



HAL
open science

Hydrolyses et Synthèse chimio-enzymatiques appliquées à la préparation de xyloglucooligosaccharides pour l'étude des interactions xyloglucanes-cellulose

Marie Lopez

► **To cite this version:**

Marie Lopez. Hydrolyses et Synthèse chimio-enzymatiques appliquées à la préparation de xyloglucooligosaccharides pour l'étude des interactions xyloglucanes-cellulose. Chimie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00420010

HAL Id: tel-00420010

<https://theses.hal.science/tel-00420010v1>

Submitted on 27 Sep 2009

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.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1



THÈSE

Présentée par **Marie LOPEZ**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

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

Spécialité : **CHIMIE - BIOLOGIE**

**HYDROLYSES ET SYNTHÈSES CHIMIO-ENZYMATIQUES APPLIQUÉES À LA
PRÉPARATION DE XYLOGLUCO-OLIGOSACCHARIDES POUR L'ÉTUDE DES
INTERACTIONS XYLOGLUCANES-CELLULOSE**

Soutenue publiquement le 14 décembre 2007

JURY

Dr. Christophe MORIN (Président)
Pr. Patrick ROLLIN (Rapporteur)
Pr. Patrice LEROUGE (Rapporteur)
Dr. Herman HÖFTE (Examineur)
Dr. Alain BULÉON (Invité)
Dr. Gérard CHAMBAT (Invité)
M. Hervé BIZOT (Co-directeur)
Dr. Hugues DRIGUEZ (Directeur)



*Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) – CNRS ; Grenoble
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) ; Nantes*

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1



THÈSE

Présentée par **Marie LOPEZ**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

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

Spécialité : **CHIMIE - BIOLOGIE**

**HYDROLYSES ET SYNTHÈSES CHIMIO-ENZYMATIQUES APPLIQUÉES À LA
PRÉPARATION DE XYLOGLUCO-OLIGOSACCHARIDES POUR L'ÉTUDE DES
INTERACTIONS XYLOGLUCANES-CELLULOSE**

Soutenue publiquement le 14 décembre 2007

JURY

Dr. Christophe MORIN (Président)
Pr. Patrick ROLLIN (Rapporteur)
Pr. Patrice LEROUGE (Rapporteur)
Dr. Herman HÖFTE (Examineur)
Dr. Alain BULÉON (Invité)
Dr. Gérard CHAMBAT (Invité)
M. Hervé BIZOT (Co-directeur)
Dr. Hugues DRIGUEZ (Directeur)



*Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) – CNRS ; Grenoble
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) ; Nantes*

A mes parents,

A ma sœur,

A mon frère,

A Loïc,

" La science a-t-elle promis le bonheur ? Je ne le crois pas. Elle a promis la vérité, et la question est de savoir si l'on fera jamais du bonheur avec de la vérité."

Emile Zola

Me voilà arrivée au terme de mes trois années et quelques mois de thèse, période importante de ma vie. Je n'aurai en aucun cas pu accomplir ce travail sans la collaboration et l'aide de nombreuses personnes et comme nous n'avons que trop peu l'occasion de remercier ceux qui comptent pour nous, je profite de ces quelques lignes pour le faire, en m'excusant, par avance, de mes éventuels trous de mémoire.

Ma thèse s'est inscrite dans le cadre du groupement de recherche sur les Assemblages de Molécules Végétales et s'est déroulée au CERMAV et au sein de l'unité BIA de l'INRA et à ce titre je remercie Serge Perez, Redouane Borsali et Jacques Guéguen de m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

J'adresse toute ma reconnaissance à Christophe Morin, Patrice Lerouge et Patrick Rollin d'avoir accepté de juger mon travail, ainsi qu'à Herman Höfte pour sa participation à mon jury de thèse et son accompagnement au cours de ces trois ans, par l'intermédiaire de mon comité de thèse. De même, je remercie Vladimir Farkas qui a suivi régulièrement mon travail.

"Lors du choix de ta thèse, prends en compte la qualité de tes responsables" m'avait-on dit. A l'époque, étant bien incapable d'évaluer la "qualité" des uns et des autres dans le monde de la science, je n'avais pas tenu compte de cette remarque mais à présent je comprends aisément son importance et je remercie le hasard de faire si bien les choses. En effet, ce fut pour moi un honneur de travailler avec Hugues Driguez. L'immensité de votre savoir, votre capacité à nous laisser libres tout en étant présent autant que nécessaire, font de vous un directeur de thèse hors pair. Je vous remercie très sincèrement pour cela et pour toutes les connaissances en chimie des sucres que vous m'avez transmises (je ne parlerai pas ici de l'effet anomère ...).

J'adresse un grand merci à Alain Buléon. Malgré tes nombreuses activités et ton emploi du temps très chargé tu as toujours su prendre le temps de m'écouter et de me conseiller en particulier lors de mon séjour à Nantes. Un peu réticente au début pour déménager à l'autre bout de la France, tu as fait de cette période un très beau moment de ma thèse, tant sur le plan scientifique que culturel (qui mieux que toi peut faire visiter et aimer le Golf du Morbihan ...)

Je souhaite également remercier Hervé Bizot, mais que dire de ce personnage ... Pour être franche c'est avec un peu d'appréhension que j'ai rejoint le bureau voisin du tien (quel musée au passage ...) et puis j'ai, très rapidement, pu apprécier ton immense disponibilité et ton réel engagement à mes côtés pour m'aider dans ce projet. Je n'aurai pas pu réaliser tout cela sans toi. Je ne connais que peu de personne qui, comme toi, ont une réelle considération pour les petits étudiants que nous

sommes. Nos discussions, parfois animées mais toujours constructives, tes « bizoteries » et nos petits ateliers bricolage de fin de soirée resteront pour moi inoubliables.

Merci à Gérard Chambat, pour m'avoir transmis, avec patience, des connaissances en chimie de la paroi végétale. Votre gentillesse et votre disponibilité ont permis, à la chimiste que je suis, d'étendre mes compétences à des domaines qui m'étaient jusqu'ici inconnus.

Qu'il s'agissent du domaine scientifique ou bien de la vie de tous les jours, ces trois ans ont été ponctués de rencontres et de collaborations enrichissantes.

