-oligoNIPAM : de masse molaire 1000 g/mol, a été introduit de façon à avoir 1 éq. de fonctions amines pour 1 éq. d'acide anhydroglucuronique.

NHS : 2 éq. pour 1 éq. d'unités acide anhydroglucuronique.

pH : est maintenu à 8 par ajout d'une solution HCl (0,1 M) ou de soude (0.5 M).

Température : le couplage peptidique peut se dérouler à des températures allant jusqu'à 60°C. Pour notre cas, les réactions ont été conduites à température ambiante car au-delà de 32°C le PNIPAM précipite.

Durée : la réaction a été conduite durant 24 H.

Purification

A la fin de la réaction, le mélange est neutralisé puis dialysé pour éliminer les sels contenus et les excès de réactifs et enfin lyophilisé. L'excès des oligoNIPAM est éliminé par une extraction en continu dans un soxhlet pendant 24 heures à l'aide du chloroforme.

Bilan massique

| Réactifs | | Produit purifié |
|----------------------|---------------------------------|-----------------|
| m (cellulose oxydée) | m (NH ₂ -oligoNIPAM) | Masse obtenue |
| 250 mg | 1262 mg | 392, 02 mg |

Caractérisation

Les produits de réactions ont été caractérisés par RMN ¹³C, et la figure IV.23 regroupe les spectres des réactifs (acide polyglucuronique et NH₂-oligoNIPAM) ainsi que le produit purifié couplé après purification (Figure IV.23-C). On constate la présence dans le spectre IV.23-C, la présence à la fois des signaux de l'acide polyglucuronique et des signaux de l'oligoNIPAM. Ceci démontre que le couplage a bien eu lieu. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence le signal de la liaison amide créée entre l'oligoNIPAM et l'acide polyglucuronique de façon non ambiguë, car il est en fait mélangé avec les autres signaux C=O dans le massif entre 174 et 176 ppm.

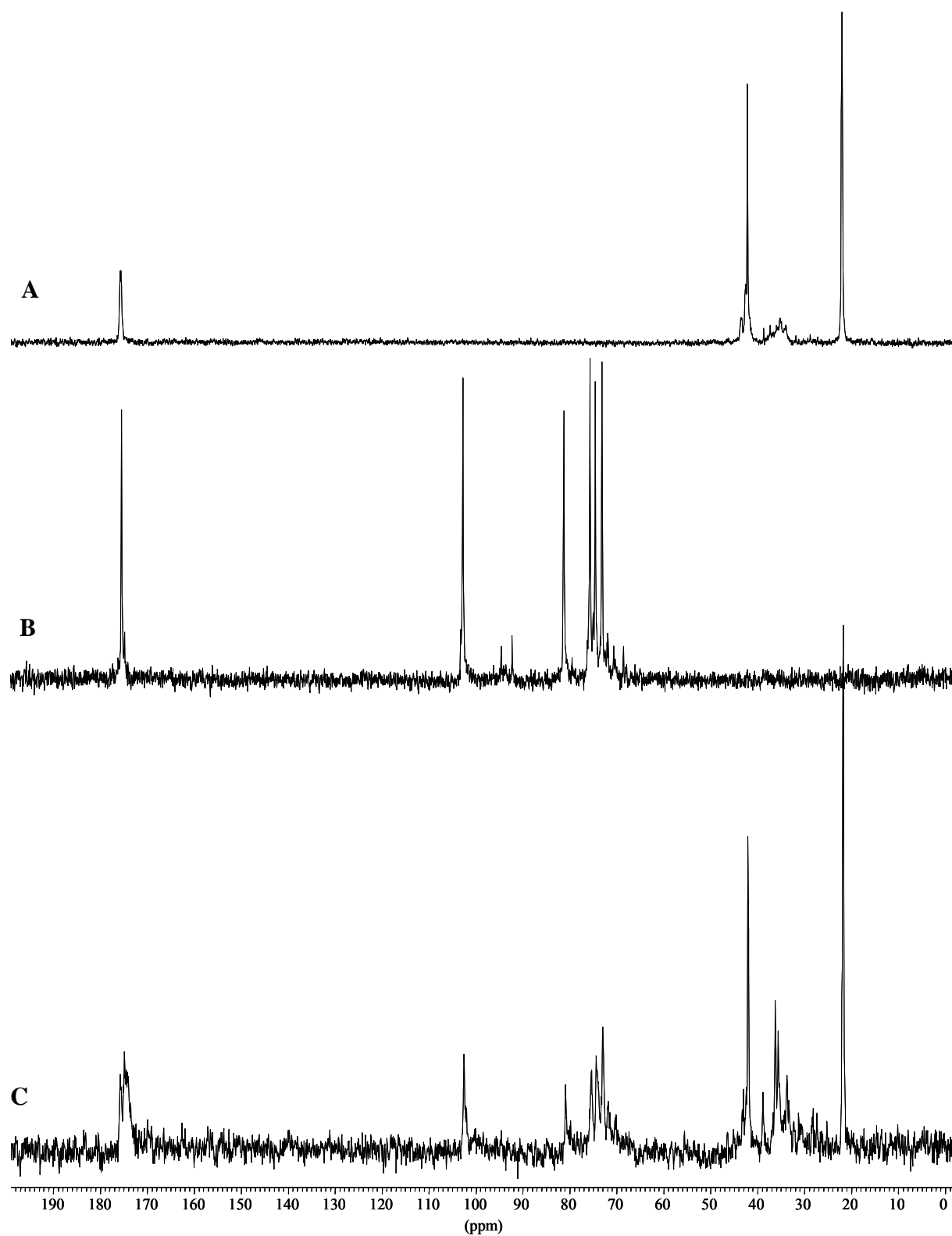


Figure IV. 23: Spectres RMN ^{13}C : A : NH_2 -oligoNIPAM, B : acide polyglucuronique, C : acide polyglucuronique couplé avec l'oligoNIPAM

Influence du NHS

Nous avons voulu vérifier si les amines terminales portées par les oligoNIPAM sont assez réactives et par conséquent ne nécessitent pas l'ajout de l'activant secondaire. Les essais réalisés, dans les mêmes conditions mais sans ajout de NHS ont été un échec et aucun couplage n'a pu être observé.

Influence du pH

Le couplage des amines sur des acides carboxyliques à l'aide du système NHS-EDAC peut être réalisé à des pH légèrement acide ou légèrement alcalin. Deux maxima ont été mentionnés dans la littérature : pH=4.8 et pH=8. En ce qui nous concerne, aucun couplage n'a pu être observé lors des essais réalisés à pH=4.8.

Influence de la dilution

En raison de leur stéréorégularité, les chaînes d'acide polyglucuronique en solution peuvent adopter plusieurs conformations en fonction, entre autres, de la concentration en polymère. Ces conformations peuvent être des chaînes désordonnées ou des chaînes associées en forme d'hélices. Ces différentes conformations peuvent influencer l'accessibilité des groupements carboxyliques et par conséquent leur réactivité. Nous avons ainsi essayé de vérifier si la concentration en polymère avait une influence sur les rendements des couplages. Des expériences ont donc été réalisées à des concentrations différentes en acide polyglucuronique.

Après purification, les produits ont été caractérisés par RMN et le degré de substitution ou de couplage a été calculé sur la base de la mesure des surfaces des signaux. La figure IV.24 regroupe les spectres RMN ^1H enregistrés pour les produits obtenus dans les différentes concentrations en acide polyglucuronique et le tableau IV. 9 récapitule les degrés de substitutions obtenus. On peut constater qu'en solution concentrée en acide polyglucuronique, le degré de couplage est faible en raison de l'association des chaînes du polymère. En diluant le milieu réactionnel, les degrés de substitutions sont meilleurs, mais à forte dilution le couplage n'est pas quantitatif.

Tableau IV. 9 : Degré de substitution en fonction des concentrations en acide polyglucuronique

| Concentration (g/L) | Degré de substitution |
|---------------------|-----------------------|
| 10 | 8.5 % |
| 5 | 18 % |
| 2.5 | 10.5 % |

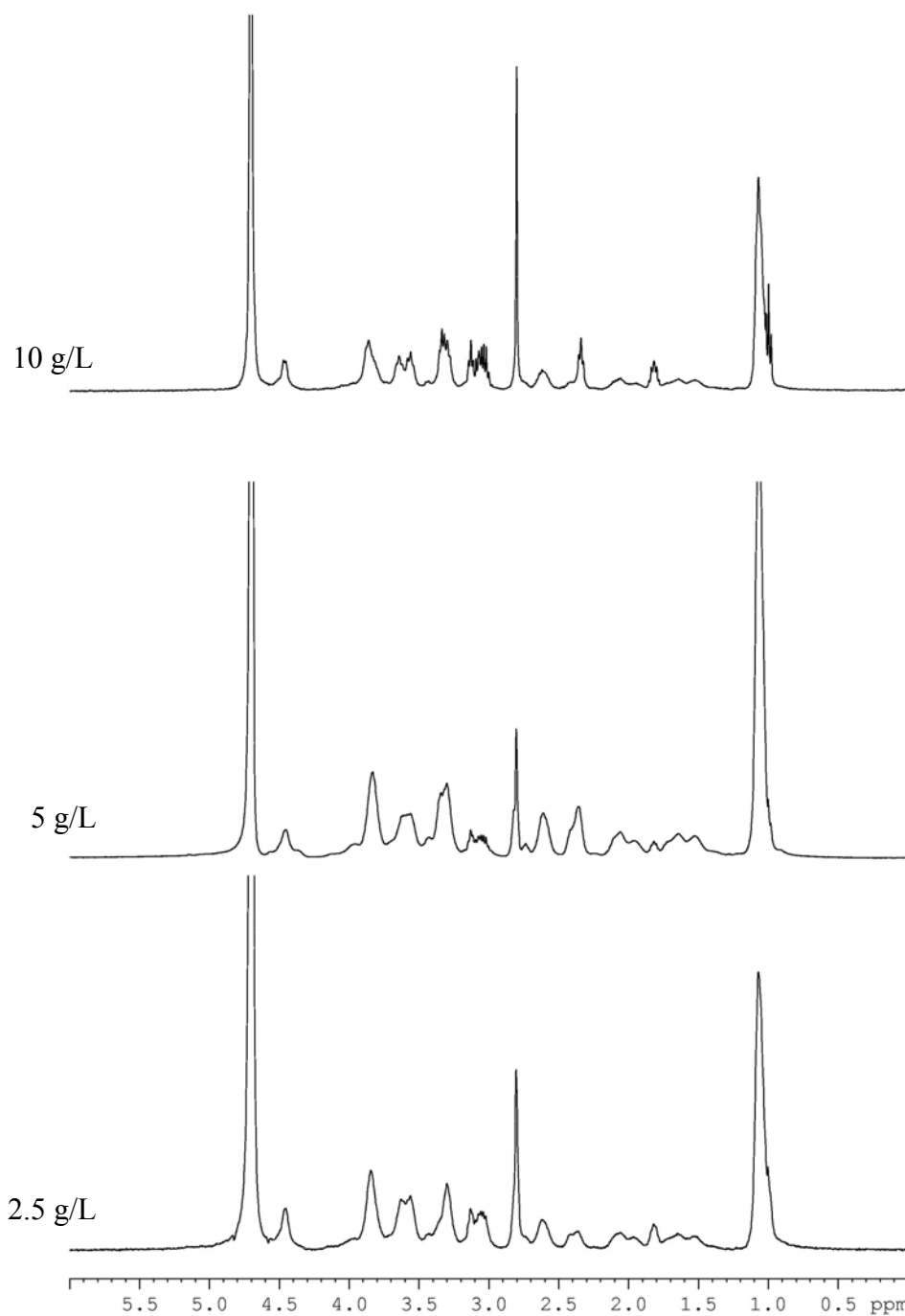


Figure IV. 24 : Spectres RMN 1H des produits de couplage à différentes concentrations

Conclusion

Nous avons montré au cours de cette partie qu'il était possible de réaliser une modification chimique de la cellulose oxydée via un couplage peptidique. Cette stratégie très prometteuse permettra de modifier l'acide polyglucuronique avec une large gamme de substances organiques. Notre choix s'est porté sur un système idéal « les polymères thermosensibles », et nous avons observé que ces matériaux préparés à base de l'acide polyglucuronique et oligoNIPAM étaient stimulables sous l'effet de la température. L'étude en solution de ces produits est en cours de réalisation.

IV. Conclusion générale

Ces travaux mettent en évidence l'intérêt majeur de la modification chimique de la cellulose. L'oxydation par le système NaOCl-NaBr-TEMPO est régiosélective et elle est particulièrement bien adaptée pour préparer l'acide polyglucuronique à partir de la cellulose activée par l'ammoniac. La réaction est réalisée dans des conditions douces et écologiques (pas de solvant organiques). La présence de groupes carboxyliques permet d'envisager des réactions de couplage avec une large gamme de substances et d'obtenir des produits dont les propriétés peuvent être contrôlées en fonction des greffons. Nous avons opté dans cette étude pour les polymères thermosensibles et nous avons montré qu'il était possible de préparer des systèmes thermoassociatifs à base de l'acide polyglucuronique. Le choix peut être étendu sur d'autres types de polymères stimulables en particulier les polymères photostimulables ou à reconnaissance moléculaire (stimulable en présence de substances en l'occurrence enzymes). Toutes ces modifications peuvent être également réalisées en phase hétérogène, c'est-à-dire à partir des whiskers de cellulose qui peuvent être oxydés en surface dans un premier temps, puis modifiés par couplage.

CONCLUSION

Conclusion

Dans un contexte général de valorisation alimentaire et non alimentaire du figuier de barbarie, nous nous sommes intéressés lors de cette étude à la pelure et aux graines du fruit. Une analyse morphologique et ultrastructurale réalisée par microscopie électronique à balayage, nous a permis d'élucider la composition et l'organisation cellulaire des parois de ces deux composantes. L'extraction et la purification des polysaccharides pariétaux des différentes parois ont été effectuées et leur caractérisation a été réalisée grâce notamment à la RMN.

Au niveau de la graine, l'étude approfondie du péricarpe a montré qu'il est constitué d'un composite de xylanes et de fibres cellulosique de sclérenchyme. En effet plusieurs glucuronoxylanes ont été isolées et qui se caractérisent par une grande variabilité en taux d'acide 4-O-méthyl-glucuronique. Quant aux fibres cellulosiques, elles sont caractéristiques des parois secondaires. La paroi cellulaire de l'endosperme renferme des polysaccharides composés essentiellement d'arabinanes et de xylanes.

Nous avons mis en évidence la présence de tissus essentiellement de parenchyme dans la paroi au niveau de la pelure de la figue de barbarie et les polysaccharides pariétaux ont été isolés et caractérisés. Du mucilage extrait de la pleure, nous avons purifié une arabinogalactane de type I. Les pectines secrétées dans la paroi de la pelure sont constituées d'un squelette rhamnogalacturonane portant des chaînes de ramification galactanes et arabinanes, tandis que les hémicelluloses sont composés essentiellement de 4-O-méthyl-glucuronoxylane. Le résidu cellulosique, transformé par le traitement mécanique d'homogénéisation, est composé de microfibrilles de cellulose dont les propriétés rhéologiques en solution sont très intéressantes.

Nous avons ainsi montré que le fruit du figuier de barbarie constitue un réservoir de substances diversifiées qui pourront jouer un rôle potentiel pour une valorisation industrielle soit tels quelles ou modifiées.

C'est pourquoi nous avons mis l'accent sur la modification de la cellulose, lors du dernier volet de ce travail. Cette modification qui décrit l'oxydation de la cellulose par l'utilisation du système TEMPO-NaOCl-NaBr dans le but de préparer l'acide polyglucuronique, et nous avons montré qu'il était envisageable de poursuivre la

modification ce qui permet d'accéder à des systèmes aux caractéristiques très large, permettant de couvrir diverses possibilités d'application.