Je tiens à remercier Martine B. (et ces messages indescriptibles ...), Martine M. et Magali (mes compagnes de la salle de sport) et Josiane (en souvenir de certaines discussions matinales) pour leur investissement dans le bon fonctionnement du laboratoire. Pour le soutien technique et scientifique j'adresse de profonds remerciements à Patrick et Claudius, dont la capacité d'écoute a fait l'unanimité ; Michel Trierweiler et Isabelle Jeacomine, pour leur aide précieuse en RMN ; Claude Bosso et Stéphanie Boullanger, que j'ai très souvent mis à contribution pour les analyses en spectrométrie de masse avec parfois des produits peu coopératifs... ; Alain Heyraud et Philippe Colin-Morel, pour le temps qu'ils ont consacré à caractériser mes échantillons tout en m'expliquant le principe des méthodes utilisées ; Anne Imberty et Catherine Gaultier, pour m'avoir permis d'effectuer des analyses en ITC ; Jean-Luc Puteaux et Henri Chanzy, qui m'ont éclairée sur certains mystères de la cellulose ainsi qu'à Jean-Pierre Utille, pour ces précieux conseils, sa capacité d'écoute et sa grande disponibilité. Un grand merci particulier à Marie-France Marais qui n'a pas hésité à s'impliquer dans ce projet avec enthousiasme, persévérance (il faut avouer que parfois mes petits XGs étaient un peu récalcitrants) et sagesse scientifique, notre collaboration et ta bonne humeur débordante resteront pour moi un excellent souvenir.

Je voudrais également remercier le « clan nantais », Jane Parienty et Christine Reminiac (grâce à qui la pêche à pied n'a presque plus de secret pour moi...) pour leur aide quotidienne ; Corinne Rondeau-Mouro, qui m'a permis de réaliser les spectres RMN du solide ; Marie-Christine Ralet (partenaire de danse), Marie-Jeanne Crépeau et Agata Zykwinska pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée notamment en dosage d'oses totaux (et le domptage de pics rebelles ...) ; ainsi que Paul Robert, pour les analyses IR parfois effectuées sur des composés suspects ... et pour toutes nos discussions scientifiques et autre. Enfin, je suis intimement convaincue que mon projet n'aurait pas été le même et que mon séjour à Nantes n'aurait pas été si enrichissant sans Joëlle Davy, je tiens à te remercier du fond du cœur pour tout le travail que tu as réalisé, j'ai pu apprécier ta rigueur scientifique, ton implication et ton honnêteté qui font de toi quelqu'un de rare. Nous avons partagé le même bureau,

le même labo et parfois (souvent !) les mêmes tablettes de chocolat ... et je suis extrêmement ravie d'avoir travaillé à tes côtés.

Merci aux personnes que j'ai pu côtoyer au quotidien à Nantes comme à Grenoble, Sylvie Armand, Sylvain Cottaz, Sami Halila, Sébastien Fort, Patricia Chaud, Catherine Harb, Patrice Papineau et Alain Sire.

Je remercie l'ensemble des gens de passage et doctorants du CERMAV, anciens et actuels, qui forme une grande famille et en particulier Régis, qui m'a initié aux XGs (tu aurais quand même pu me dire que c'était la galère... !); Marie-Pierre, compatriote du sud-ouest et appréciant, comme moi, la danse; Sophie, ancienne ESPienne et acharnée du travail (tu es partie vers de nouveaux horizons, qui je l'espère t'apporteront satisfaction); Aurélie, compagne de voyage à Rome; Nicole, pour tous les bons moments que nous avons partagé à Rome mais aussi lors de nos escapades (professionnelles bien entendu !) pour le GDR à Bordeaux, Lille, Nantes (rappelle toi la barbe à papa...) et autres destinations de rêves ...; Sébastien (aller l'OL !), partenaire de labo, devenu ami, qui aura essayé, en vain, de me faire saisir les subtilités de l'accent grenoblois ...; Laurence (surnommée Z..., non promis je ne divulguerai pas l'information !), grâce à qui la bonne humeur a régné en maître au labo 319; Carole (véritable cordon bleu et il le faut pour ton estomac toujours « concave »), que je n'ai côtoyé qu'un peu plus d'un an mais il ne faut pas bien longtemps pour apprécier ta générosité et ta gentillesse qui font de toi quelqu'un de cher. Mais qu'aurait été cette expérience sans les deux personnes qui ont été pour moi de véritables soutiens : Émilie, qui m'a initié aux bonnes pratiques du laboratoire et grâce à qui j'ai pu acquérir de nombreuses connaissances en chimie des sucres et Lemonia, qui, avec un cœur gros comme ça ..., a partagé mes trois années de thèse, les bons et les mauvais moments, je me souviendrai toujours de certains de nos fous rires et de ton sourire rayonnant. Il est certain que votre complicité me manquera à l'avenir, à toutes les deux un immense merci.

Je voudrais enfin remercier toute ma famille, et mes parents en particulier qui ont fait de moi ce que je suis devenue aujourd'hui, merci de votre soutien, il a été parfois scientifique et souvent moral, mais dans tous les cas essentiel. Merci à mon petit frère, Jean, et à ma petite sœur, Anne, car vous m'avez aidé, peut-être inconsciemment, à me construire; nous avons tous les trois des personnalités très différentes et nous avons choisi des avenir qui ne le sont pas moins, sachez que je suis très fière d'être votre grande sœur à tous les deux. Sur le point de clore mes remerciements, mes pensées vont à Loïc, tu fais partie de ma vie depuis bientôt dix ans et tu as toujours été à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments. La route que nous avons suivie jusqu'à présent nous conduit

aujourd'hui à l'autre bout du monde (au sens propre ...) et je te suis infiniment reconnaissante de m'accompagner dans cette nouvelle (mais pas dernière ...) aventure. Merci pour tout.

Comme dirait mon père : « il y a un temps pour tout » alors voilà c'est fini. C'est enrichie de toutes ces rencontres que je vais me tourner vers d'autres expériences en gardant, grâce à vous tous, un excellent souvenir de ma thèse. A tous, une dernière fois et du fond du cœur : MERCI !

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
Chapitre 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Paroi des cellules végétales.....	5
1.1. Architecture de la paroi des cellules végétales	5
1.2. Composition de la paroi végétale.....	6
1.2.1. Les polysaccharides	6
1.2.2. Les protéines structurales.....	10
1.2.3. Les composés phénoliques	10
2. La paroi primaire des cellules végétales.....	13
2.1. Généralités	13
2.2. Composition et biosynthèse	14
2.2.1. La cellulose	14
<i>Description.....</i>	<i>14</i>
<i>Biosynthèse de la cellulose chez les bactéries.....</i>	<i>15</i>
<i>Biosynthèse de la cellulose chez les plantes.....</i>	<i>17</i>
2.2.2. Les xyloglucanes (XGs).....	20
<i>Généralités</i>	<i>20</i>
<i>Composition</i>	<i>20</i>
<i>Biosynthèse des XGs.....</i>	<i>22</i>
<i>Rôle et métabolisme des XGs dans la paroi</i>	<i>24</i>
2.3. Organisation de la paroi primaire	27
2.3.1. Évolution du modèle de la paroi primaire des cellules végétales.....	27
2.3.2. Le réseau pectique.....	29
2.3.3. Le réseau XGs-cellulose	30
3. Études <i>in vivo</i>, <i>in vitro</i>, <i>in silico</i> des interactions XGs-cellulose : trois approches complémentaires	32
3.1. Les approches <i>in vivo</i>	32
3.2. Quelles avancées grâce aux approches <i>in vitro</i> ?.....	34
3.2.1. Assemblages XGs-cellulose.....	35
3.2.2. Obtention de composites XGs-cellulose	37
3.3. Les études <i>in silico</i> : des informations conformationnelles et énergétiques	39
4. Les glycosynthèses : un outil précieux pour les études <i>in vitro</i>	40
4.1. Les β -D-glycoside-hydrolases natives.....	40
4.1.1. Enzymes agissant avec inversion de configuration	41
4.1.2. Enzymes agissant avec rétention de configuration.....	41
4.1.3. Topologie des sites actifs	42
4.2. Les glycosynthèses	43
4.3. Les α -fluorures de glycosyle : des donneurs pour les glycosynthèses	45
5. Conclusion et objectifs.....	45

CHAPITRE 2 : PRÉPARATION DES SUBSTRATS XYLOGLUCOSIDIQUES PAR HYDROLYSES ET SYNTHÈSES CHIMIO-ENZYMATIQUES

1. Introduction.....	49
2. Extraction et hydrolyses de XGs d'origines diverses	49
2.1. Les XGs de <i>Rubus fruticosus</i>	49
2.1.1. Les XGs de <i>Rubus</i> extra-cellulaires (XG _{REC}).....	50
2.1.2. Les XGs de <i>Rubus</i> pariétaux (XG _{RP}).....	50
2.1.3. Caractérisations des XG _{REC} et XG _{RP}	51
2.1.4. Désacétylation des XGs de <i>Rubus</i>	52
2.2. Xylogluco-oligosaccharides de taille contrôlée issus de XGs de <i>Tamarindus indica</i>	54
2.2.1. Hydrolyse enzymatique partielle de XGs de tamarin et purification par précipitation	55
2.2.2. Hydrolyse enzymatique partielle de XGs de tamarin et purification par chromatographie..	56
3. Synthèse chimio-enzymatique de XGOs	59
3.1. Molécules cibles choisies	60
3.2. Synthèse de XGOs à partir des motifs élémentaires de XGs de tamarin	61
3.2.1. Obtention des motifs élémentaires des XGs de tamarin.....	61
3.2.2. Synthèse des fluorures d' α -glycosyle.....	64
3.2.3. Tests enzymatiques	70
<i>Détermination des conditions optimales d'obtention des dérivés 19 et 21</i>	70
<i>Tests préliminaires de condensation enzymatique des composés 14 et 17a</i>	71
<i>Couplage enzymatique des composés 15 et 18 utilisant la glycosynthase Cel7B E197A</i>	72
<i>Couplage enzymatique des composés 15 et 18 utilisant la glycosynthase PttXET16A E85A</i>	73
<i>Spécificité de reconnaissance d'enzymes agissant sur les XGs</i>	74
3.2.4. Synthèse des XGOs modèles.....	77
3.3. Xylogluco-oligosaccharides présentant une zone non substituée	78
3.3.1. Introduction.....	78
3.3.2. Analyse rétrosynthétique pour l'obtention du XXXGGGGGXXXG 45.....	79
3.3.3. Obtention du LacXXXG- α F 41.....	80
3.3.4. Synthèse du fluorure de cellobiosyle protégé en position 4 ^H 34	83
3.3.5. Utilisation de la glycosynthase <i>HiCel7B E197A</i> pour l'obtention du produit 44	86
4. Les bola xylogluco-oligosaccharides : un moyen de mimer des XGOs de masse molaire plus élevée ? ...	89
4.1. Choix du bras espaceur	90
4.2. Stratégie de synthèse.....	91
4.3. Fonctionnalisation des oligo- et poly(éthylène glycol).....	92
4.4. Synthèse des bola xylogluco-oligosaccharides	94
4.4.1. Amination réductrice.....	95
4.4.2. « Click-chemistry »	97
<i>Formation de propargyl-xylogluco-oligosaccharides 57 et 58</i>	99
<i>Cycloaddition (« click-chemistry »)</i>	100
5. Bilan de la préparation des substrats xyloglucosidiques	101

5.1. Substrats disponibles pour l'étude des interactions	102
5.2. Spécificité des substrats des glycosynthases.....	103
 CHAPITRE 3 : ÉTUDE DES INTERACTIONS XYLOGLUCANES-CELLULOSE	
1. Introduction.....	107
2. Choix de techniques d'analyse	107
2.1. Intérêt de l'analyse de composites XGs-cellulose par RMN	107
2.2. Isothermes d'adsorption.....	108
2.2.1. Description	108
2.2.2. Études préliminaires	109
<i>Étude cinétique</i>	109
<i>Test d'adsorption non spécifique</i>	110
2.2.3. Modèles de Langmuir, de Freundlich et de Scatchard	110
<i>Modèle de Langmuir</i>	111
<i>Modèle de Freundlich</i>	112
<i>Modèle de Scatchard</i>	112
2.3. Titration calorimétrique isotherme (ITC)	113
2.3.1. Principe de la méthode	114
2.3.2. Exploitation des résultats	115
3. Choix et analyse des substrats.....	117
3.1. Substrats cellulosiques.....	117
3.2. Substrats xyloglucosidiques.....	120
4. Influence de la structure des substrats xyloglucosidiques sur la capacité d'interaction.....	120
4.1. Influence de la masse molaire.....	121
4.1.1. Isothermes d'adsorption de différents XGs et XGOs.....	121
4.1.2. Exploitation des données à partir des modèles d'adsorption existants.....	123
4.2. Influence du degré de substitution	128
4.2.1. XGs de structure.....	128
4.2.2. Influence des résidus galactosyle	130
4.2.3. Présence d'une zone non substituée : quelle conséquence sur la capacité d'adsorption ?..	132
4.3. Influence des groupements acétate	134
4.4. Effet de la structure des XGs : conclusion.....	135
5. Étude enthalpique des interactions.....	135
5.1. Influence de la température sur la capacité d'adsorption.....	136
5.2. Analyse par titration calorimétrique isotherme (ITC).....	137
5.2.1. Tests préliminaires	137
5.2.2. Analyse ITC : confirmation de la présence des deux phénomènes	139
5.3. Enthalpie d'interaction : identification des phénomènes observés	143
6. Étude des interactions par résonance magnétique nucléaire (RMN)	147
7. Étude des interactions XGs-cellulose : bilan.....	148