CHAPITRE V

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériaux utilisés

I.1. Le figuier de barbarie

Notre travail a été réalisé sur des fruits de *l'opuntia ficus-indica* cultivés en haies vives dans la région de Benguézir, située à 70 Km au nord de la ville de Marrakech. Ces fruits ont été récoltés en fin de maturité et ils ont été sélectionnés de façon à ne retenir que les fruits sains.

Les fruits ont été épluchés à la main, et la pelure a été découpée en petits morceaux et séchée dans une étuve ventilée à 50°C. Les graines ont été récupérées, après mixage de la pulpe, par filtration sur un tamis (porosité 1 mm), puis lavées abondamment à l'eau et séchées dans une étuve ventilée à 35°C.

La pelure séchée a été broyée dans un moulin à café domestique et tamisée sur un tamis métallique de porosité 200 µm et la poudre a été stockée. Quant aux graines, de consistance dure, elles ont été broyées dans un moulin à céréales type SAMAP équipé d'un système de ventilation pour éviter tout échauffement de la poudre au cours du broyage. La poudre a été stockée pour usage ultérieur.

I.2. Les échantillons de cellulose

I.2.1. Cellulose de tunicier

I.2.1.1. Les tuniciers

Les urochordés communément appelés tuniciers sont des animaux marins présents dans toutes les mers du monde qui appartiennent au groupe des Chordés. Tous les urochordés possèdent une épaisse tunique, tissu vivant riche en cellulose secrété par l'épiderme, qui leur donne le nom de Tuniciers. Nous avons travaillé avec l'espèce *Halocynthia roretzi*, en provenance du Japon.

I.2.1.2. Extraction de la cellulose de tunicier

La tunicine étant une cellulose modèle, elle a été utilisée sous la forme de monocristaux appelés aussi trichites ou whiskers. L'extraction de la tunicine à partir de tunicier commence par une étape d'extraction des protéines, de blanchiment et de broyage.

Environ 500 g de parois nettoyées et broyées grossièrement sont lavés à l'eau et plongés une nuit sous agitation mécanique dans 800 mL d'une solution d'hydroxyde de

potassium à 5%. Après lavage à l'eau distillée, l'échantillon est blanchi 3 fois au chlorite de sodium dans un tampon acétate à pH=4.8. Le mélange obtenu sous forme d'une suspension est ensuite désintégré par passages dans un mixeur « Waring Blendor ». Ce broyat est conservé au réfrigérateur après addition de quelques gouttes de chloroforme. Les monocristaux sont obtenus dans une deuxième étape d'hydrolyse.

I.2.2. Cellulose de parenchyme

Pour la modification chimique de cellulose nous nous sommes servis essentiellement, pour une question d'approvisionnement, de cellulose de parenchyme issue de pulpes de betterave fournies par la générale sucrière. Nous avons réalisé des essais sur la cellulose de parenchyme issue de la pelure de la figue de barbarie, et nous n'avons pas constaté de différence entre les deux matériaux.

II. Analyse élémentaire

II.1. La siccité

La siccité est définie comme étant le pourcentage massique de matière sèche contenue dans un échantillon. Elle est déterminée par déshydratation dans une étuve. La déshydratation est effectuée sur des masses connues d'échantillons déposés dans creuset en céramique dans une étuve à 105°C à pression atmosphérique jusqu'à poids constant. A la sortie de l'étuve le matériau est laissé dans un dessiccateur jusqu'à retour à la température ambiante avant d'être pesé.

II.2. Taux de cendres

Des échantillons broyés sont placés dans des creusets en céramique et séchés auparavant à 105°C dans une étuve pendant 4 heures puis calcinés à 600°C pendant une nuit. Après cette pyrolyse, le taux de cendres est obtenu par pesée après retour des échantillons à la température ambiante dans un dessiccateur.

II.3. Protéines

La teneur en azote (N) déterminée par analyse élémentaire au service central d'analyse du CNRS. Le pourcentage de protéines est calculé à partir de la teneur en azote selon la relation :

$$\% \text{ protéines} = \% \text{ N} \times 6.25$$

II.4. Lignine sulfurique (méthode de Klason)

Le taux de lignine sulfurique est déterminé par la méthode de Klason selon le protocole suivant :

Un échantillon sec (1g) est mis en suspension dans l'acide sulfurique 72% (15 ml) pendant une nuit à température ambiante. L'hydrolyse est poursuivie après dilution à 3% et maintient de la solution à reflux pendant 6 heures. Après cette hydrolyse, on laisse déposer la solution pendant une nuit avant de filtrer le précipité sur un creuset filtrant n°4 préalablement séché et taré. Le précipité est lavé abondamment à l'eau chaude afin d'éliminer toute trace d'acide puis placé dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant. Le taux de lignine est alors déterminé par gravimétrie.

II.4. Graisse et cires

Le pourcentage de graisses et de cires est déterminé après extractions successives par un mélange azéotrope toluène-éthanol (38-62). Les échantillons sont soumis à une extraction en continu pendant 24 h dans un soxhlet. La masse de graisses et de cires extraites est déterminée par pesée après évaporation du solvant.

III. Dosage des sucres

III.1. Sucres neutres

Les sucres neutres ont été identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.) sous forme de leurs acétates d'alditols correspondants [268]. Ces alditols sont obtenus par hydrolyse de 10 mg d'échantillon par une solution d'acide sulfurique à 72 % à température ambiante pendant 1 h ou une nuit pour les échantillons cellulosiques. La solution est alors diluée à 3 % par addition d'une solution aqueuse contenant le myo-inositol qui servira d'étalon interne, et on maintient ce mélange sous agitation et à reflux pendant 6h. Après neutralisation par du carbonate de baryum, filtration pour éliminer l'excédent du carbonate de baryum, le sulfate de baryum formé, de la lignine et des carboxylates de baryum (sucres acides, acides organiques légers...), les monosaccharides sont réduits par 10 mg de borohydrure de sodium (NaBH_4) pendant une nuit sous agitation et à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé en ajoutant goutte à goutte une solution d'acide acétique à 50% puis évaporé à sec. Il est ensuite repris puis évaporé à sec par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 1% dans du méthanol (3 fois), puis par de l'eau

distillée (3 fois). Le résidu sec est acétylé par un mélange de 2 ml de pyridine et de 2 ml d'anhydride acétique que l'on laisse réagir à température ambiante pendant une nuit ou une heure à reflux. L'excès d'anhydride acétique est ensuite hydrolysé par de la glace pilée et le mélange est évaporé à sec. Le résidu est repris trois fois par de l'eau distillée, et évaporé à sec. Le résidu obtenu est enfin repris et évaporé à sec trois fois par de l'éthanol à 95 %.

Les oses, sous forme de leur acétates d'alditols correspondants sont analysés en C.P.G. sur un chromatographe Hewlett Packard 5890A, équipé d'une colonne en silice fondue (30 m x 0.53 mm) imprégnée d'un film Supleco 2380 (3%) et d'un détecteur d'ionisation de flamme (FID) couplé à un intégrateur Hewlett-Packard 3395. Le gaz vecteur est de l'azote U.

Conditions opérationnelles :

- Température d'injection : 260°C
- Température de colonne : programmée de 195°C à 225°C par incréments de 2,5 °C.min⁻¹ avec des plateaux de 3 min à 195°C et à 225°C.
- Température de détection : 280°C
- Débit du gaz vecteur (N₂) : 4 mL.min⁻¹

Les oses acétylés sont identifiés par comparaison avec les temps de rétention d'oses témoins (rhamnose, fucose, xylose, arabinose, mannose, galactose et glucose) et de *myo-inositol* préalablement réduits et acétylés. Les surfaces des pics ont été corrigées par les facteurs de correction établis par *Sweet et coll.* [269].

III.2. Réduction des polysaccharides

La réduction des polysaccharides acides a été conduite selon la méthode de Taylor et Conrad [270]. Une prise d'essai de 30 mg des échantillons sous leurs formes acides H⁺ est dissoute dans 20 ml d'eau distillée. Tout en agitant et en maintenant le pH à 4.75 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique 0.02M, on ajoute lentement sur 1 h, 1 mmol de carbodiimide (430 mg de 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metha-p-toluenesulfonate, FLUKA). Après la fin de l'addition, on maintient sous agitation pendant 1 h supplémentaire.

On ajoute alors par petites quantités et pendant 1 h, 2.2 g de borohydrure de sodium (NaBH₄ ou NaBD₄) en maintenant le pH à 7-8 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M (si la solution mousse, on ajoute alors une goutte de 1-octanol). Après cette étape la solution est maintenue sous agitation 30 min supplémentaires.

Si on a utilisé de l'octanol comme agent antimousse, la solution est évaporée à sec et reprise trois fois par de l'eau distillée. La solution est finalement abondamment dialysée puis lyophilisée. Le traitement (carbodiimide- NaBH_4) est effectué une seconde fois avec les mêmes quantités de réactifs de façon à ce que la réduction soit complète. On peut vérifier par RMN ^{13}C que la réduction est complète. En effet le signal vers 176 ppm qui correspond au $\text{C}=\text{O}$ des groupements carboxyliques doit disparaître. Les échantillons réduits sont soit hydrolysés en vue de les analyser par CPG dans les mêmes conditions que les oses neutres, soit méthylés selon le mode ci-après.

III.3. Méthylation des polysaccharides

La méthylation des polysaccharides (réduits ou natifs) a été réalisée selon la méthode de Hakomori décrite par Jansson *et coll.* [271]. Un échantillon de 15 mg environ est mis en solution dans 1.5 ml du DMSO et agité pendant 20h à température ambiante. On ajoute ensuite 1.2 ml d'une solution d'anion diméthylesulfonium (2M) préparée à l'avance. La solution est maintenue sous agitation sous courant d'azote une nuit supplémentaire. Dans un ballon à l'abri de la lumière et refroidi dans un bain d'eau froide, on ajoute alors sous agitation et courant d'azote 1.2 ml d'iodure de méthyle (ICH_3), par portions de 0.3 ml chacune toutes les 15 min. Lorsque cette addition est terminée, la solution est maintenue sous agitation pendant 2h supplémentaire. L'excès d'iodure de méthyle est décomposé par addition d'eau distillée et on dialyse abondamment la solution afin d'éliminer les sels et les excès de réactifs. La solution est ensuite concentrée et lyophilisée.

Le résidu lyophilisé est méthylé une seconde fois selon le même protocole mais en réduisant cette fois-ci les quantités de réactifs, on utilise : 0.8 ml de DMSO et 0.3 ml d'anion diméthylesulfonium, et 3×0.1 ml d'iodure de méthyle et on maintient pendant 1 h de réaction seulement.

La solution contenant les produits méthylés est alors extraite par du chloroforme. La phase chloroformée est lavée trois fois avec de l'eau, séchée avec du sulfite de sodium, filtrée sur un entonnoir et évaporée à sec. Le résidu est hydrolysé par une solution d'acide formique 90 % (1 ml, 1 h à 100°C) et concentré à sec (en prenant garde de ne pas dépasser 30°C car les produits sont volatils). Le résidu est alors hydrolysé une seconde fois par une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) 2N (1.2 ml, 3 h à 100°C), concentré à sec, repris 3 fois par de l'eau. Le pH est ramené à 7 par addition d'ammoniac diluée.

Les sucres méthylés sont ensuite convertis en alditols acétates correspondants selon le protocole décrit dans le paragraphe III.1. Les acétates d'alditols partiellement méthylés sont alors dans un premier temps analysés par CPG/FID dans les mêmes conditions décrites dans le paragraphe III.1. La température de la colonne est programmée de 165°C à 225°C par incréments de 2,5°C.min⁻¹ avec des plateaux de 3 min à 165°C et à 225°C.

Dans un second temps, les constituants du mélange sont identifiés par spectrométrie de masse (fragmentation sous impact électronique) couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG/SM). L'analyse utilise des conditions de séparation identiques à celles des acétates d'alditols à l'aide dans ce cas d'un chromatographe Delsi Di 700 GC équipé d'une colonne capillaire (0,53 mm × 30 m) imprégnée de SP 2380 (0,32 mm) couplée à un spectromètre de masse Nermag R1010C de type quadripôle. Le gaz vecteur est l'hélium et il est utilisé à un débit de 1 ml.min⁻¹. Les molécules sont analysées par fragmentation sous impact électronique avec une tension d'ionisation de 70 eV, intensité de courant 0.150 mA et un interface température de la source 200°C.

III.4. Dosage des sucres acides

III.4.1 Dosage colorimétrique

Le dosage colorimétrique est réalisé selon la méthode de Bulmenkrantz et Asboe-Hansen en utilisant le 3-hydroxydiphényl comme réactif complexant des acides [272]. Pour ce dosage, on prépare au préalable les solutions suivantes :

- Solution A : tétraborate de sodium dans de l'acide sulfurique concentré 0.0125 M
- Solution B : solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 0.125 M
- Solution C : solution à 0.15 % (p/v) de 3-hydroxydiphényle dans "B"

Un échantillon de 5 mg est solubilisé dans 5 ml de la solution "A" pendant une nuit et à l'obscurité. Dans 4 tubes munis de bouchons étanches, on mélange 5 ml de A, 1 ml de solution à doser et 1 ml d'eau distillée. On mélange également dans deux tubes témoins 6 ml de A et 1 ml d'eau. Une fois préparés, ces 6 tubes sont placés dans un bain à 100°C pendant 10 min puis refroidis dans la glace.

Dans 3 tubes contenant la solution à doser, on ajoute alors 100 µl de la solution C et dans le quatrième tube restant qui servira de "blanc", qui permet de déduire les interfaces dus aux sucres neutres, on ajoute 100 µl de la solution B. On maintient alors tous les tubes (témoins compris) pendant 2 h à l'abri de la lumière.

La mesure d'absorbance est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640 à une longueur d'onde de 520 nm. Les tubes témoins serviront pour régler le zéro d'absorbance puis on mesure l'absorbance de l'échantillon (A_e) et celle du blanc (A_b). La valeur corrigée est donc : $A_c = A_e - A_b$. En reportant cette valeur sur une courbe d'étalonnage préalablement établie, on en déduit le pourcentage des sucres acides.

III.4.2. Dosage conductimétrique

Une prise d'essai de 30 à 60 mg préalablement séchée dans une étuve à 60°C est placée dans un tube à essai. On ajoute 15 ml d'acide chlorhydrique 0.01M et on titre le mélange à l'aide d'une solution de soude 0.5 M. Le dosage est suivi par conductimétrie à l'aide d'un conductimètre de type CDM 210 équipé d'une électrode de référence CDM 614T.

IV. Hydrolyse enzymatique

L'endosperme dégraissé de la graine de la figue de barbarie est mis en suspension (1%) dans une solution de tampon acétate (0.2M) à pH=6.1, puis le mélange est placé pendant quelques minutes dans un bain sous ultrasons afin de disperser les granules d'amidon. On rajoute une quantité d'amylase (EC 3.2.1.1) (SIGMA) (1mg/10 mg de l'échantillon) et la suspension est maintenue sous agitation à 37°C pendant 36 heures. La suspension est centrifugée et le culot est lavé abondamment à l'eau distillée puis lyophilisé. On a alors des parois cellulaires purifiées.