CHAPITRE 4 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Solvants, enzymes et substrats commerciaux	153
1.1. Solvants	153
1.2. Enzymes	153
1.3. Substrats cellulosique et xyloglucosidique commerciaux.....	154
2. Caractérisations physicochimiques	154
2.1. Méthodes générales	154
2.2. Chromatographies.....	155
2.3. RMN	156
<i>Appareillage et calibration</i>	156
<i>Expériences utilisées</i>	156
<i>Notations</i>	157
2.4. Dosage des oses neutres.....	157
2.5. Détermination des masses molaires moyennes par SEC.....	158
2.6. Dosage de charges des whiskers	159
3. Préparation des substrats cellulosiques et extraction des XGs naturels	161
3.1. Cellulose	161
3.1.1. Cellulose bactérienne (CB)	161
<i>Conditions de culture</i>	161
<i>Broyage en milieu humide</i>	161
<i>Plasmolyse et lyse des cellules</i>	162
<i>Traitement à la soude</i>	162
3.1.2. Cellulose bactérienne micro-cristalline (BMCC).....	162
<i>Hydrolyse de la cellulose bactérienne (CB)</i>	162
<i>Blanchiment par traitement à la potasse</i>	163
3.1.3. Whiskers.....	163
3.1.4. Whiskers désulfatés.....	164
3.2. Préparation de XGs et XGOs par extraction et/ou hydrolyse	164
3.2.1. XGs de tamarin extraits de graines.....	164
3.2.2. XGs de <i>Rubus fruticosus</i>	164
<i>Culture de cellules</i>	164
<i>XGs de Rubus pariétaux (XG_{RP})</i>	165
<i>XGs de Rubus extra-cellulaires (XG_{REC})</i>	165
<i>XGs de Rubus extra-cellulaires enrichis en ¹³C (XG_{REC13C})</i>	166
3.2.3. Désacétylation des XG _{REC}	166
3.2.4. Hydrolyse partielle de XGs	166
<i>Hydrolyse partielle et séparation par précipitation</i>	166
<i>Hydrolyse partielle et séparation par chromatographie sur gel de silice</i>	167
4. Synthèses et Caractérisations.....	168
5. Etude des interactions.....	221

5.1. Détermination des isothermes d'adsorption	221
5.2. Titration calorimétrique isotherme (ITC)	222
5.3. Biosynthèse des composites XGs-cellulose bactérienne	222
5.4. Résonance magnétique nucléaire du solide	223
CONCLUSION ET PERPECTIVES.....	227
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	235
ANNEXES.....	245

Introduction générale

L'objectif général de ce travail de thèse a été d'approfondir la connaissance de la structure du réseau xyloglucanes-cellulose au sein de la paroi primaire des cellules végétales et d'élucider les mécanismes d'interaction entre ces polysaccharides.

Pour cela, plusieurs moyens ont été mis en œuvre tant sur le plan de la synthèse de modèles xylogluco-oligosaccharidiques que sur les moyens d'analyse utilisés pour l'étude des interactions.

Ce travail pluridisciplinaire, effectué dans le cadre des projets menés sur les parois végétales au sein du Groupement De Recherche sur l'Assemblage des Molécules Végétales (GDR-AMV), a été réalisé à travers une collaboration entre deux organismes de recherche, l'INRA et le CNRS.

Ainsi, la préparation de substrats xyloglucosidiques a été effectuée au Centre de Recherche sur les MACromolécules Végétales (CERMAV). La synthèse chimio-enzymatique d'oligosaccharides, en vue d'études structure/activité en glycoscience est en effet l'une des thématiques développées au sein de l'équipe "Glycochimie et Biotechnologie des Oligosaccharides"

Par ailleurs, la capacité d'interaction des xylogluco-oligosaccharides synthétisés et de xyloglucanes naturels d'origines diverses vis-à-vis de celluloses modèles ainsi que les mécanismes sous-jacents ont été étudiés par différentes techniques telles que la titration calorimétrique isotherme (ITC), la détermination d'isothermes d'adsorption ainsi que l'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide, dans l'unité Biopolymères - Interactions - Assemblage (BIA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Nantes.

Par rapport aux études déjà menées sur ces interactions, dont les conclusions sont souvent contradictoires, une nouvelle approche faisant appel à la synthèse de xylogluco-oligosaccharides (XGOs) de structure contrôlée a été envisagée pour s'affranchir de l'hétérogénéité de la structure des xyloglucanes naturels. L'utilisation conjointe de techniques très complémentaires a été planifiée pour une étude de l'influence des différents paramètres structuraux sur les interactions et une analyse fine des mécanismes.

Ce rapport de thèse comporte quatre chapitres. Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique faisant état des connaissances générales sur la structure de la paroi des cellules végétales. Une description des différentes approches envisagées pour l'analyse des interactions est ensuite abordée.

Dans une deuxième partie, la préparation des substrats xyloglucosidiques et en particulier l'obtention d'oligosaccharides modèles par synthèse chimio-enzymatique est décrite.

Le troisième chapitre décrit l'étude des interactions. L'interprétation des résultats obtenus par différentes méthodes conduit à mettre en évidence l'influence de certains paramètres structuraux sur les interactions et à élaborer certaines hypothèses concernant les processus d'interaction impliqués dans la construction du réseau XGs-cellulose.

Ces trois chapitres sont suivis par la partie expérimentale et ce manuscrit se termine par une conclusion générale et la description de perspectives envisageables pour la poursuite de ces travaux.

Chapitre 1 :
Étude bibliographique

1. Paroi des cellules végétales

1.1. Architecture de la paroi des cellules végétales

Les cellules végétales se différencient des cellules animales par la présence, à la périphérie de l'ensemble intracellulaire, d'une enveloppe : la paroi végétale.¹ Celle-ci, a d'une part un rôle structural car elle confère à la cellule sa morphologie et permet d'en contrôler la croissance, et d'autre part un rôle dans les échanges intercellulaires, en particulier via les plasmodesmes, zones de liaisons entre différentes cellules, qui assurent la continuité du symplasme. Elle constitue également une barrière de protection contre certaines contraintes telle que la pression osmotique.

Cette paroi cellulaire est constituée de trois domaines : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (Figure 1).

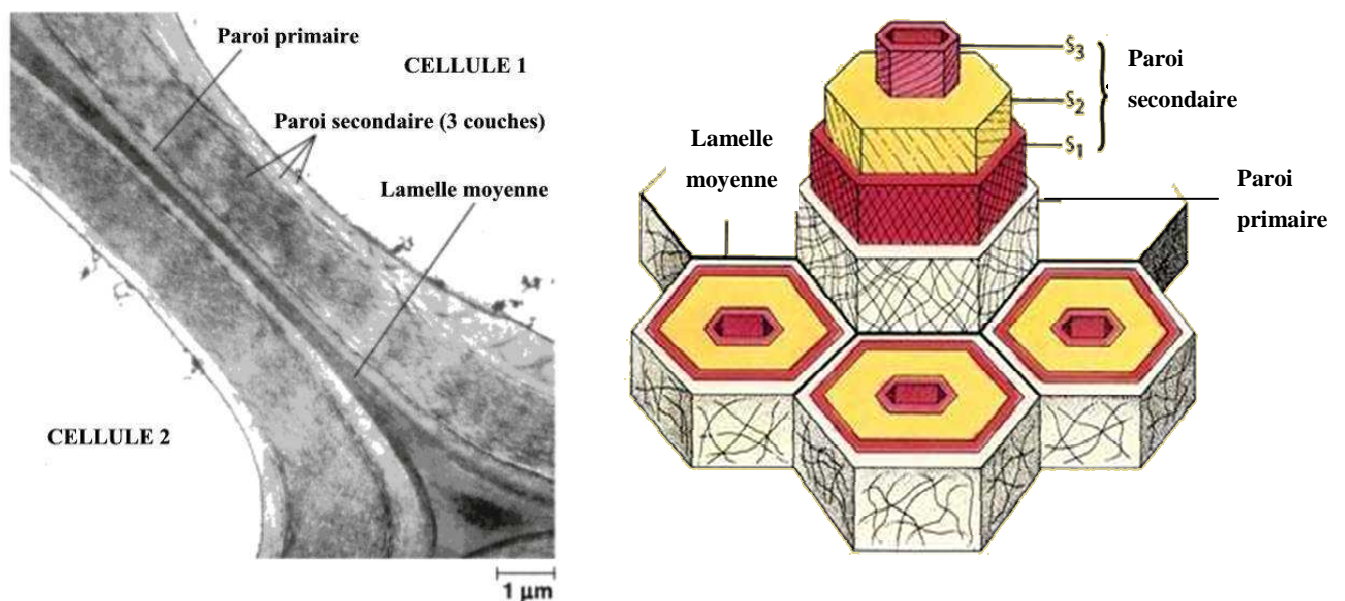


Figure 1 : Paroi des cellules végétales : (a) Coupe vue par microscopie (b) représentation schématique

- La lamelle moyenne forme une interface entre deux cellules adjacentes. Elle conditionne la cohésion intercellulaire et contient principalement des substances pectiques.

- La paroi primaire se forme durant la division cellulaire et sa surface s'accroît rapidement au cours de la croissance de la cellule. Elle est à la fois extensible et résistante. Son épaisseur est extrêmement faible relativement à l'épaisseur totale de la paroi.
- La paroi secondaire se développe postérieurement à la croissance de la cellule. Elle est constituée d'éléments communs avec la paroi primaire dans lesquels s'intercale de la lignine. Elle est plus rigide et beaucoup plus épaisse que la paroi primaire et présente un caractère inextensible qui ne permet plus la croissance cellulaire.

1.2. Composition de la paroi végétale

La paroi des plantes supérieures est composée de polysaccharides, de protéines ainsi que de composés phénoliques. Dans ce paragraphe, les constituants pariétaux seront présentés succinctement. La cellulose et les xyloglucanes, auxquels ce travail de thèse a été consacré, seront décrits de manière plus détaillée, dans la suite de ce document (§ 2.2).

1.2.1. Les polysaccharides

De nombreux polysaccharides sont présents au sein des parois des cellules végétales. En fonction de leur nature et de leur structure ils sont amenés à jouer des rôles diversifiés. Trois principales classes de polysaccharides peuvent être distinguées : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines.

La cellulose : c'est un polysaccharide linéaire constitué d'unités D-glucopyranosyle liées entre elles par des liaisons β -1,4. C'est l'élément majeur de la structure pariétale. La cellulose représente 15 à 30 % de la matière sèche de la paroi primaire et 40 à 90 % de la paroi secondaire. C'est grâce à sa structure et à son organisation qu'elle est capable d'assurer son rôle au sein de la paroi. En effet, la présence de nombreux groupements hydroxyle libres permet la création d'un réseau de liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires. De plus, elle est organisée en microfibrilles formant une structure très cristalline. Ces caractéristiques en font une structure considérablement résistante aux forces de tension et freine sa dégradation

face aux attaques physiques, chimiques ou enzymatiques. La taille des microfibrilles varie de manière significative d'une espèce à l'autre (Figure 2).

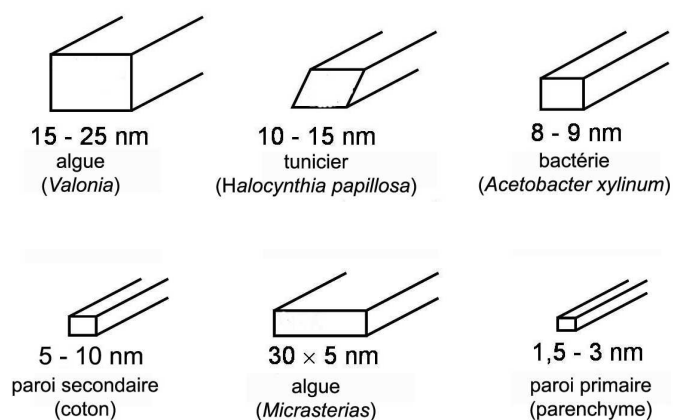


Figure 2 : Variabilité de taille des microfibrilles en fonction de l'origine de la cellulose d'après Chanzy ²

Les hémicelluloses : ce sont des polysaccharides de structures complexes et variées qui sont constitués de pentoses (D-xylose et L-arabinose), d'hexoses (D-glucose, D-galactose, L-fucose, D-mannose et L-rhamnose) et d'acides uroniques (acide D-glucuronique et 4-*O*-méthyl-D-glucuronique). Les hémicelluloses présentes dans les parois végétales sont : les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes (galacto-/glucomannanes), les glucuronomannanes, la callose et les glucanes mixtes (Figure 3). Leurs compositions varient en fonction de l'espèce et du type cellulaire considérés.