V. Purification des xylanes insolubles

La méthode utilisée pour la purification des xylanes insolubles est basée sur une complexation à l'aide des ions cuivriques. En effet le cuivre forme avec les hydroxyles vicinaux du xylose (OH-2 et OH-3) un complexe insoluble. Plusieurs sels de cuivres sont utilisés dont le chlorure de cuivre, le sulfate de cuivre, l'acétate de cuivre et la cupriéthylène diamine. Généralement c'est le sulfate de cuivre qui est utilisé pour la purification des xylanes [273].

Une prise d'essai de 500 mg d'échantillon est dissoute dans 100 ml de solution de soude 0.5 M puis filtrée sur une toile de nylon de porosité 1µm pour éliminer d'éventuels agrégats. La solution de Fehling (sulfate de cuivre) fraîchement préparée est ajoutée lentement au mélange jusqu'à l'apparition d'un précipité. On prend garde de ne pas mettre un excès de liqueur de Fehling car celle-ci risque de redissoudre à nouveau le précipité. La

solution est laissée à décanter pendant 4 heures à 4°C et le précipité formé est récupéré par centrifugation puis lavé à l'eau distillée. Le complexe est finalement décomposé par ajout d'une solution d'éthanol contenant 5% (v/v) d'acide chlorhydrique à 0°C sous agitation pendant une minute. Le résidu est lavé abondamment à l'éthanol, à l'acétone puis à l'eau distillée et finalement lyophilisé.

La liqueur de Fehling est obtenue à partir d'un mélange de deux solutions A et B (V/V) :

- Solution A : une masse 34,6 g de sulfate de cuivre est dissoute dans 500 ml d'eau en présence de quelques gouttes d'acide sulfurique.
- Solution B : 60 g de soude et 173 g de tartrate de sodium et de potassium tétrahydrate dans 500 ml d'eau distillée.

VI. Modification chimique de la cellulose : modes opératoires

VI.1. Traitement à l'ammoniac

Dans un ballon tricol surmonté d'un système condenseur refroidi à l'aide d'un mélange acétone/azote liquide et relié à une arrivée d'ammoniac gazeux, on dispose un échantillon de cellulose. Le ballon est placé dans un bain isolé et refroidi également par un mélange acétone/azote liquide. On laisse condenser l'ammoniac, jusqu'à imprégnation complète de l'échantillon puis on maintient le bain refroidi pendant 5 heures à °C. On laisse l'ammoniac s'évaporer à température ambiante toute une nuit et l'échantillon est maintenu sous pression réduite pour éliminer les traces résiduelles de l'ammoniac.

VI.2. Oxydation

Un échantillon de cellulose est mis en suspension dans l'eau puis on ajoute les quantités nécessaires de TEMPO et de NaBr. Le pH de la solution est ajusté à 10, puis on rajoute par petites portions le volume convenable d'une solution d'hypochlorite de sodium commercial (13.7 % (p/v)). Après l'addition de la solution d'hypochlorite de sodium, le pH est maintenu à 10 par ajout d'une solution de soude 0.5 M jusqu'à la fin de la réaction. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 5 ml de méthanol et le milieu est neutralisé par une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M puis centrifugé. Le surnageant est concentré, dialysé contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

VI.4. Couplage peptidique

VI.4.1. Synthèse des oligoNIPAM

Dans un volume de DMF anhydre, on solubilise en quantités adéquates le N-isopropylacrylamide, le 2-aminoéthanthiol hydrochloride (AET) et le 2,2'-azobis(2-méthylpropionitrile) (AIBN). Le mélange est dégazé plusieurs fois sous vide après congélation dans l'azote liquide puis porté, le ballon scellé sous vide, à 75°C pendant 15 heures dans un bain d'huile. A la fin de la réaction, le DMF est concentré et le polymère formé est précipité dans l'éther éthylique, et purifié par des plusieurs précipitations dans l'éther. Le polymère est redissout dans l'eau puis lyophilisé.

Le N-isopropylacryamide et la 2,2'-azobis(2-méthyl-propionitrile) commerciaux ont été purifiés au préalable par recristallisation dans un mélange hexane-toluène (60/40) et dans le méthanol respectivement.

VI.4.2. Couplage

On dissout un échantillon de l'acide polyglucuronique et une quantité déterminée d'oligoNIPAM de façon à avoir 1 mole de fonctions amines pour 1 mole de fonctions acide carboxyliques, dans un volume d'eau. On ramène le pH vers 8 à l'aide d'une solution NaOH 0.5M puis on rajoute 2 moles de l'EDAC et 2 moles le NHS pour 1 mole d'acide anhydroglucuronique. On ajuste le pH à 8 à l'aide de la solution de soude 0.5M et le mélange est laissé sous agitation pendant 24 heures à pH=8. A la fin de la réaction, le mélange est neutralisé, dialysé durant 2 jours puis lyophilisé.

Afin d'éliminer les oligoNIPAM résiduels, le produit récupéré est soumis à une extraction par le chloroforme dans un sohxlet pendant 24 heures.

VII. Les méthodes microscopiques

VII.1. Préparation des échantillons

VII.1.1. Les coupes semi et ultrafines

Les graines et les échantillons de fibres du péricarpe, préalablement déshydratés, sont imprégnés dans une résine de type épon en utilisant deux bains de solutions de concentration croissante en résine (60 min dans 1/3 d'épon + 2/3 alcool, 60 min dans 2/3 épon + 1/3 alcool). Les échantillons sont ensuite placés dans les alvéoles d'un moule d'inclusion à

plat remplies d'épon et misent à polymériser pendant 60 heures à 60°C. Des coupes semi fines d'une épaisseur de 250 nm sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome MTX RMC équipé d'un couteau en diamant.

VII.1.2. Fixation au glutaraldéhyde

L'opération de fixation a pour but de conserver sans modification les structures correspondant à l'état natif. Elle consiste en des traitements physiques ou chimiques qui permettent d'effectuer sans dommage une déshydratation ultérieure. La fixation chimique au glutaraldéhyde, un dialdéhyde, a pour but de créer artificiellement une réticulation des tissus. Pour ce, on prépare une solution à 2% de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0.1 M. Le bain de fixation est donc un mélange de 1 volume de glutaraldéhyde commercial à 25 %, 5 volumes de tampon phosphate 0.1 M et 4 volumes d'eau. Les échantillons de pelure sont découpés en petits cubes que l'on place une nuit dans ce bain de fixation.

Les coupes de graines préparées auparavant sont fixées pendant 6 heures à température ambiante dans le bain de fixation puis rincées trois fois par ce tampon et stockées une nuit à 4°C dans un tampon phosphate 0.1 M. Les graines sont placées dans un tube eppendorf et déshydratées avec des concentrations croissantes d'éthanol (20 min à une concentration de 70%, 20 min à 95% et 3 bains de 20 min à 100% d'éthanol).

VII.1.3. Séchage par la méthode point critique

Les échantillons de la pelure sont immergés soit dans l'eau ou dans tampon après fixation au glutaraldéhyde. Progressivement l'eau est échangée par de l'éthanol pur, par séjour dans des bains eau/éthanol de concentration croissante en éthanol.

L'éthanol peut ensuite être éventuellement remplacé par de l'acétate d'amyle par des échanges progressifs. Les échantillons dans l'acétate d'amyle pur (ou dans l'éthanol pur) sont placés dans le corps de l'appareil (). Le solvant est alors échangé progressivement par le CO₂ liquide. Il est nécessaire de refroidir l'enceinte pour être à une température inférieure à 16°C. On effectue une dizaine d'échanges successifs puis on maintient les échantillons 60 minutes dans le CO₂ liquide. On vide le réservoir à moitié avant de commencer à chauffer l'enceinte pour atteindre le point critique du CO₂ (31,5°C à 72 bars). Après avoir laissé le CO₂ gazeux s'échapper lentement, on peut retirer les échantillons séchés que l'on conservera dans un dessiccateur.

VII.2. Microscopie optique

Les observations en microscopie optique ont été effectuées sur un appareil ZEISS équipé d'un appareil photo numérique. L'échantillon à observer est déposé sur une lame de verre.

VII.2.1. Biréfringence

Pour l'observation des échantillons cristallins le microscope est équipé d'un polariseur et d'un analyseur orientés à 45° . La lumière transmise par le polariseur est une vibration qui consiste en un champ électrique et un champ magnétique perpendiculaires. La lumière polarisée est éteinte par l'analyseur.

Quand la lumière polarisée traverse un échantillon cristallin, son vecteur champ électrique initial E_0 parallèle à i subit un déphasage δ . Pour un déphasage non nul ou de π le champ électrique possède alors une composante parallèle à j non nulle. Cette composante est alors transmise par l'analyseur. Ainsi seuls sont visibles les éléments biréfringents donc cristallins.

VII.2.2. Contraste de Normaski

L'utilisation du contraste d'interférence différentielle ou contraste de Normaski permet d'observer les objets avec un effet de relief. Par cette méthode, la lumière polarisée est divisée en deux faisceaux parallèles légèrement décalés. Après avoir traversé l'échantillon ces deux faisceaux sont recombinaison. Si les deux faisceaux traversent des milieux d'épaisseur ou d'indice de réfraction différent, les ondes transmises auront des phases différentes. Après recombinaison, l'onde résultante aura une amplitude plus importante et cela pourra donner un effet de contraste. Dans une région dans laquelle les propriétés sont constantes les faisceaux subissent un déphasage toujours identique et il y a alors une lumière uniforme, sans aucun effet de contraste.

VII.3. Microscopie électronique à balayage

Les échantillons de la pelure ou de graines sont déposés sur des plots recouverts d'adhésif et sont, avant observation, dorés au moyen d'un métalliseur JEOL JFC-1100E. Les observations en microscopie électronique à balayage ont été effectuées sur un appareil JEOL JMS-6100.

VII.4. Microscopie électronique à transmission

L'observation en microscopie électronique se fait au moyen d'un bombardement électronique dans une enceinte où règne un vide très poussé. C'est pour cela que le microscope électronique ne permet pas l'observation à température ambiante d'objets hydratés. Nous avons utilisé le microscope Philips EM 400T. Les observations en mode image ont été effectuées sous une tension d'accélération de 120 kV. Les images en coloration négatives sont obtenues à 80 kV.

VII.4.1. Observation directe

On dépose une goutte d'un échantillon dispersé dans l'eau sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone. Les microfibrilles sont observées à plat par transmission, après séchage.

VII.4.2. Coloration négative

La grille est exposée à un rayonnement ultraviolet pendant 1 heure. Ce traitement permet de rendre le film de carbone hydrophile et entraîne une meilleure répartition de l'échantillon et de la couleur. Après séchage d'une goutte de suspension, on dépose une goutte d'une solution d'acétate d'uranyle à 1%.

VII.4.3. Ombrage W/Ta

Pour observer les microfibrilles de cellulose au sein de la paroi, on a réalisé un ombrage. Cette technique consiste à effectuer un dépôt sur l'échantillon par projection d'atomes provenant d'un alliage tungstène/tantale selon un angle de 30°. Les atomes W/Ta sont arrachés d'un filament traversé par un courant d'une tension de 2,5 à 4,5 kV à l'aide d'un canon à électron sous vide (10⁻⁵ à 10⁻⁷ mm Hg). En raison du relief que crée l'échantillon, il y aura des zones exposées au dépôt et d'autres qui lui sont inaccessibles. L'observation de l'échantillon résulte de la différence de relief entre les zones exposées au dépôt et celles qui restent « dans l'ombre ».

VIII. Méthodes chromatographiques

VIII.1. Chromatographie d'échanges d'ions

Le fractionnement des polysaccharides a été réalisé par chromatographie d'échanges d'ions. Deux résines échangeuse d'ions cationiques ont été utilisées, la DEAE-Sepharose 6L-

CB pour le mucilage extrait de la pelure et la DEAE-Trisacryl M pour les polysaccharides pectiques et les hémicelluloses.

Fractionnement du mucilage Un échantillon d'environ 300 mg de mucilage est mis en solution dans 100 ml d'un tampon acétate 0.01 M (pH=5.6). La solution est déposée sur une colonne DEAE-SEPHAROSE 6L-CB préalablement conditionnée dans le même tampon. La colonne est éluée avec 250 ml du tampon initial (0.01 M), puis le fractionnement est réalisé en augmentant progressivement la molarité de l'éluant. Ainsi la colonne est éluée successivement par 250 ml du tampon 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M et 1M. La colonne est régénérée par une solution de 0.5M de soude.

Fractionnement des polysaccharides pectiques et des hémicelluloses Les échantillons de pectines extraits de la pelure ou de l'endosperme sont dé-estérifiés au préalable par saponification à l'aide d'une solution NaOH 0.1 M pendant une nuit à 4°C sous atmosphère d'azote. Les solutions sont ensuite traitées avec une solution d'acide chlorhydrique (0.5 M) jusqu'à pH=5 afin de les obtenir sous leur forme acide H⁺ afin d'accroître les interactions avec le support chromatographique. Les échantillons hémicellulosiques extraits en milieu alcalin ont été acidifiés par un traitement à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (0.5 M).

Les échantillons pectiques ou hémicellulosiques sous leur forme acide sont mis en solution dans environ 100 ml de tampon phosphate 0.05 M (pH=6.3) et déposés sur une colonne (2×20cm) de DEAE-Trisacryl M (sous sa forme phosphate). La fraction est alors éluée à 30 ml/h par 300 ml de tampon puis séquentiellement par 300 ml de ce tampon phosphate contenant 0.125M de chlorure de sodium (NaCl), 300 ml de tampon contenant 0.25M NaCl, 300 ml de tampon contenant 0.5M NaCl et enfin 300 ml de tampon contenant 1M. La colonne est régénérée par une solution de soude 0.5 M.

VIII.2. Chromatographie de perméation sur gel

La purification par chromatographie d'exclusion stérique préparative a été réalisée sur des colonnes de polyacrylamide Biogel P-6 équipées d'un réfractomètre différentiel Waters R401. L'éluant utilisé est le tampon nitrate 0.05 M élué à un débit de 1.5 mL/min.

Les purifications par chromatographie d'exclusion stérique haute performance ont été réalisées avec un appareil Waters 6000A équipé d'un réfractomètre différentiel Waters R401. On utilise deux types de colonnes, Shodex-OHPak B-804 (7.5 x 500 mm) et Shodex-OHPak B-

803 (7.5 x 500 mm) montées en séries et éluées avec un tampon nitrate (0.05 M) à un débit de 1mL/min.

IX. Infrarouge

Les spectres infrarouge ont été enregistrés sur un spectromètre infrarouge PERKIN-ELMER 1720X à transformé de Fourier à partir de pastilles de KBr (1 mg d'échantillon en poudre + 99 mg de KBr) ou à partir de film obtenus par séchage de suspensions cellulosique dans de petits moules. Les spectres sont tous enregistrés en réalisant 20 acquisitions entre 400 et 4000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} .

X. Homogénéisateur Manton-Gaulin

Les homogénéisateurs à haute pression de type Manton-Gaulin permettent d'atteindre de faibles granulométries à l'intérieur d'une émulsion de deux liquides non miscibles ou d'une dispersion de solide dans une phase liquide.

Lors du traitement dans l'homogénéisateur de type Manton-Gaulin, une suspension dans l'eau (d'environ 1% (p/v)) du résidu cellulosique est soumise à des pressions élevées (de 5 à 70 MPa) au moyen d'une pompe à piston, puis détendue à travers un étranglement créé par l'appui d'un clapet sur son siège (Figure V.1). Le produit brut pénètre avec une vitesse de l'ordre de 5 m/s et une pression de l'ordre de 200 bars. Il passe entre siège et clapet à très haute vitesse (de l'ordre de 150 m/s à 200 bars). Le liquide rejeté vient heurter radialement l'anneau de choc et s'échappe homogénéisé. Cette action de cisaillement à vitesse élevée qui intervient entre siège et clapet et contre l'anneau de choc, provoque la désagrégation recherchée.