Dans la plupart des cas une hémicellulose est prédominante tandis que d'autres sont présentes en plus faibles quantités. Ainsi les xyloglucanes sont les hémicelluloses majoritaires dans les parois primaires des Dicotylédones alors que chez les Monocotylédones se sont les arabinoxylanes. De même, dans les parois secondaires, les xylanes sont prédominants chez les angiospermes et les glucomannanes chez les gymnospermes.

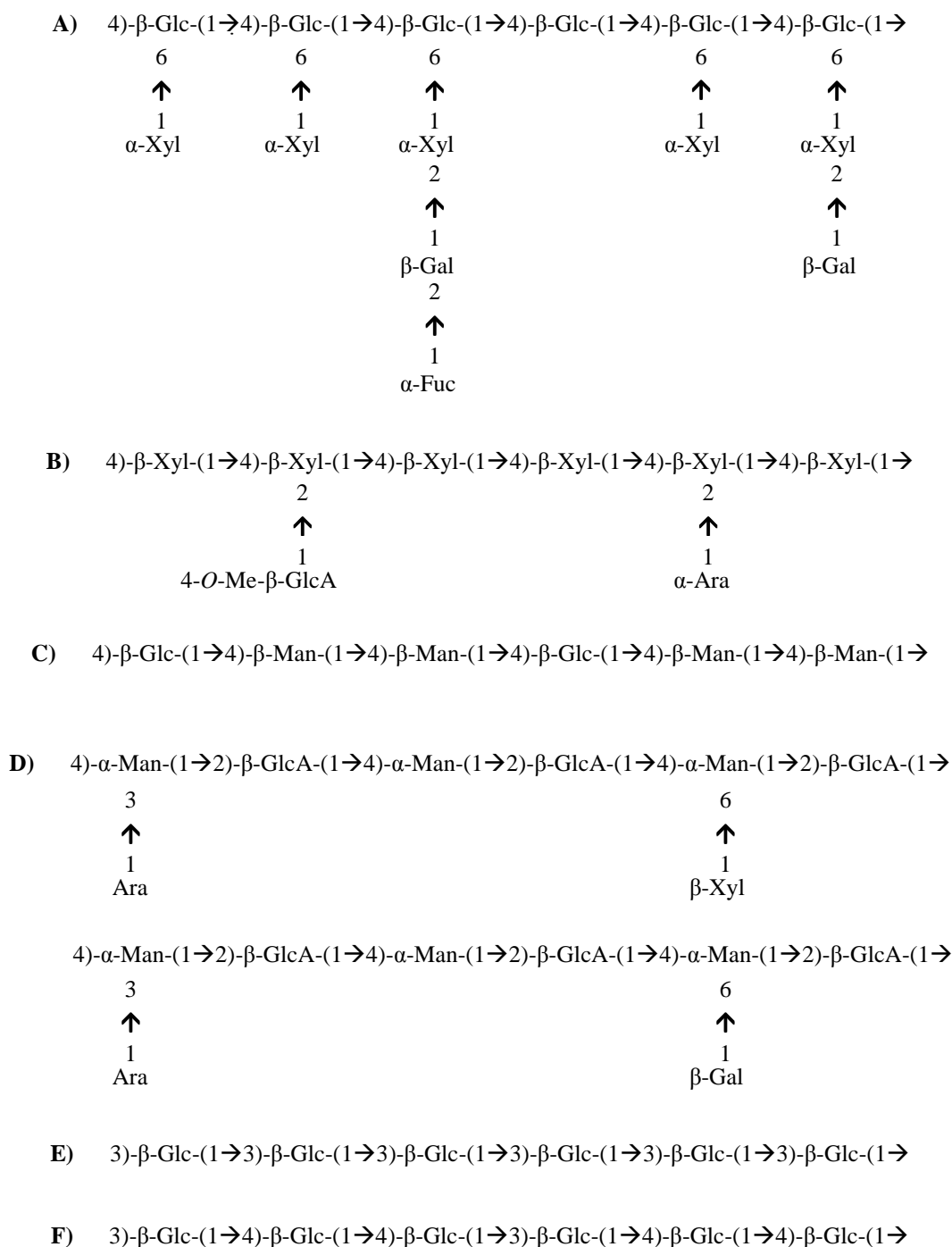


Figure 3 : Représentation schématique des hémicelluloses présentes au sein de la paroi végétale

A) xyloglucanes (XGs) ; **B)** xylanes ; **C)** glucomannanes ; **D)** glucuronomannanes ; **E)** callose ; **F)** β-glucanes mixtes

Les pectines : ce sont des polysaccharides chargés car riches en acide α-D-galacturonique. Elles sont également composées de L-rhamnose, L-arabinose et D-galactose. Les principaux constituants des pectines sont les homogalacturonanes (HGA), les

rhamnogalacturonanes de type I (RG I) et de type II (RG II). Les arabinanes, galactanes et arabinogalactanes sont présents en quantités plus faibles (Figure 4).

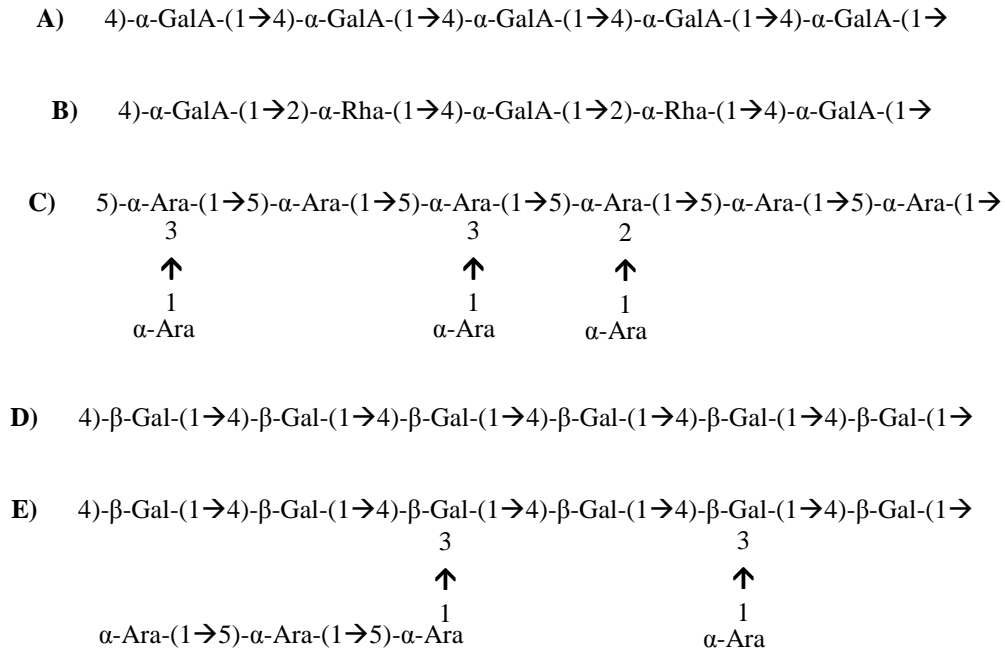


Figure 4 : Représentation schématique des constituants des pectines

A) homogalacturonanes ; B) squelette des rhamnogalacturonanes I ; C) arabinanes ; D) galactanes ; E) arabinogalactanes I