L'appareil utilisé possède un deuxième clapet placé en série qui constitue le second étage d'homogénéisation qui est réglé normalement à une pression de 10 à 15% de la pression d'homogénéisation totale.

On effectue plusieurs passages successifs de ces matériaux à travers les deux étages d'homogénéisation.

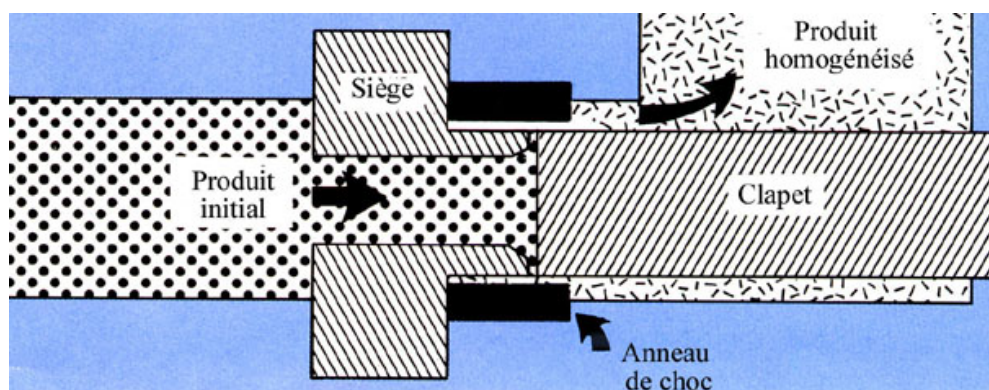


Figure V. 1 : Homogénéisateur de type Manton-Gaulin

XII. Détermination des masses molaires

XII.1. Analyse par HPSEC

Les échantillons de xylanes et d'acide polyglucuronique solubles dans l'eau ont été analysés par chromatographies d'exclusion stérique haute performance (HPSEC). Les solutions de concentration de 1 à 2g/L, selon les masses, sont filtrées sur des membranes Sartorius de porosité 0.2 μm avant analyse. L'appareil utilisé est de type Waters équipé de colonnes chromatographique de perméation sur gel Shodex Ohpak 804, 803 et 802 et de trois détecteurs montés en séries :

- Un réfractomètre différentiel qui permet de déterminer la concentration réelle de la solution injectée.
- Un viscosimètre composé de trois capillaires qui permet de déduire la viscosité intrinsèque de la solution.
- Un appareil de diffusion de la lumière qui permet alors d'accéder à la masse moléculaire moyenne en nombre et au rayon de giration à partir de la méthode de Zimm.

L'appareil est piloté par un ordinateur équipé du logiciel ASTRA qui permet de faire les calculs automatiquement et d'obtenir les masses molaires moyennes en nombre.

XII.2. Analyse par viscosité [274]

La méthode viscosimétrique est une technique simple et rapide à mettre en œuvre. Elle s'appuie sur le fait que la viscosité intrinsèque d'un polymère est liée par des lois empiriques

à la masse moléculaire du polymère et donc au degré de polymérisation moyen viscosimétrique (\overline{DP}_v).

On caractérise la viscosité η d'une solution de concentration c dans un solvant de viscosité η_o à l'aide de la viscosité intrinsèque :

$$[\eta] = \eta_o \times (1 + [\eta]c + Ac^2 + \dots)$$

On mesure donc $[\eta]$ par extrapolation à concentration nulle de la viscosité réduite η_r qui est exprimée par la relation :

$$\eta_r = \frac{(\eta - \eta_o)}{(\eta_o c)} = f(c), \text{ qui peut encore être écrite } \eta_r = [\eta] + k'c$$

Cette viscosité est liée à la masse moléculaire selon la relation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = KM^a$$

Les constantes K et a sont caractéristiques d'un polymère dans des conditions déterminées. Dans le cas de la cellulose dans la cupriéthylènediamine (CED 1N) à 25°C, ces paramètres ont été établis par Rinaudo [275] et l'équation est écrite alors comme suit:

$$[\eta] = 0,891(\overline{DP}_v)^{0,936}$$

La mesure de degré de polymérisation moyen viscosimétrique (\overline{DP}_v) des échantillons de cellulose a été déterminée à partir de la mesure de viscosité intrinsèque à 25°C de solutions d'échantillons dans de la cupriéthylènediamine (CED) 1N en utilisant la relation précédente.

Le solvant (CED 1N) est préparé à partir de CED 3N commerciale (PROLABO), laissé sous un courant d'azote avant utilisation. L'échantillon sec (15-80 mg selon le DP) est mis en solution dans 15 mL de CED 1N et agité en présence de billes de verre pendant 2h sous azote et à l'abri de la lumière. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'un appareil Sartorius équipé de filtres en nylon de porosité 5µm. La mesure de viscosité est alors effectuée sur 10 mL de cette solution à 25°C dans un viscosimètre capillaire de type Ubbelohde de 0.58 mm de diamètre équipé d'un système de dilution automatique (viscomatic MS Fica). On mesure également le temps d'écoulement du solvant pur dans les mêmes conditions.

XII.3. Analyse par diffusion de la lumière

Les échantillons de xylanes insolubles dans l'eau ont été dissous dans du DMSO bi-distillé sous agitation pendant 24 heures à 25°C. Les solutions obtenues ont été ensuite

filtrées sur des membranes de nylon (filtres PALL Gelman Laboratory, porosité 0,2 μm) puis analysées en diffusion de la lumière en mode statique à l'aide d'un spectromètre (Spectra Physics model 2020) équipé d'un laser à argon opérant à une longueur d'onde de 488 nm. Les solutions sont placées dans une cellule dont la température est réglée à $25^{\circ}\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Le système de détection placé sur un bras motorisé est contrôlé par ordinateur (ALV, Langen-Germany Instruments). L'intensité diffusée passe à travers un filtre à bande passante (488 nm) et un orifice d'un diamètre 200 μm . Elle est ensuite mesurée à l'aide d'un tube photomultiplicateur (ALV). Les masses molaires M_w ont été calculées à partir des digrammes de Zimm réalisés à l'aide des équations ci-après.

Rappel théorique [274]

L'expérience de diffusion de rayonnement consiste à envoyer un faisceau incident monochromatique sur l'échantillon à étudier et à analyser le rayonnement diffusé dans toutes les directions (voir Figure x).

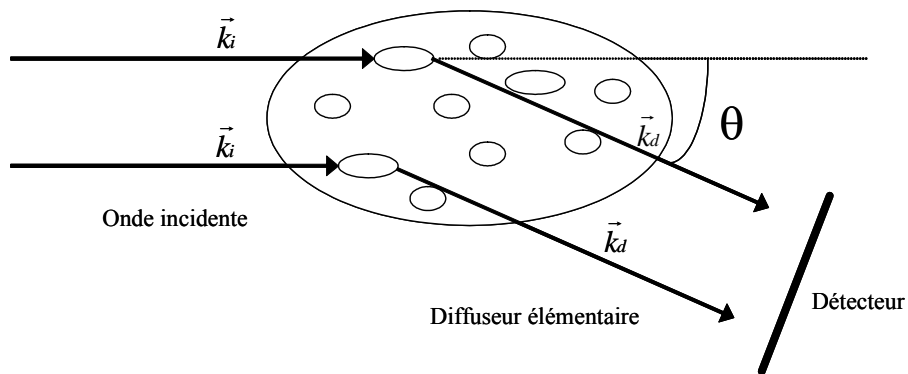


Figure V. 2 : Principe élémentaire de l'expérience de diffusion

Ce rayonnement est diffusé par un ensemble de diffuseurs ponctuels de manière isotrope ; ces objets étant très petit par rapport à la longueur d'onde incidente λ_i . Un polymère est constitué d'un ensemble de diffuseurs élémentaires de la taille du monomère. Les modules des vecteurs d'ondes incident \vec{k}_i et diffusé \vec{k}_d sont définis comme suit :

$$|\vec{k}_i| = \frac{2\pi n}{\lambda_i} \quad |\vec{k}_d| = \frac{2\pi n}{\lambda_d} \quad (\text{V.1})$$

où λ_i et λ_d sont les longueurs d'onde incidente et diffusée dans le vide et n l'indice de réfraction du milieu. Ce rayonnement est matérialisé par un vecteur d'onde de transfert \vec{q} défini par la relation $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_d$. Pour une diffusion élastique sans transfert d'énergie, les

modules des vecteurs d'onde incident et diffusé sont égaux. Dans ce cas, le module du vecteur d'onde de transfert s'écrit :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin \frac{\theta}{2} \quad (V.2)$$

L'inverse du module du vecteur d'onde, q^{-1} , représente l'échelle d'observation du système fixée par l'angle θ et la longueur d'onde du faisceau incident. L'angle θ varie de 15° à 150° pour l'appareil utilisé ce qui fait que pour une longueur d'onde incidente fixée à 488 nm et n égale 1,4795 (DMSO), q^{-1} peut varier alors de 30 nm à 200 nm.

Lors de notre étude, un seul type d'expérience a été abordée : la diffusion élastique ou statique de la lumière. Elle permet, par mesure de l'intensité diffusée de la lumière, d'accéder aux facteurs de structure $S(q)$ et de forme $P(q)$ de la solution. Des informations sur la masse, la taille des particules et le second coefficient de viriel qui renseigne sur les interactions moléculaires peuvent alors être déduites. L'intensité diffusée de la lumière est généralement exprimée selon la relation de Rayleigh : $I_p(q,c)$ exprimé en cm^{-1} .

$$I_p(q,c) = \frac{4\pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{N_A \lambda^4} c M_w P(q) S(q) = K c M_w P(q) S(q) \quad (V.3)$$

Où N_A le nombre d'Avogadro, c la concentration massique en particules, dn/dc l'accroissement de l'indice de réfraction n avec la concentration en particule c , K la constante de diffusion et M_w représente la masse molaire moyenne en masse des macromolécules.

Expérimentalement, la mesure du facteur de Rayleigh est obtenu de façon indirecte, en comparant l'intensité diffusée par l'échantillon ($I_{\text{solution}} - I_{\text{solvant}}$) à celle diffusée par un liquide de référence I_{ref} mesurée dans les mêmes conditions et pour lequel le facteur de Rayleigh est connu. $I_p(q)$ est obtenu de la manière suivante :

$$I_p(q) = \frac{I_{\text{solution}} - I_{\text{solvant}}}{I_{\text{ref}}} \left(\frac{n_{\text{solvant}}}{n_{\text{ref}}} \right)^2 \times R_{\text{ref}}(q) \quad (V.4)$$

Le liquide de référence est dans notre cas le toluène ($R_{\text{ref}} = 40 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ à $\lambda = 488 \text{ nm}$) et n_{solvant} et n_{ref} sont respectivement les indices de réfraction du solvant dans lequel est dissout l'échantillon et du toluène (n_{ref} est égale à 1,4967). Les intensités I mesurées sont exprimées en cm^{-1} .

L'intensité diffusée à différents angles est mesurée pour un échantillon testé à plusieurs concentrations en régime dilué. Les résultats expérimentaux pour chaque concentration sont représentés sur un diagramme de *Zimm*. Dans un tel diagramme, le

facteur $Kc/I_p(q,c)$ est représenté en fonction de q^2 et de la concentration selon l'expression de *Viriel* :

$$\frac{Kc}{I(q,c)} = \frac{1}{M_w} \times (1 + q^2 \times \frac{\langle R_G^2 \rangle}{3} + \dots) + 2A_2 \times c + \dots \quad (V.5)$$

Avec R_G , le rayon de giration des macromolécules étudiées et A_2 , le second coefficient de *Viriel* qui traduit les interactions entre les macromolécules. Ce coefficient est déterminé par extrapolation à angle nul ($q^2 = 0$) de la courbe (V.5) :

$$\left(\frac{Kc}{I(q,c)} \right)_{q^2=0} = \frac{1}{M_w} + 2A_2 \times c \quad (V.6)$$

L'ordonnée à l'origine de cette dernière courbe ($c = 0$) donne $1/M_w$ et donc M_w , la masse moléculaire moyenne en nombre des macromolécules en solution.

$$\left(\frac{Kc}{I(0,0)} \right) = \frac{1}{M_w} \quad (V.8)$$

Les concentrations utilisées pour les diagrammes de *Zimm* correspondent à un régime dilué et sont égales à $2,5 \times 10^{-3}$, $2,0 \times 10^{-3}$, $1,5 \times 10^{-3}$ et $1,0 \times 10^{-3}$ g.mL⁻¹ pour les différentes fractions de xylanes insolubles extraites.

XIII. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN

XIII.1. En phase liquide (haute résolution)

XIII.1.1. RMN monodimensionnelle (1D)

RMN du proton

Les échantillons sont mis en solution dans de l'eau lourde (5 mg dans 0.75 ml de solvant, tube de diamètre 5 mm) et les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 400 équipé d'une sonde QNP à température ambiante ou à 60°C (référence interne: signal méthyle de l'acétone à 2.1 ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane à 0 ppm). Les spectres sont enregistrés avec des impulsions de 8.2 μ s, et 3300 Hz de fenêtre spectrale (64K points d'acquisition) et on obtient en 32 passages des spectres avec un bon rapport signal sur bruit.

R.M.N. ¹³C

Les spectres ¹³C ont été enregistrés soit sur un spectromètre Bruker AC 300 équipé d'une sonde duale, soit sur un spectromètre Bruker Avance 400 équipé d'une sonde QNP.

Les échantillons sont mis en solution dans de l'eau lourde (30 mg dans 0,5 ml de solvant, tube de diamètre 5 mm) et les spectres enregistrés à température ambiante ou à 60°C (référence interne : signal méthyle de l'acétone à 31.0 ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane à 0 ppm).

Les expériences ^{13}C quantitatifs sont réalisés en utilisant la séquence Bruker INVGATE avec des impulsions de 6.5 μs , une fenêtre spectrale de 15000 Hz, un temps d'acquisition de 0.54 s, et un délai de relaxation de 2 s.

^{13}C -DEPT

Les expériences DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer) ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker AC 300 avec une séquence standard Bruker. L'impulsion utilisée est de 135°.

XIII.1.2. RMN bidimensionnelle (2D)

Toutes les expériences RMN 2D ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker Avance 400.

RMN 2D homonucléaire ^1H - ^1H

Les expériences COSY sont enregistrées en utilisant une séquence standard Bruker avec : une matrice de 2048 (t_1) x 512 (t_2) points, fenêtre spectrale 2.5 kHz selon les directions F_1 et F_2 . Les acquisitions ont été traitées par une fonction sinusoidale avant transformée de Fourier selon les 2 dimensions.

RMN 2D hétéronucléaire ^{13}C - ^1H

La corrélation hétéronucléaire ($^1J_{\text{CH}}$) a été conduite selon deux séquences en fonction des échantillons :

- La séquence HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)
- La séquence HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

La corrélation hétéronucléaire ($^2J_{\text{CH}}$ et $^3J_{\text{CH}}$) a été réalisée à l'aide de la séquence HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Un filtre de type "low pass" ($J = 145$ Hz) a été utilisé pour éliminer les couplages scalaires directs ($^1J_{\text{CH}}$).

Toutes les expériences ont été enregistrées en utilisant les séquences standard Bruker avec : matrice 2048 (t_2 ^1H) x 1024 (t_1 ^{13}C) points, selon les directions F_1 (^{13}C) et F_2 (^1H). Les acquisitions ont été traitées par une fonction sinusoidale avant transformation de Fourier selon les 2 dimensions.