Bien qu'il soit admis que les pectines sont constituées de zones « lisses » (non substituées) et de zones « hérissées » (ramifiées) successives, l'arrangement des différents motifs est toujours controversé. Récemment, un modèle, faisant état d'une chaîne principale constituée de RG substituée par deux types de chaînes latérales composées d'oses neutres (arabinanes et arabinogalactanes) ou d'HGA a été proposé³ (Figure 5).

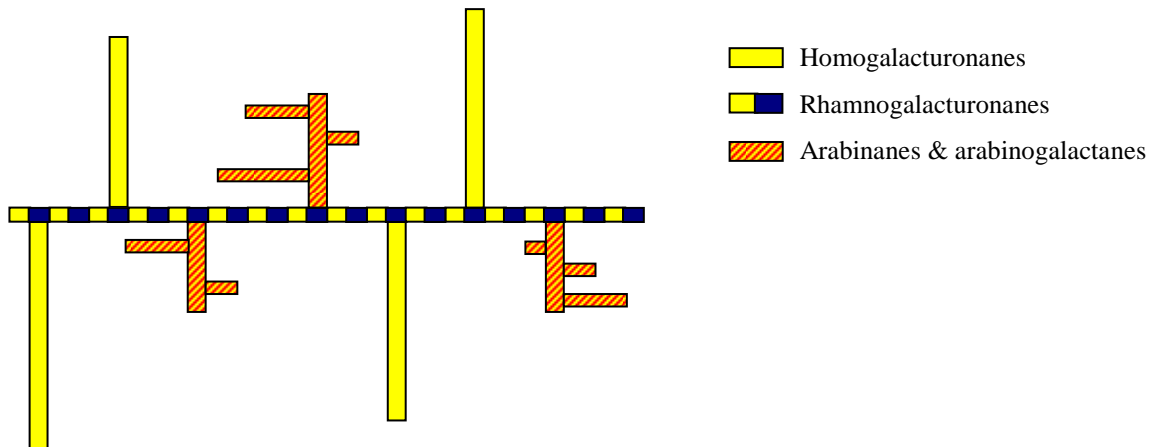


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des pectines³

Les pectines sont présentes principalement dans la lamelle moyenne et dans la paroi primaire des Dicotylédones.⁴ Elles ont essentiellement un rôle de régulation, que ce soit en termes de pH, de présence d'ions mais également de porosité, contrôlant par ce biais l'activité enzymatique. Elles possèdent aussi un rôle signalétique, en alertant les cellules de la présence d'organismes étrangers tels que des agents pathogènes.¹

1.2.2. Les protéines structurales

Malgré la prépondérance des polysaccharides dans la paroi, des protéines structurales sont également impliquées dans la formation des assemblages pariétaux. Ce sont, pour la plupart, des glycoprotéines. Quatre classes peuvent être distinguées : les protéines riches en proline (PRPs), riches en hydroxyproline (HRGPs) et riches en glycine (GRPs) ainsi que les arabinogalactanes protéines (AGPs). Leur capacité d'interaction avec les autres composants pariétaux leur confère un rôle important au sein de la paroi.

Les HRGPs constituent la classe de protéines la plus étudiée. Une sous-famille de celle-ci a été nommée « extensine » en raison de son rôle supposé sur l'extensibilité de la paroi.⁵ Bien que cette fonction n'ait pas été confirmée, cette appellation demeure. Les HRGPs sont constituées de 50 % de glucides principalement d'L-arabinose et de D-galactose. Leur rôle précis est encore mal connu. Il a cependant été déterminé que l'expression des gènes associés est induite par des blessures, des infections de pathogènes, le dessèchement et peut-être le renforcement mécanique de la paroi.

Les AGPs sont, quant à elles, hautement glycosylées et sont composées de plus de 90 % de saccharides, principalement L-arabinose et D-galactose.⁶ Aucune fonction ne leur est clairement attribuée, mais il semblerait qu'elles jouent un rôle au niveau de l'adhésion cellulaire et dans la transmission des informations à la cellule durant la différenciation.⁷

1.2.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules aromatiques portant un groupement hydroxyle directement lié à un cycle benzénique.

Les parois secondaires des cellules végétales contiennent plus de 30 % de lignine, composé phénolique et principal constituant de cet assemblage. La lignine est formée dans la

paroi cellulaire lorsque l'élongation des cellules est terminée par polymérisation des alcools *p*-coumarylique, *p*-coniférylique et *p*-sinapylique,⁸ représentés Figure 6. La lignine est impliquée dans la structure et la cohésion de la paroi mais également dans la résistance aux microorganismes.

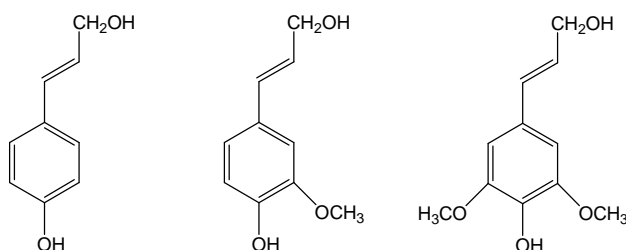


Figure 6 : Principaux précurseurs de biosynthèse de lignine

La proportion des différents précurseurs composant la lignine est très variable en fonction de l'espèce et des tissus considérés. Ces précurseurs sont liés par des liaisons éther, ester ou carbone-carbone. La nature covalente de ces liaisons entraîne une rigidité et une stabilité importante de la lignine. Sa polymérisation a lieu tant que la paroi dispose de précurseurs et d'espace. La lignine occupe en conséquence tout l'espace pariétal qui n'est pas occupé par des macromolécules, déplaçant, de ce fait, l'eau. La lignine forme ainsi un maillage tridimensionnel hydrophobe inapte à l'extension, qui génère l'arrêt de la croissance pariétale. La Figure 7 représente les différents types de liaison présents dans la lignine.