XIII.2. En phase solide CP/MAS

Les spectres du carbone-13 à l'état solide avec polarisation croisée et rotation à l'angle magique ont été réalisés par le Dr L. HEUX. L'appareil utilisé est un spectromètre BRUKER MSL 200 MHz ou DMX 400 MHz. Les échantillons ont été placés dans un rotor en zirconium. La fréquence de rotation est comprise entre 3 et 4 KHz. Les spectres ont été enregistrés avec un temps de contact de 1 ms, un temps d'acquisition (AQ) de 25 ms et un délai entre chaque impulsion de 5 s.

Afin d'améliorer la résolution, certains spectres ont été obtenus par un traitement mathématique du signal de précession libre par l'intermédiaire d'une fonction de la forme $\exp[-at - bt^2]$, avec $a = p \times LB$ et $b = -a / (2 \times GB \times AQ)$, avec un élargissement de raie (LB) = 30 Hz et un facteur gaussien (GB) = 0.2.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Boullard, B. *Dictionnaire de Botanique*. Marketing ed. 1988.
- [2] Guignard, J.L. *Abrégé de botanique*. Masson ed. 1993.
- [3] Wallace, R.S.; Gibson, A.C. Evolution and systematics. Dans *Cacti: Biology and uses*; P.S. Nobel Ed., 1997; pp. 1-21.
- [4] Salgado, T.T.; Mauseth, J.D. Shoot anatomy and morphology. Dans *Cacti: Biology and uses*; P.S. Nobel Ed., 1997; pp. 23-56.
- [5] Arba, M. *Les Opuntias à fruits comestibles dans certaines régions du Maroc*. Dans *IIème journée nationale sur la culture du cactus*. 2000. El Kelaa Des Sraghna-Maroc.
- [6] Sutton, B.G.; Ting, I.P.; Sutton, R., *Plant Physiol.*, **1981**, 68 (3), 784-787.
- [7] Leuttge, U., *New Phytologist*, **1993**, 125 (1), 59-71.
- [8] Poupon, J.E. *Cactus et ressources fourragères*. Dans *Amélioration et aménagement des parcours forestiers*. 1975: MAMVA.
- [9] Nerd, A.; Karadi, A.; Mizhari, Y., *Plant soil*, **1991**, 137 (2), 201 - 207.
- [10] Helmuth, G.Z.; Granata, G. Insect Pests and Diseases. Dans *Cacti Biology and Uses*; P.S. Nobel Ed., 1997; pp. 235-254.
- [11] Hamdi, M., *Bioprocess Eng.*, **1997**, 17 (6), 387-391.
- [12] Askar, A.; El-Samahy, S.K., *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, **1981**, 77 (8), 279-281.
- [13] Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R., *Eur. Food Res. Technol.*, **2001**, 212 (4), 396-407.
- [14] Anonyme Table de composition des fruits exotiques. Dans *Répertoire général des aliments*, 1993; pp. 122-124.
- [15] Mohamed-Yasseen, Y.; Barringer, S.A.; Splittstoesser, W.E., *J. Arid Environ.*, **1996**, 32 (3), 347-353.
- [16] Dominguez, L.A., *Food Sci. Technol. Int.*, **1995**, 1 (2&3), 65-74.
- [17] Shoop, M.C.; Alford, E.J.; Mayland, H.F., *J. Range Mgmt.*, **1977**, 30, 12-16.
- [18] De Cortazar, V.G.; Nobel, P.S., *J. Am. Soc. Hor. Sci.*, **1992**, 117 (4), 558 - 562.
- [19] Gonzalez, C.L., *J. Arid Environ.*, **1989**, 16, 87-94.
- [20] Russel, C.E.; Felker, P., *Econ. Bot.*, **1985**, 41, 433-445.
- [21] Saenz, C., *Acta Horticulturae*, **2002**, 581, 253-263.
- [22] Pimienta-Barrios, E., *Ciencia*, **1993**, 44 (3), 339-350.
- [23] Palevitch, D., *Int. J. Att. Comp. Med.*, **1994**.
- [24] Park, E.H.; Kahng, J.H.; Sang, H.L.K.H.; Shin, K.H., *Fitoterapia*, **2001**, 72 (3), 288 - 290.
- [25] McNeil, M.; Darvill, A.G.; Fry, S.C.; Albersheim, P., *Ann. Rev. Biochem*, **1984**, 53, 625-663.
- [26] Carpita, N.C.; Gibeaut, D.M., *Plant J.*, **1993**, 3 (1), 1-30.
- [27] Willats, W.G.T.; McCartney, L.; Mackie, W.; Knox, J.P., *Plant Mol. Biol.*, **2001**, 47 (1-2), 9-27.
- [28] Ridley, B.L.; O'Neill, M.A.; Mohnen, D., *Phytochemistry*, **2001**, 57 (6), 929-967.
- [29] May, C.D., *Hydrocolloids*, **2000**, 169-188.
- [30] O'Neill, M.A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. Dans *Methods in Plant Biochemistry*; D. Harborne Ed., 1990; pp. 415-444.
- [31] Ralet, M.C.; Bonnin, E.; Thibault, J.F., *Biopolymers*, **2002**, 6, 345-380.
- [32] Voragen, A.G.J.; Pilnik, W.; Thibault, J.F.; Axelos, M.A.V.; Renard, C.M.G.C., *Food Sci. Technol.*, **1995**, 67, 287-339.
- [33] Thibault, J.F.; Ralet, M.C., *Adv. Diet. Fibre Technol.*, **2001**, 2, 369-378.
- [34] Kertesz, Z.I. *The Pectic Substances*. 1951. 640 pp.

- [35] Perez, S.; Rodriguez-Carvajal, M.A.; Doco, T., *Biochimie*, **2003**, 85 (1/2), 109-121.
- [36] Pellerin, P.; Doco, T.; Vidal, S.; Williams, P.; Brillouet, J.M., *Prog. Biotechnol.*, **1996**, 14, 67-78.
- [37] Doco, T.; Williams, P.; Vidal, S.; Pellerin, P., *Carbohydr. Res.*, **1997**, 297 (2), 181-186.
- [38] Bouveng, H.O., *Acts Chem. Scand.*, **1965**, 19 (4), 953-963.
- [39] Huisman, M.M.H.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J., *Carbohydr. Polym.*, **1999**, 38 (4), 299-307.
- [40] Nakamura, A.; Furuta, H.; Maeda, H.; Takao, T.; Nagamatsu, Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2002**, 66 (5), 1155-1158.
- [41] Le Goff, A.; Renard, C.M.G.C.; Bonnin, E.; Thibault, J.F., *Carbohydr. Polym.*, **2001**, 45 (4), 325-334.
- [42] Renard, C.M.G.C.; Weightman, R.M.; Thibault, J.F., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1997**, 21 (1,2), 155-161.
- [43] Oechsli, R.; Lutz, M.V.; Amado, R., *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 51 (3), 301-310.
- [44] Schols, H.A.; Bakx, E.J.; Schipper, D.; Voragen, A.G.J., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 279, 265-279.
- [45] Stephen, A.M. Other plant polysaccharides. Dans *The polysaccharides*; G.O. Aspinall Ed., 1983; pp. 98-193.
- [46] Arifkhodzhaev, A.O., *Chem. Nat. Compd.*, **2000**, 36 (3), 229-244.
- [47] Dudkin, M.S., *Khim. Drev.*, **1969**, 3, 19-20.
- [48] Takahisa, H., *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1989**, 40, 136-168.
- [49] Whistler, R.L.; Chen, C.C., *I. Fiber Sci. Technol.*, **1991**, 11, 287-319.
- [50] Wilkie, K.C.B., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1979**, 36, 215-264.
- [51] Irvine, J.C.; Hirst, E.L., *J. Chem. Soc.*, **1922**, 121, 1585-1591.
- [52] Irvine, J.C.; Hirst, E.L., *J. Chem. Soc.*, **1923**, 123, 518-532.
- [53] Friese, H.; Hess, K., *Ann.*, **1927**, 456, 38-54.
- [54] Marx-Figini, M., *J. Polym. Sci.*, **1969**, 28, 57-67.
- [55] Goring, D.A.I.; Timell, T.E., *Tappi*, **1962**, 45 (6), 454-460.
- [56] Dinand, E. *Microfibrilles de cellulose: Isolement à partir de pulpes de betterave, caractérisation et propriétés*. 1997, Université Joseph Fourier: Grenoble.
- [57] Isogai, A., *Cellul. Polym., Blends Compos.*, **1994**, 1-24.
- [58] Debzi, E.M.; Chanzy, H.; Sugiyama, J.; Tekely, P.; Excoffier, G., *Macromolecules*, **1991**, 24 (26), 6816-6822.
- [59] Horii, F.; Yamamoto, H.; Kitamaru, R.; Tanahashi, M.; Higuchi, T., *Macromolecules*, **1987**, 20 (11), 2946-2949.
- [60] Yamamoto, H.; Horii, F.; Odani, H., *Macromolecules*, **1989**, 22 (10), 4130-4132.
- [61] Kolpak, F.J.; Weih, M.; Blackwell, J., *Macromolecules*, **1976**, 9, 273-278.
- [62] Herrick, F.W., *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Sym.*, **1983**, 37, 993-1023.
- [63] Chanzy, H.; Imada, K.; Mollard, A.; Vuong, R.; Barnoud, F., *Protoplasma*, **1979**, 100 (3-4), 303-316.
- [64] Helbert, W.; Sugiyama, J.; Ishihara, M.; Yamanaka, S., *J. Biotech.*, **1997**, 57 (1-3), 29-37.
- [65] Nishiyama, Y.; Sugiyama, J.; Chanzy, H.; Langan, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 14300-14306.
- [66] Nishiyama, Y.; Langan, P.; Chanzy, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124 (31), 9074-9082.
- [67] Sarko, A.; Southwick, J.; Hayashi, J., *Macromolecules*, **1976**, 9, 857-863.
- [68] Gardiner, E.S.; Sarko, A., *Can. J. Chem.*, **1985**, 63 (1), 173-180.
- [69] Hon, D.N.S., *Cellulose*, **1994**, 1 (1), 1-25.
- [70] Preston, R.D.; Nicolai, E.; Reed, R.; Millard, A., *Nature*, **1948**, 162, 665-667.
- [71] Kratky, O.; Mark, H., *Z. physik. Chem.*, **1937**, B36, 129-139.

- [72] Hess, K.; Mahl, H.; Gutter, E., *Kolloid-Z.*, **1957**, 155, 1-19.
- [73] Dolmetsch, H.; Dolmetsch, H., *Kolloid-Z.*, **1962**, 185 (2), 106-119.
- [74] Marx-Figini, M.; Schulz, G.V., *Naturwissenschaften*, **1966**, 53 (18), 466-474.
- [75] St. John Manley, R., *Proc. Can. Wood Chem. Symp.*, **1965**, 1963, 248-249.
- [76] Chanzy, H.; Henrissat, B., *FEBS Lett.*, **1985**, 184 (2), 285-288.
- [77] Koyama, M.; Helbert, W.; Imai, T.; Sugiyama, J.; Henrissat, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94 (17), 9091-9095.
- [78] Selvendran, R.R.; Stevens, B.J.H.; O'Neil, M.A. Developements in the isolation and analysis of cell walls from edible plants. Dans *Biochemistry of plant cell walls*; Cambridge University Press, 1985; pp. 39-78.
- [79] Selvendran, R.R., *J. Cell. Sci. Suppl.*, **1985**, 2, 51-88.
- [80] Selvendran, R.R.; O'Neill, M.A., *Methods Biochem. Anal.*, **1987**, 32, 153-155.
- [81] Joseleau, J.P. Les hémicelluloses. Dans *Les polymères végétaux, polymères pariétaux et aliments non azotés*; G. Villars Ed., 1980; pp. 87-121.
- [82] Whistler, R.L.; Sannella, J.L. Hemicelluloses. Dans *Proc. Intern. Congr. Biochem.* 1959. Vienna.
- [83] Jayme, G., *Bull. Inst. Paper Chem.*, **1942**, 13, 136.
- [84] Wise, L.E.; Murphy, M.; D'Addieco, A.A., *Paper Trade J.*, **1946**, 122 (2), 35-43.
- [85] Renard, C.M.G.C.; Thibault, J.F., *Prog. Biotechnol.*, **1996**, 14, 603-608.
- [86] Renard, C.M.G.C.; Thibault, J.-F., *Carbohydr. Res.*, **1996**, 286, 139-150.
- [87] Aspinall, G.O., *Advances Carbohydr. Chem.*, **1959**, 14, 429-468.
- [88] Nevell, T.P. Cellulose: Structure, properties and behavior in the dyeing process. Dans *Cellulosics Dyeing*, 1995; pp. 1-80.
- [89] Sawaya, W.N.; Khalil, J.K.; Al-Mohammad, M.M., *Qual. Plant. - Plant Foods Hum. Nutr.*, **1983**, 33 (1), 91-97.
- [90] Uchoa, A.F.; Souza, P.A.S.; Zarate, R.M.L.; Gomes-Filho, E.; Campos, F.A.P., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1998**, 31 (6), 757-761.
- [91] Barbagallo, R.N.; Spagna, G., *Ind. Aliment.*, **1999**, 38 (383), 815-817.
- [92] Endo, S.; Ikeda, M.; Mitsuhashi, T., *Tokyo Gakugei Daigaku Kiyo*, **1985**, 37, 17-20.
- [93] Krifa, M.; Villet, A.; Krifa, F.; Alary, J., *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol.*, **1993**, 86 (918), 161-174.
- [94] Ramadan, M.F.; Mörsel, J.T., *Food Chem.*, **2003**, 82 (3), 339-345.
- [95] Salvo, F.; Galati, E.M.; Lo Curto, S.; Tripodo, M.M., *Acta Horticulturae*, **2002**, 581, 283-289.
- [96] Sawaya, W.N.; Khan, P., *J. Food Sci.*, **1982**, 47 (6), 2060-2061.
- [97] El Kossori, R.L.; Villaume, C.; El Boustani, E.; Sauvaire, Y.; Mejean, L., *Plant Food Hum. Nutr.*, **1998**, 52 (3), 263-270.
- [98] Barbera, G.; Inglese, P.; La Mantia, T., *Sci. Hortic.*, **1994**, 58 (1-2), 161 - 165.
- [99] Vaughan, J.G. Seed anatomy and feed microscopy. Dans *Research in plant anatomy*, 1970; pp. 35-43.
- [100] Metcalfe, C.R.; Chalk, L. *Anatomy of the dicotyledones*. The Clarendon ed. Vol. II. 1950.
- [101] Teleman, A.; Lundqvist, J.; Tjerneld, F.; Stalbrand, H.; Dahlman, O., *Carbohydr. Res.*, **2000**, 329 (4), 807-815.
- [102] Kardosova, A.; Matulova, M.; Malovikova, A., *Carbohydr. Res.*, **1998**, 308 (1-2), 99-105.
- [103] Denisyuk, N.A.; Dudkin, M.S., *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, **1985** (4), 478-481.
- [104] Dudkin, M.S.; Denisyuk, N.A., *Chem. Nat. Comp.*, **1989** (3), 324-327.
- [105] Kardosova, A.; Capek, P.; Rosik, J., *Chemical Papers*, **1989**, 43 (5), 705-713.
- [106] Swamy, N.R.; Salimath, P.V., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 197, 327-337.

- [107] Bazus, A.; Rigal, L.; Gaset, A.; Fontaine, T.; Wieruszkeski, J.M.; Fournet, B., *Carbohydr. Res.*, **1993**, 243 (2), 323-332.
- [108] Kardosova, A.; Malovikova, A.; Patoprsty, V.; Nosal'ova, G.; Matakova, T., *Carbohydr. Polym.*, **2001**, 47 (1), 27-33.
- [109] Teleman, A.; Tenkanen, M.; Jacobs, A.; Dahlman, O., *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337 (4), 373-377.
- [110] Vignon, M.R.; Gey, C., *Carbohydr. Res.*, **1998**, 307 (1,2), 107-111.
- [111] Dinand, E.; Vignon, M.R., *Carbohydr. Res.*, **2001**, 330 (2), 285-288.
- [112] Ebringerova, A.; Hromadkova, Z.; Burchard, W.; Dolega, R.; Vorwerg, W., *Carbohydr. Polym.*, **1994**, 24 (3), 161-169.
- [113] Chanliaud, E.; Saulnier, L.; Thibault, J.F., *J. Cereal Sci.*, **1995**, 21 (2), 195-203.
- [114] Eremeeva, T.E.; Khinoverova, O.E., *Cell. Chem. Technol.*, **1990**, 24 (4), 439-444.
- [115] Eremeeva, T.E.; Bykova, T.O., *J. Chromatogr.*, **1993**, 639 (2), 159-164.
- [116] Vinkx, C.J.A.; Van Haesendonck, I.; Vanhamel, S.; Cleemput, G.; Delcour, J.A., *Prog. Biotechnol.*, **1992**, 7, 387-390.
- [117] Jacobs, A.; Dahlman, O., *Biomacromolecules*, **2001**, 2 (3), 894-905.
- [118] Jacobsson, O.; Kiiver, t.; Granath, K., *J. L. Chromatogr.*, **1986**, 9 (7), 1549-1561.
- [119] Koerner, H.U.; Gottschalk, D.; Puls, J., *Papier*, **1984**, 38 (6), 255-261.
- [120] Saito, H.; Yamada, J.; Yoshioka, Y.; Shibata, Y.; Erata, T., *Biopolymers*, **1991**, 31 (8), 933-940.
- [121] Saito, H., *Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi*, **1992**, 50 (5), 488-497.
- [122] Saito, H.; Yokoi, M.; Yoshioka, Y., *Macromolecules*, **1989**, 22 (10), 3892-3898.
- [123] Saito, H.; Tabeta, R.; Yokoi, M.; Erata, T., *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1987**, 60 (12), 4259-4266.
- [124] Marchessault, R.H.; Settineri, W.J.; Winter, W., *Tappi*, **1967**, 50 (2), 55-59.
- [125] Horio, M.; Imamura, R., *J. Polym. Sci.*, **1964**, 2, 627-644.
- [126] Nieduszynski, I.; Marchessault, R.H., *Nature*, **1971**, 232 (5305), 46-47.
- [127] Teleman, A.; Larsson, P.T.; Iversen, T., *Cellulose*, **2001**, 8 (3), 209-215.
- [128] Lyons, R.K.; Timell, T.E., *Cell. Chem. Technol.*, **1969**, 3 (6), 543-554.
- [129] Dudkin, M.S.; Parfent'eva, M.A.; Shkantova, N.G., *Chem. Nat. Comp.*, **1980** (5), 612-614.
- [130] Lindberg, B.; Mosihuzzaman, M.; Nahar, N.; Abeysekera, R.M.; Brown, R.G.; Willison, J.H.M., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 207 (2), 307-310.
- [131] Sharma, U.; Mukherjee, A.K., *Carbohydr. Res.*, **1981**, 95 (1), 81-86.
- [132] Sharma, U., *Carbohydr. Res.*, **1982**, 111 (1), 151-155.
- [133] Bhaduri, S.K.; Sen, S.K.; Dasgupta, P.C., *Carbohydr. Res.*, **1983**, 121, 211-220.
- [134] Aspinall, G.O.; Carter, M.E., *J. Chem. Soc.*, **1956**, 3744-3748.
- [135] Srivastava, H.C.; Adams, G.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 2409-2412.
- [136] Aspinall, G.O.; Das Gupta, P.C., *J. Chem. Soc.*, **1958**, 3627-3631.
- [137] Jones, J.K.N.; Painter, T.J., *J. Chem. Soc.*, **1957**, 669-673.
- [138] Dutton, G.G.S.; Murata, T.G., *Can. J. Chem.*, **1961**, 39, 1995-2000.
- [139] Kohn, R.; Hromadkova, Z.; Ebringerova, A.; Toman, R., *Coll. Cz. Chem. Comm.*, **1986**, 51 (10), 2243-2249.
- [140] Siddiqui, I.R.; Wood, P.J., *Carbohydr. Res.*, **1977**, 54 (2), 231-236.
- [141] Dutton, G.G.S.; McKelvey, S.A., *Can. J. Chem.*, **1961**, 39, 2582-2589.
- [142] Gillham, J.K.; Timell, T.E., *Can. J. Chem.*, **1958**, 36, 1467-1474.
- [143] Adams, G.A., *Can. J. Chem.*, **1957**, 35, 556-564.
- [144] Watanabe, T.; Kato, Y.; Kanari, T.; Okazaki, T., *Agri. Biol. Chem.*, **1991**, 55 (4), 1139-1141.
- [145] Jones, J.K.N.; Purves, C.B.; Timell, T.E., *Can. J. Chem.*, **1961**, 39, 1059-1066.

- [146] Eda, S.; Ohnishi, A.; Kato, K., *Agr. Biol. Chem.*, **1976**, 40 (2), 359-364.
- [147] Aspinall, G.O.; Hirst, E.L.; Mahomed, R.S., *J. Chem. Soc.*, **1954**, 1734-1738.
- [148] Timell, T.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 4989-4994.
- [149] Mian, A.J.; Timell, T.E., *Tappi*, **1960**, 43, 775-781.
- [150] Watanabe, T.; Mitsuishi, Y.; Kato, Y., *J. Appl. Glycosci.*, **1999**, 46 (3), 281-284.
- [151] Bowering, W.D.S.; Marchessault, R.H.; Timell, T.E., *Svensk Papperstidning*, **1961**, 64, 191-194.
- [152] Glaudemans, C.P.J.; Timell, T.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 1209-1213.
- [153] Rosell, K.G.; Svensson, S., *Carbohydr. Res.*, **1975**, 42 (2), 297-304.
- [154] Jiang, K.S.; Timell, T.E., *Cell. Chem. Technol.*, **1972**, 6 (5), 493-498.
- [155] Odonmazig, P.; Badgaa, D.; Ebringerova, A.; Mihalov, V.; Alfoldi, J., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 198 (1), 163-167.
- [156] Saarnio, J.; Wathen, K.; Gustafsson, C., *Acta Chem. Scand.*, **1954**, 8, 825-828.
- [157] Warwicker, J.O., *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **1967**, 5 (10), 2579-2593.
- [158] Dinand, E.; Vignon, M.R.; Chanzy, H.; Heux, L., *Cellulose*, **2002**, 9 (1), 7-18.
- [159] Turbak, A.F.; Snyder, F.W.; Sandberg, K.R., 1982, Eur. Pat. Appl.
- [160] Turbak, A.F.; Snyder, F.W.; Sandberg, K.R., *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Sym.*, **1983**, 37, 815-827.
- [161] Turbak, A.F.; Snyder, F.W.; Sandberg, K.R., 1985, Patentschrift (Switz.)
- [162] Herrick, F.W.; Casebier, R.L.; Hamilton, J.K.; Sandberg, K.R., *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Sym.*, **1983**, 37, 797-813.
- [163] Dinand, E.; Chanzy, H.; Vignon, M.R., *Food Hydrocolloids*, **1999**, 13 (3), 275-283.
- [164] Segal, L.; Creely, J.J.; Martin, A.E., Jr.; Conrad, C.M., *Text. Res. J.*, **1959**, 29, 786-794.
- [165] Atalla, R.H.; Gast, J.C.; Sindorf, D.W.; Bartuska, V.J.; Maciel, G.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102 (9), 3249-3251.
- [166] Earl, W.L.; VanderHart, D.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102 (9), 3251-3252.
- [167] Atalla, R.H.; VanderHart, D.L., *Science*, **1984**, 223 (4633), 283-285.
- [168] Sugiyama, J.; Vuong, R.; Chanzy, H., *Macromolecules*, **1991**, 24 (14), 4168-4175.
- [169] Newman, R.H., *Solid State Nucl. Mag.*, **1999**, 15 (1), 21-29.
- [170] Newman, R.H., *Holzforschung*, **1999**, 53 (4), 335-340.
- [171] Imai, T.; Sugiyama, J.; Itoh, T.; Horii, F., *J. Struct. Biol.*, **1999**, 127 (3), 248-257.
- [172] Larsson, P.T.; Westermarck, U.; Iversen, T., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 278 (2), 339-343.
- [173] Liitiaie, T.; Maunu, S.; Hortling, B.; Tamminen, T.; Pekkala, O.; Varhimo, A., *Cellulose*, **2003**, 10 (4), 307-316.
- [174] Larsson, P.T.; Hult, E.L.; Wickholm, K.; Pettersson, E.; Iversen, T., *Solid State Nucl. Mag.*, **1999**, 15 (1), 31-40.
- [175] Wickholm, K.; Larsson, P.T.; Iversen, T., *Carbohydr. Res.*, **1998**, 312 (3), 123-129.
- [176] Chanzy, H.; Dube, M.; Marchessault, R.H., *Polymer*, **1979**, 20 (8), 1037-1039.
- [177] Buckeridge, M.S.; Dos Santos, H.P.; Tine, M.A.S., *Plant Physiol. Bioch.*, **2000**, 38 (1/2), 141-156.
- [178] Reid, J.S.G.; Edwards, M.E., *Food Sci. Technol.*, **1995**, 67, 155-186.
- [179] Brink, R.A.; Cooper, D.C., *Bot. Review*, **1947**, XIII (9), 479-541.
- [180] Cardoso, S.M.; Silva, A.M.S.; Coimbra, M.A., *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337 (10), 917-924.
- [181] Joseleau, J.P.; Chambat, G.; Vignon, M.R.; Barnoud, F., *Carbohydr. Res.*, **1977**, 58 (1), 165-175.
- [182] Navarro, D.A.; Cerezo, A.S.; Stortz, C.A., *Carbohydr. Res.*, **2002**, 337 (3), 255-263.

- [183] Zawadzki-Baggio, S.F.; Sierakowski, M.R.; Correa, J.B.C.; Reicher, F., *Carbohydr. Res.*, **1992**, 233, 265-269.
- [184] Petkowicz, C.L.O.; Sierakowski, M.R.; Ganter, J.L.M.S.; Reicher, F., *Phytochemistry*, **1998**, 49 (3), 737-743.
- [185] Eriksson, I.; Andersson, R.; Westerlund, E.; Andersson, R.; Aaman, P., *Carbohydr. Res.*, **1996**, 281 (1), 161-172.
- [186] Aspinall, G.O.; Capek, P.; Carpenter, R.C.; Gowda, D.C.; Szafranek, J., *Carbohydr. Res.*, **1991**, 214 (1), 107-113.
- [187] Sajjan, S.U.; Salimath, P.V., *Carbohydr. Res.*, **1986**, 145 (2), 348-350.
- [188] Ebringerova, A.; Kramar, A., 1982, Pat. Appl. (Czech)
- [189] Ebringerova, A.; Hromadkova, Z., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **1999**, 16, 325-346.
- [190] Ebringerova, A.; Heinze, T., *Macromol. Rapid Commun.*, **2000**, 21 (9), 542-556.
- [191] Ebringerova, A.; Hromadkova, Z.; Malovikova, A.; Sasinkova, V.; Hirsch, J.; Srokova, I., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2000**, 78 (6), 1191-1199.
- [192] Ebringerova, A.; Novotna, Z.; Kacurakova, M.; Machova, E., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1996**, 62 (7), 1043-1047.
- [193] Ebringerova, A.; Srokova, I.; Talaba, P.; Kacurakova, M.; Hromadkova, Z., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1998**, 67 (9), 1523-1530.
- [194] Antal, M.; Ebringerova, A.; Hromadkova, Z., *Papier*, **1997**, 51 (5), 223-226.
- [195] Naterova, A.; Kucera, J.; Ebringerova, A., *Vyskumne Prace z Odboru Papiera a Celulozy*, **1986**, 41 (V17-V28), V23-V26, V30.
- [196] Puri, V.P.; Guha, S.R.D.; Negi, J.S., *Indian Pulp Paper*, **1974**, 29 (2-3), 3-5.
- [197] Belicova, A.; Ebringer, L.; Krajcovic, J.; Hromadkova, Z.; Ebringerova, A., *J. Microbiol. Biotechn.*, **2001**, 17 (3), 293-299.
- [198] Ebringerova, A.; Kardosova, A.; Hromadkova, Z.; Malovikova, A.; Hribalova, V., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2002**, 30 (1), 1-6.
- [199] Hashi, M.; Takeshita, T., *Agric. Biol. Chem.*, **1979**, 43 (5), 961-967.
- [200] Hashi, M.; Takeshita, T., *Agric. Biol. Chem.*, **1979**, 43 (5), 951-959.
- [201] Doctor, V.M.; Sauls, V., *Thromb. Res.*, **1983**, 30 (6), 573-578.
- [202] Fernandez, M.L.; Lin, E.C.; Trejo, A.; McNamara, D.J., *J. Nutr.*, **1994**, 124 (6), 817-824.
- [203] Fernandez, M.L.; Lin, E.C.; Trejo, A.; McNamara, D.J., *J. Nutr.*, **1992**, 122 (12), 2330-2340.
- [204] Fernandez, M.L.; Trejo, A.; McNamara, D.J., *J. Nutr.*, **1990**, 120 (11), 1283-1290.
- [205] Cutter, E.G. *Plant Anatomy: Experiment and Interpretation, Pt. 1: Cells and Tissues*. Edward Arnold ed. Series of Student Texts in Contemporary Biology. 1969.
- [206] Cutter, E.G. *Plant Anatomy: Experiment and Interpretation, Pt. 2: Organ*. Edward Arnold ed. Series of Student Texts in Contemporary Biology. 1971.
- [207] Muhlethaler, K., *Exp. Cell. Res.*, **1950**, 1, 341-350.
- [208] Moyna, P.; DiFabio, J.L., *Planta Medica*, **1978**, 34 (2), 207-210.
- [209] Mindt, L.; Saag, K.; Sanderson, G.R.; Moyna, P.; Ramos, G., *J. Sci. Food Agr.*, **1975**, 26 (7), 993-1000.
- [210] Medina-Torres, L.; Brito-De La Fuente, E.; Torrestiana-Sanchez, B.; Alonso, S., *Carbohydr. Polym.*, **2003**, 52 (2), 143-150.
- [211] Medina-Torres, L.; Brito-De La Fuente, E.; Torrestiana-Sanchez, B.; Katthain, R., *Food Hydrocolloids*, **2000**, 14 (5), 417-424.
- [212] Trachtenberg, S.; Mayer, A.M., *Phytochemistry*, **1982**, 21 (12), 2835-2843.
- [213] Trachtenberg, S.; Mayer, A.M., *Phytochemistry*, **1981**, 20 (12), 2665-2668.
- [214] McGarvie, D.; Parolis, H., *Carbohydr. Res.*, **1981**, 94 (1), 57-65.

- [215] McGarvie, D.; Parolis, H., *Carbohydr. Res.*, **1981**, 88 (2), 305-314.
- [216] McGarvie, D.; Parolis, H., *J. Chem. Soc. Perk. T. 1*, **1979** (6), 1464-1466.
- [217] McGarvie, D.; Parolis, H., *Carbohydr. Res.*, **1979**, 69 (1), 171-179.
- [218] McGarvie, D.; Parolis, H., *Carbohydr. Res.*, **1981**, 94 (1), 67-71.
- [219] Amin, E.S.; Awad, O.M.; El-Sayed, M.M., *Carbohydr. Res.*, **1970**, 15 (1), 159-161.
- [220] Srivastava, B.K.; Pande, C.S., *Planta Med.*, **1974**, 25 (1), 92-97.
- [221] Parikh, V.M.; Jones, J.K.N., *J. Polym. Sci.*, **1965**, 11, 139-148.
- [222] Parikh, V.M.; Jones, J.K.N., *Can. J. Chem.*, **1966**, 44 (13), 1531-1539.
- [223] Parikh, V.M.; Jones, J.K.N., *Can. J. Chem.*, **1966**, 44 (3), 327-333.
- [224] Churms, S.C.; Stephen, A.M.; Van der Bijl, P., *J. South African Chem. Ins.*, **1973**, 26 (2), 45-52.
- [225] Stevens, B.J.H.; Selvendran, R.R., *Carbohydr. Res.*, **1984**, 135 (1), 155-166.
- [226] Guillon, F.; Thibault, J.F., *Carbohydr. Res.*, **1989**, 190 (1), 85-96.
- [227] Guillon, F.; Thibault, J.F.; Rombouts, F.M.; Voragen, A.G.J.; Pilnik, W., *Carbohydr. Res.*, **1989**, 190 (1), 97-108.
- [228] Davis, E.A.; Derouet, C.; Herve du Penhoat, C.; Morvan, C., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 197, 205-215.
- [229] Vignon, M.R.; Garcia-Jaldon, C., *Carbohydr. Res.*, **1996**, 296, 249-260.
- [230] Forni, E.; Penci, M.; Polesello, A., *Carbohydr. Polym.*, **1994**, 23 (4), 231-234.
- [231] Catoire, L.; Goldberg, R.; Pierron, M.; Morvan, C.; Herve du Penhoat, C., *Eur. Biophys. J.*, **1998**, 27 (2), 127-136.
- [232] Golovchenko, V.V.; Ovodova, R.G.; Shashkov, A.S.; Ovodov, Y.S., *Phytochemistry*, **2002**, 60 (1), 89-97.
- [233] Herve du Penhoat, C.; Michon, V.; Goldberg, R., *Carbohydr. Res.*, **1987**, 165 (1), 31-42.
- [234] Huisman, M.M.H.; Fransen, C.T.M.; Kamerling, J.P.; Vliegthart, J.F.G.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J., *Biopolymers*, **2001**, 58 (3), 279-294.
- [235] Polle, A.Y.; Ovodova, R.G.; Shashkov, A.S.; Ovodov, Y.S., *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 49 (3), 337-344.
- [236] Pressey, R.; Himmelsbach, D.S., *Carbohydr. Res.*, **1984**, 127 (2), 356-359.
- [237] Renard, C.M.G.C.; Crepeau, M.J.; Thibault, J.F., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 275 (1), 155-165.
- [238] Renard, C.M.G.C.; Lahaye, M.; Mutter, M.; Voragen, A.G.J.; Thibault, J.F., *Carbohydr. Res.*, **1998**, 305 (2), 271-280.
- [239] Ryden, P.; Colquhoun, I.J.; Selvendran, R.R., *Carbohydr. Res.*, **1989**, 185 (2), 233-237.
- [240] Saulnier, L.; Brillouet, J.M.; Joseleau, J.P., *Carbohydr. Res.*, **1988**, 182 (1), 63-78.
- [241] Westerlund, E.; Aaman, P.; Andersson, R.; Andersson, R.E.; Rahman, S.M.M., *Carbohydr. Polym.*, **1991**, 15 (1), 67-78.
- [242] Ryden, P.; Selvendran, R.R., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 195, 257-272.
- [243] Redgwell, R.J.; Selvendran, R.R., *Carbohydr. Res.*, **1986**, 157, 183-199.
- [244] De Vries, J.A.; Voragen, A.G.; Rombouts, F.M.; Pilnik, W., *Carbohydr. Polym.*, **1981**, 1, 117-121.
- [245] Schols, H.A.; Vierhuis, E.; Bakx, E.J.; Voragen, A.G.J., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 275 (2), 343-360.
- [246] Strasser, G.R.; Wechsler, D.E.; Amado, R., *Prog. Biotechnol.*, **1996**, 14, 631-636.
- [247] Strasser, G.R.; Amado, R., *Carbohydr. Polym.*, **2000**, 44 (1), 63-70.
- [248] Albersheim, P.; McNeil, M.; Darvill, A.G.; Hahn, M.G.; Hodgson, B.; Woodward, M.D.; Sharp, J.K.; Valent, B.S.; Darvill, J.E., *Int. Symp. Wood Pulping Chem.*, **1981**, 1, 55-56.

- [249] Darvill, A.G.; McNeil, M.; Albersheim, P.; Delmer, D.P. The primary cell walls of flowering plants. Dans *Biochemistry of plants*, 1980; pp. 91-162.
- [250] Brett, C.T., *Int. Rev. Cytol.*, **2000**, 199, 161-199.
- [251] Dinand, E.; Maureaux, A.; Chanzy, H.; Vincent, I.; Vignon, M.R., 1996, Eur. Pat. Appl.
- [252] Dinand, E.; Chanzy, H.; Vignon, M.R., *Cellulose*, **1996**, 3 (3), 183-188.
- [253] Breuer, E.; Aurich, G.; Nielsen, A. *Nitrones, Nitronates and Nitroxydes*. S. Patai, Wiley & Sons ed. 1989. 315-370.
- [254] Kato, Y.; Matsuo, R.; Isogai, A., *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 51 (1), 69-75.
- [255] Vignon, M.R.; Frascini, C.; Duval, R., 2001, PCT Int. Appl.
- [256] Frascini, C.; Vignon, M.R., *Carbohydr. Res.*, **2000**, 328 (4), 585-589.
- [257] Yackel, E.C.; Kenyon, W.O., *J. Am. Chem. Soc.*, **1942**, 64, 121-127.
- [258] Maurer, K.; Drefahl, G., *Ber.*, **1942**, 75B, 1489-1491.
- [259] de Nooy, A.E.J.; Besemer, A.C.; van Bekkum, H., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 269 (1), 89-98.
- [260] Tahiri, C.; Vignon, M.R., *Cellulose*, **2000**, 7 (2), 177-188.
- [261] Isogai, A.; Kato, Y., *Cellulose*, **1998**, 5 (3), 153-164.
- [262] Isogai, A.; Usuda, M., *Mokuzai Gakkaishi*, **1992**, 38 (7), 713-716.
- [263] Isogai, A.; Usuda, M., *Mokuzai Gakkaishi*, **1992**, 38 (6), 562-569.
- [264] Takahashi, M.; Ookubo, M., *Kobunshi Ronbunshu*, **1994**, 51 (2), 107-113.
- [265] Da Silva Perez, D.; Montanari, S.; Vignon, M.R., *Biomacromolecules*, **2003**, 4 (5), 1417-1425.
- [266] Tribet, C.; Iliopoulos, I. Matériaux polymères stimulables. Dans *Biomimétisme et matériaux*; Tec&Doc Ed., 2001; pp. 377-401.
- [267] Schild, H.G., *Prog. Polym. Sci.*, **1992**, 17, 163-249.
- [268] Selvendran, R.R.; March, J.F.; Ring, S.G., *Anal. Biochem.*, **1979**, 96 (2), 282-292.
- [269] Sweet, D.P.; Shapiro, R.H.; Albersheim, P., *Carbohydr. Res.*, **1975**, 40 (2), 217-225.
- [270] Taylor, R.L.; Conrad, H.E., *Biochemistry*, **1972**, 11 (8), 1383-1388.
- [271] Jansson, P.E.; Kenne, L.; Liedgren, H.; Lindberg, B.; Lonngren, J., *Chem. Commun.*, **1976** (8), 1-20.
- [272] Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G., *Anal. Biochem.*, **1973**, 54 (2), 484-489.
- [273] Jones, J.K.N.; Stoodley, R.J., *Methods Carbohydr. Chem.*, **1965**, 5, 36-38.
- [274] Fontanille, M.; Gnanou, Y. *Chimie et Physico-chimie des polymères*. Dunod ed. 2002, Paris.
- [275] Rinaudo, M., *Papétrie*, **1968**, 90, 479-487.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures et tableaux

Chapitre I

| | |
|---|----|
| Figure I.1 : Organisation du monde végétal..... | 3 |
| Figure I. 2 : Le figuier de barbarie : a) la plante, b) les cladodes, c) les fleurs, d) le fruit,..... | 5 |
| Figure I. 3 : Cycle photosynthétique des plantes de type CAM | 6 |
| Figure I. 4 : Modèle de la paroi primaire montrant l'organisation des polysaccharides pariétaux chez les dicotylédones (modèle proposé par <i>Carpita et Gibaut</i>)..... | 11 |
| Figure I. 5 : Formule chimique de la cellulose | 18 |
| Figure I. 6 : Visualisation des liaisons hydrogène inter et intramoléculaires de la cellulose .. | 19 |
| Figure I. 7 : Relation entre les différents allomorphes de la cellulose | 21 |
| Figure I. 8 : Arrangement des chaînes de cellulose selon les différents modèles | 22 |
| Figure I. 9 : Représentation schématique de la paroi cellulaire..... | 24 |
| Figure I. 10 : La dé-estérification des pectines | 28 |
| Figure I. 11 : La dépolymérisation des pectines par β -élimination..... | 28 |
| Figure I. 12 : Le mécanisme de peeling de la cellulose | 29 |
| Tableau I. 1 : Composition de la figue de barbarie | 8 |
| Tableau I. 2 : Comparaison de la composition des cladodes avec d'autres aliments | 9 |
| Tableau I. 3 : Degré de polymérisation de la cellulose de différentes sources | 19 |
| Tableau I. 4 : Paramètres de la maille cristalline des différents allomorphes de la cellulose . | 21 |

Chapitre II

| | |
|---|----|
| Figure II. 1 : (a) : pulpe du fruit du figuier de barbarie parsemée de plusieurs graines, (b) : graines isolées du fruit du figuier de barbarie | 32 |
| Figure II. 2 : Coupe transversale de la graine de la figue de barbarie (M. Optique)..... | 33 |
| Figure II. 3 : Endosperme de la graine de la figue de barbarie (MEB) | 34 |
| Figure II. 4 : Fibres de sclérenchyme fusiformes (spindle) (a), organisées en strates hélicoïdales de cellulose (b) (MEB) (c) faces externes des hélices (MET) | 35 |
| Figure II. 5 : Vue transversale (a) et longitudinale (b) des vaisseaux conducteurs spiralés en simple hélice (MEB)..... | 35 |
| Figure II. 6 : Schéma d'extraction des polysaccharides du péricarpe de la graine de la figue de barbarie | 38 |
| Figure II. 7 : Exemple de traitement des extraits au cours des différentes extractions (extrait I) | 39 |
| Figure II. 8 : Spectre RMN du proton de la fraction F _{SOL-II} (D ₂ O à 323 K, 400MHz) | 44 |
| Figure II. 9 : Carte de corrélation homonucléaire 2D-COSY de la fraction F _{SOL-II} (D ₂ O, 323K, 400 MHz)..... | 45 |
| Figure II. 10 : Spectre RMN ¹³ C de la fraction F _{INS-II} (DMSO-d ₆ , 333K, 300MHz)..... | 45 |
| Figure II. 11 : Carte de corrélation hétéronucléaire 2D-HSQC de la fraction F _{SOL-II} (D ₂ O, 323K, 400 MHz)..... | 46 |
| Figure II. 12 : Diagramme de Zimm correspondant à la fraction F _{INS-II} [KC/Mw= f(q ² +10C)]. | 52 |
| Figure II. 13 : Projection sur les plans 001 et 110 d'une maille élémentaire formée par des xylanes hydratées | 54 |

| | |
|--|----|
| Figure II. 14 : Clichés de diffraction des rayons-X de la xylane (F _{INS-II}) : (a) non hydratée ; (b) hydratée | 56 |
| Figure II. 15 : Spectre CP/MAS de la Fraction F _{INS-II} : (a) : anhydre et (b) : hydratée..... | 57 |
| Figure II. 16 : Spectre CP/MAS de la xylane F _{INS-I} avant et après traitement mathématique . | 58 |
| Figure II. 17 : Péricarpe de la graine de la figue (a) non traité (MET), (b) traité (4% NaOH) (MET), (c) traité (4% NaOH) (M. Optique) ; (d) traité (6% NaOH) (M.optique) | 63 |
| Figure II. 18 : Clichés de diffraction des rayons-X des résidus après traitement par NaOH : (a) : 2%, (b) : 6%, (c) : 8%, (d) : 12%..... | 64 |
| Figure II. 19 : Schéma de purification des fibres du péricarpe en utilisant un homogénéisateur mécanique (Manton-Gaulin) | 66 |
| Figure II. 20 : Microfibres (résidu IV-G) obtenues après homogénéisation dans un homogénéisateur Manton-Gaulin (M. optique) | 67 |
| Figure II. 21 : Cliché de diffraction des rayons-X du résidu V du péricarpe..... | 68 |
| Figure II. 22 : Représentation des chaînes constituant les mailles cristallines des phases I _α et I _β | 70 |
| Figure II. 23 : Spectre CP/MAS de la cellulose du péricarpe | 71 |
| Figure II. 24 : Spectres RMN ¹³ C du solide des deux allomorphes I _α (de <i>Glaucozystis</i>) et I _β (de la tunicine) | 72 |
| Figure II. 25 : Déconvolution du spectre RMN du solide des fibres du péricarpe de la graine de la figue de barbarie en cinq courbes lorentziennes au niveau du C-4 | 73 |
| Figure II. 26 : Spectres de RMN du solide des résidus du schéma d'extraction de la Figure II.19 A : péricarpe dégraissé; B : Résidu I; C : Résidu II, D : Résidu IV, E: Résidu V; F : Xylane F _{INS-I} | 75 |
| Figure II. 27 : Spectre ¹³ C de l'extrait DMSO de l'endosperme de la graine..... | 79 |
| Figure II. 28 : Cliché de diffraction des rayons-X de l'amidon de l'endosperme de la graine de la figue de barbarie..... | 79 |
| Figure II. 29 : Schéma d'extraction des polysaccharides pariétaux de l'endosperme de la graine de la figue de barbarie | 81 |
| Figure II. 30 : Fractionnement chromatographique de la fraction CSF | 83 |
| Figure II. 31 : Structure proposée pour l'arabinane de la fraction WSF1..... | 90 |
| Figure II. 32 : Spectres ¹ H des fractions WSF1, CSF3, CASF1, CASF3 et HAPF | 91 |
| Figure II. 33 : Spectres ¹³ C des fractions WSF1, CSF3, CASF1, CASF3 et HAPF..... | 92 |
| Figure II. 34 : Structure proposée pour l'arabinane de la chaîne latérale de la fraction CSF3 | 94 |
| Figure II. 35 : Structure proposée pour l'arabinane de la chaîne latérale de la fraction CASF3 | 97 |
| Tableau II. 1 : Récapitulatif du poids, siccité et pourcentage en graines des fruits | 31 |
| Tableau II. 2 : Composition chimique des graines du figuier de barbarie | 32 |
| Tableau II. 3 : Composition en oses neutres et acides de la graine de la figue de barbarie entière et de son péricarpe..... | 36 |
| Tableau II. 4 : Rendement et composition en oses neutres des différentes fractions isolées et des résidus du péricarpe des graines du fruit de la figue de barbarie..... | 40 |
| Tableau II. 5 : Composition en sucres neutres et acides des différentes fractions xyloxygénées purifiées..... | 41 |
| Tableau II. 6 : Rapports molaires xylose/acide 4-O-methyl-glucuronique des différentes fractions déterminés par RMN du ¹ H..... | 47 |
| Tableau II. 7 : Les déplacements chimiques des résidus glycosidiques des différentes fractions solubles (D ₂ O) | 48 |

| | |
|---|----|
| Tableau II. 8 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques des différentes fractions insolubles (DMSO- <i>d</i> ₆)..... | 49 |
| Tableau II. 9 : Masses molaires M_w et Degrés de Polymérisation moyens DP des différentes xylanes isolées | 53 |
| Tableau II. 10 : Rapport molaire (Xyl/4-O-Me-GlcA) de quelques 4-O-méthylglucuronoxylanes de différentes sources végétales..... | 60 |
| Tableau II. 11 : Composition en sucre neutres des résidus d'extractions..... | 62 |
| Tableau II. 12 : Composition en sucres neutres des principaux résidus obtenus au cours du schéma de purification utilisant l'homogénéisateur Manton-Gaulin | 67 |
| Tableau II. 13 : Composition en oses neutres et acides de la graine de la figue de barbarie entière et de son endosperme | 78 |
| Tableau II. 14 : Rendements et composition en sucres neutres et acides des différents extraits de l'endosperme de la graine du figuier de barbarie | 82 |
| Tableau II. 15 : Rendement du fractionnement des fractions WSF ⁺ , CSF ⁺ et CASF ⁺ | 83 |
| Tableau II. 16 : Compositions en sucres neutres et acides des différentes fractions purifiées avant et après réduction | 85 |
| Tableau II. 17 : Acétates d'alditols partiellement méthylés des différentes fractions natives ou réduites | 86 |
| Tableau II. 18 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction WSF1 | 90 |
| Tableau II. 19 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction CSF3 | 94 |
| Tableau II. 20 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction CASF1 ... | 95 |
| Tableau II. 21 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction CASF3 ... | 97 |
| Tableau II. 22 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction HAPF..... | 98 |

Chapitre III

| | |
|--|-----|
| Figure III. 1 : Fruit du figuier de barbarie (a) et fruit épluché (b)..... | 102 |
| Figure III. 2 : Coupe transversale de la pelure du fruit du figuier de barbarie : Vue de l'ensemble (MEB)..... | 104 |
| Figure III. 3 : Coupe transversale de la pelure du fruit du figuier de barbarie : S : stomate, E : épiderme, C : cellules de collenchyme, P : cellules de parenchyme (MEB)..... | 104 |
| Figure III. 4 : (a) : vue de surface d'un stomate ; (b) : coupe transversale d'un stomate : (b-1) : Ostiole, (b-2) : chambre sous-stomatique (MEB)..... | 105 |
| Figure III. 5 : Photographie au niveau d'une aréole où on distingue (a) : les glochides et (b) : les aiguillons (MEB)..... | 105 |
| Figure III. 6 : Coupe transversale d'une cellule de collenchyme (MEB)..... | 106 |
| Figure III. 7 : Cellules de : (a) parenchyme de réserve, (b) parenchyme aquifère (MEB).... | 107 |
| Figure III. 8 : Schéma d'extraction du mucilage de la pelure du fruit du figuier de barbarie | 108 |
| Figure III. 9 : Schéma d'extraction des pectines de la pelure du fruit du figuier de barbarie | 110 |
| Figure III. 10 : Schéma d'extraction des hémicellulose de la pelure du fruit du figuier de barbarie..... | 111 |
| Figure III. 11 : Etape de blanchiment du résidu final de la pelure du fruit du figuier de barbarie..... | 111 |
| Figure III. 12 : Spectres d'adsorption infrarouge des résidus après différentes étapes d'extraction..... | 113 |

| | |
|--|-----|
| Figure III. 13 : Schéma de fractionnement du mucilage de la pelure du figuier de barbarie | 119 |
| Figure III. 14 : Profil chromatographique (HPSEC) obtenu pour la fraction MP1 | 120 |
| Figure III. 15 : Spectre RMN ¹³ C de la fraction MP1 | 124 |
| Figure III. 16 : Structure proposée de l'arabinogalactane du mucilage de la pelure de la figue de barbarie | 125 |
| Figure III. 17 : Schéma de fractionnement de la fraction WSP | 128 |
| Figure III. 18 : Profil chromatographique de la fraction CSP3* | 130 |
| Figure III. 19 : Structure proposée pour la fraction WSP3 | 137 |
| Figure III. 20 : Spectres ¹ H des fractions WSP3, CSP3, ASP1, ASP2 et ASP2 | 138 |
| Figure III. 21 : Spectres ¹³ C des fractions WSP3, CSP3, ASP1, ASP2 et ASP2 | 139 |
| Figure III. 22 : Structure proposée pour la fraction CSP3 | 141 |
| Figure III. 23 : Carte de corrélation homonucléaire (¹ H/ ¹ H) 2D-COSY de la fraction WSP3 | 142 |
| Figure III. 24 : Carte de corrélation hétéronucléaire ¹³ C/ ¹ H (HMQC) de la fraction CSP3 | 142 |
| Figure III. 25 : Structure proposée pour la fraction ASP2 | 144 |
| Figure III. 26 : Carte de corrélation hétéronucléaire ¹³ C/ ¹ H (HSQC) de la fraction ASP2 | 145 |
| Figure III. 27 : Structure proposée pour la fraction ASP3 | 146 |
| Figure III. 28 : Carte de corrélation hétéronucléaire ¹³ C/ ¹ H (HMBC avec filtre ¹ J) de la fraction ASP3 | 147 |
| Figure III. 29 : Schéma de fractionnement de l'extrait alcalin (SSP) | 151 |
| Figure III. 30 : Spectre ¹³ C de la fraction SSP3* (D ₂ O à 333K, 300 MHz) | 152 |
| Figure III. 31 : Spectre ¹³ C de la fraction SSP1 (D ₂ O à 333K, 300 MHz) | 154 |
| Figure III. 32 : Spectre ¹ H de la fraction SSP1 (D ₂ O à 333K, 300 MHz) | 155 |
| Figure III. 33 : Coupe transversale de la pelure (MEB) | 157 |
| Figure III. 34 : Cellule de parenchyme individualisée après purification (M. optique) | 158 |
| Figure III. 35 : Surface de la paroi cellulaire (MET) | 158 |
| Figure III. 36 : Microfibrilles de cellulose individualisées à l'issue du traitement mécanique au Maton-Gaulin | 159 |
| Figure III. 37: Microfibrilles de cellulose individualisées colorées à l'acétate d'uranyle | 160 |
| Figure III. 38 : Photographie d'une suspension (≈0.3 %) de microfibrilles de cellulose | 161 |
| Figure III. 39 : Clichés de diffraction des rayons-X (a) microfibrilles de cellulose de la pelure (b) cellulose de tunicine | 162 |
| Figure III. 40 : Spectre CP/MAS de la cellulose de la pelure du figuier de barbarie | 163 |
| Tableau III. 1 : Récapitulatif du poids, siccité et pourcentages en pelure des fruits | 102 |
| Tableau III. 2 : Composition moyenne et sucres constitutifs de la pelure du fruit de la figue de barbarie | 103 |
| Tableau III. 3 : Attribution des principales bandes observées sur les spectres IR pour les polysaccharides | 112 |
| Tableau III. 4 : Composition en sucres neutre et acides uroniques des résidus après les différentes étapes d'extraction | 114 |
| Tableau III. 5 : Rendement des différentes fractions extraites | 115 |
| Tableau III. 6 : Composition en sucres neutres et acides des différents extraits de la pelure du fruit du figuier de barbarie | 116 |
| Tableau III. 7 : Fractionnement chromatographique du mucilage | 119 |
| Tableau III. 8 : Sucres neutres et acides du mucilage brut et la fraction majoritaire MP1 | 121 |
| Tableau III. 9 : Sucres neutres et acides du mucilage brut et la fraction majoritaire MP1 | 122 |
| Tableau III. 10 : Déplacements chimiques et attributions des signaux RMN ¹³ C des différents résidus de la fraction MP1 | 123 |

| | |
|---|-----|
| Tableau III. 11 : Rendement du fractionnement des fractions WSP, CSP et ASP | 129 |
| Tableau III. 12 : Dosage des oses acides et des oses neutres des différentes fractions pectiques avant et après réduction..... | 131 |
| Tableau III. 13 : Acétates d'alditols partiellement méthylés des différentes fractions natives ou réduites | 133 |
| Tableau III. 14 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction WSP3.. | 140 |
| Tableau III. 15 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction CSP3... | 141 |
| Tableau III. 16 : Déplacements chimiques des résidus glycosidiques de la fraction ASP1 .. | 143 |
| Tableau III. 17 : Déplacement chimiques des résidus glycosidiques de la fraction ASP2 | 144 |
| Tableau III. 18 : Déplacement chimiques des résidus glycosidiques de la fraction ASP3 | 147 |
| Tableau III. 19 : Rendement du fractionnement chromatographique de la fraction SSP..... | 151 |
| Tableau III. 20: Composition en sucres de la fraction hémicellulosique SSP1..... | 152 |
| Tableau III. 21: Déplacements chimiques des différents résidus glycosidiques de la fraction SSP1..... | 155 |

Chapitre IV

| | |
|---|-----|
| Figure IV. 1 : Structure primaire d'un radical nitroxyde | 167 |
| Figure IV. 2 : Formes mésomères limites d'un radical nitroxyde | 167 |
| Figure IV. 3 : Oxydoréduction du radical nitroxyde | 167 |
| Figure IV. 4 : Cycle catalytique de l'oxydation des alcools primaires par le système | 169 |
| Figure IV. 5 : Oxydation des alcools en C-2 et C-3..... | 170 |
| Figure IV. 6 : Oxydation des alcools primaires en C-6 | 170 |
| Figure IV. 7 : Clichés de diffraction des rayons-X de la cellulose : | 173 |
| Figure IV. 8 : Spectres CP/MAS de microfibrilles de cellulose de parenchyme : A-traitées à l'ammoniac, B- natives | 174 |
| Figure IV. 9 : Avancement de la réaction avec le temps : A- allomorphe I, B- allomorphe III | 176 |
| Figure IV. 10 : Représentation schématique d'un cristal de cellulose : A)- allomorphe I, B)- allomorphe III (réalisé par K. Mazeau)..... | 177 |
| Figure IV. 11 : Dégradation au cours de l'oxydation par le système TEMPO-NaOCl-NaBr | 182 |
| Figure IV. 12 : Spectres RMN ¹³ C des produits de réactions : A-0.01 éq. TEMPO, B-0.05 éq. TEMPO, C-0.1 éq. TEMPO | 183 |
| Figure IV. 13 : Structure chimique du PNIPAM..... | 186 |
| Figure IV. 14 : Couplage peptidique à l'aide d'un carbodiimide..... | 187 |
| Figure IV. 15 : Réarrangement de l'O-acylurée | 188 |
| Figure IV. 16 : Activation de l'O-acylurée par le NHS | 188 |
| Figure IV. 17 : Exemples d'agents de couplage peptidique..... | 188 |
| Figure IV. 18 : Représentation schématique d'un système thermoassociatif | 189 |
| Figure IV. 19 : Synthèse de l'amino-oligoNIPAM..... | 190 |
| Figure IV. 20 : Spectres RMN ¹³ C : (A) monomère NIPAM, (B) NH ₂ -oligoNIPAM, (C) ¹³ C-DEPT NH ₂ -oligoNIPAM (D ₂ O à 298K, 300 MHz)..... | 191 |
| Figure IV. 21 : Spectres RMN proton de NH ₂ -oligoNIPAM..... | 192 |
| Figure IV. 22 : Spectre de masse (MALDI-TOFF) du NH ₂ -oligoNIPAM..... | 193 |
| Figure IV. 23 : Spectres RMN ¹³ C : A : NH ₂ -oligoNIPAM, B : acide polyglucuronique, C : acide polyglucuronique couplé avec l'oligoNIPAM | 196 |
| Figure IV. 24 : Spectres RMN ¹ H des produits de couplage à différentes concentrations.... | 198 |

| | |
|--|-----|
| Tableau IV. 1 : Les rendements massiques obtenus pour les deux allomorphes I et III de cellulose..... | 176 |
| Tableau IV. 2 : Effet de la température..... | 179 |
| Tableau IV. 3 : Rendements et degrés de polymérisation en fonction de la quantité de NaBr | 180 |
| Tableau IV. 4 : Rendements et degrés de polymérisation en fonction de la quantité du radical TEMPO..... | 181 |
| Tableau IV. 5 : Influence de la durée de réaction..... | 184 |
| Tableau IV. 6 : Quelques exemples de polymère thermostimulables..... | 186 |
| Tableau IV. 7 : Récapitulatif des conditions et résultats de la synthèse des oligoNIPAM ... | 190 |
| Tableau IV. 8 : Déplacements chimiques et attributions de différents résidus de NH ₂ -oligoNIPAM | 193 |
| Tableau IV. 9 : Degré de substitution en fonction des concentrations en acide polyglucuronique | 198 |

Chapitre V

| | |
|---|-----|
| Figure V. 1 : Homogénéisateur de type Manton-Gaulin..... | 216 |
| Figure V. 2 : Principe élémentaire de l'expérience de diffusion..... | 218 |

Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie. Les polysaccharides pariétaux: caractérisation et modification chimique

Dans un contexte général de valorisation alimentaire et non alimentaire du figuier de barbarie, nous nous sommes intéressés lors de cette étude à l'analyse morphologique de la pelure et des graines du fruit. Les polysaccharides pariétaux des différentes parois ont été isolés, purifiés, et leurs caractérisations ont été réalisées grâce aux méthodes chimiques ainsi qu'à la RMN haute résolution (^1H et ^{13}C) et en phase solide (CP/MAS). L'autre aspect du travail décrit la modification chimique des microfibrilles de cellulose. Il traite, dans un premier temps, de l'oxydation de la cellulose par le système TEMPO-NaOCl-NaBr et les conditions opératoires ont été optimisées dans le but de préparer des échantillons d'acide polyglucuroniques. La seconde étape met l'accent sur le greffage, via un couplage peptidique, du poly-N-isopropylacrylamide en vue d'élaborer des biopolymères thermostimulables à partir de la cellulose oxydée.

Contribution to the morphological, ultrastructural and chemical study of the prickly pear. The cell wall polysaccharides: characterization and chemical modification

In a general context of food and non food valorization of the prickly pear, we were interested in the morphological analysis of the peel and the seeds of the fruit. The cell wall polysaccharides of the different tissues were isolated, purified, and their characterization was achieved by chemical methods as well as high resolution ^1H and ^{13}C NMR and CP/MAS. The other aspects of the work describe the chemical modification of the cellulose microfibrills. First of all, the oxidization of cellulose samples by the TEMPO-NaOCl-NaBr system were studied and the different parameters conditions were optimized in order to prepare polyglucuronic acid samples. Secondly, we studied the coupling, via peptide linkages, with poly(N-isopropylacrylamide) in order to synthesize thermosensitive biopolymers starting from oxidized cellulose samples.

Mots clés

Opuntia ficus-indica, Figue de barbarie, Pelure, Graine, Polysaccharides pariétaux, pectines, Hémicelluloses, Cellulose, ^1H et ^{13}C RMN, Modification chimique, Oxydation, acide polyglucuronique, couplage peptidique, poly(N-isopropylacrylamide).

Keywords

Opuntia ficus-indica, Prickly pear, Peel, seed, Cell wall Polysaccharides, pectins, Hemicelluloses, Cellulose, ^1H and ^{13}C NMR, Chemical modification, Oxidation, polyglucuronic acid, peptide coupling, poly(N-isopropylacrylamide).