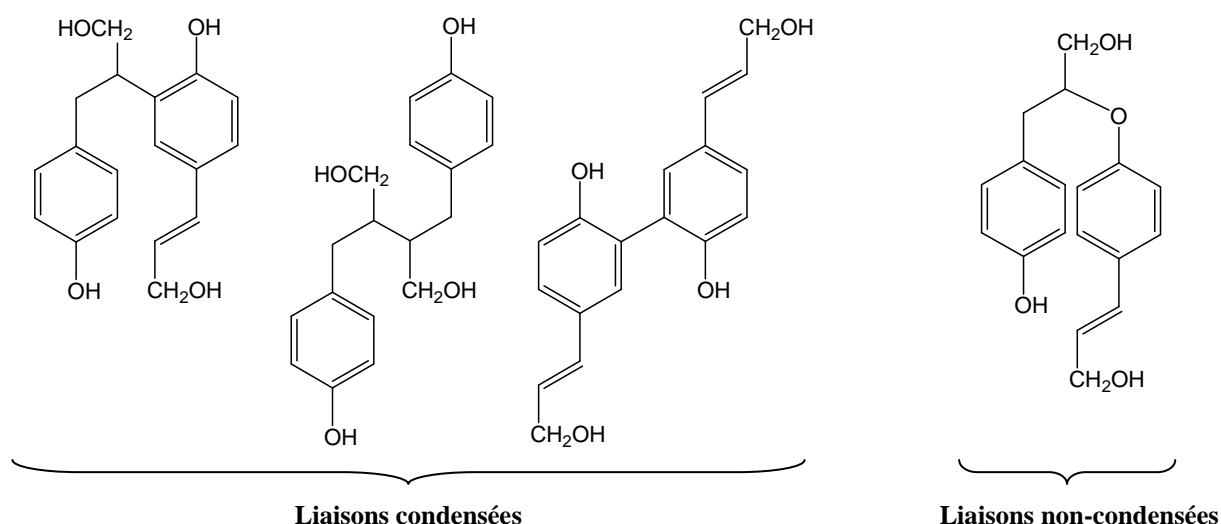


Figure 7 : Représentation des liaisons existantes au sein de la lignine

La paroi primaire ne contient que peu, voire pas de lignine. En revanche, bien que nettement moins abondants, d'autres composés phénoliques existent au sein de celle-ci. Ces composés sont présents en faibles quantités mais ont une importance majeure car ils sont impliqués dans les liaisons inter-polysaccharidiques. C'est le cas des acides *p*-coumaroylique, *p*-hydroxybenzoïque et férulique.

Il semblerait en effet que l'acide férulique soit responsable de la réticulation entre pectines⁹ via des acides diféruliques (Figure 8).

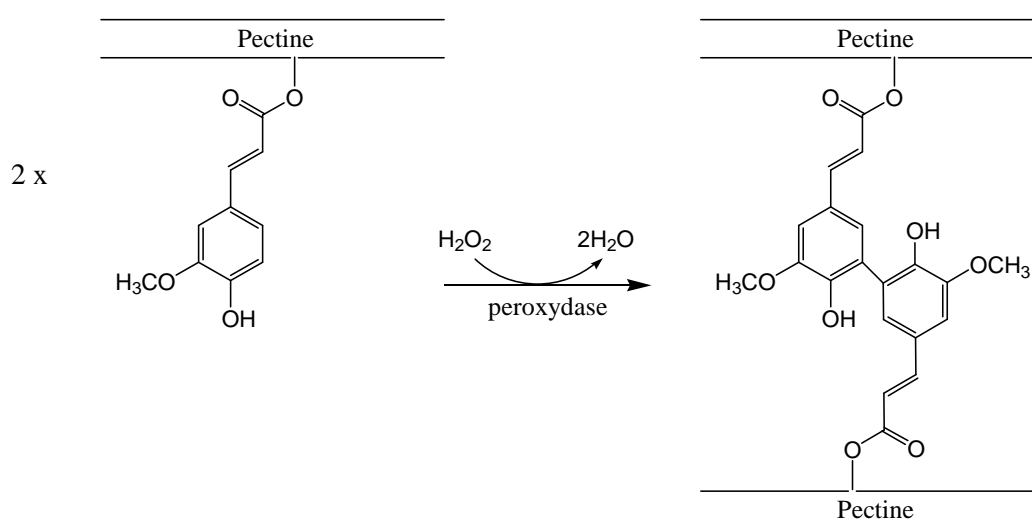


Figure 8 : Représentation schématique de la formation des liaisons entre les pectines via les acides diféruliques

De même, les arabinoxyanes, qui sont les hémicelluloses majoritaires des Monocotylédones, seraient réticulés via des acides féruliques.^{10,11}

La nature, la proportion et l'organisation des constituants pariétaux dans les différents domaines de la paroi végétale donnent donc accès à des assemblages présentant des caractéristiques à la fois variables et spécifiques, leur permettant d'assurer des fonctions différentes et complémentaires.

A la suite de à cette présentation très générale de la paroi végétale, il apparaît nécessaire d'aborder plus en détails la description de la paroi primaire qui est, comme mentionné ci-dessus, le lieu des interactions XGs-cellulose, sujet de ce travail.

2. La paroi primaire des cellules végétales

2.1. Généralités

Il existe deux types de paroi primaire suivant la catégorie de plante considérée. Les parois primaires de Type I sont relatives aux Dicotylédones et aux gymnospermes, appartenant à la famille des Monocotylédones, alors que les parois de Type II sont associées aux Monocotylédones graminées. Quelque soit le type de paroi considéré, le polysaccharide de base est la cellulose associée en microfibrilles. Cependant, alors que dans les parois primaires de Type I des XGs sont intercalés entre ces microfibrilles, dans les parois primaires de Type II ce sont les GlucuronoArabinoXylanes (GAXs) qui assurent ce rôle.¹² Ces GAXs sont des polysaccharides ramifiés constitués d'une chaîne principale β -1,4-D-xylosidique substituée par des résidus arabinosyle et moins fréquemment de résidus acide glucuronosyle. Les GAXs qui sont fortement ramifiés se retrouvent principalement dans les cellules en croissance alors que les GAXs peu ou pas ramifiés s'accumulent dans les cellules matures.¹³ Seules les parois primaires de Type I seront considérées par la suite.

La paroi primaire de Type I est constituée d'une association de réseaux macromoléculaires. Cet ensemble hétérogène est un édifice dynamique car il a pour fonction de s'adapter aux constantes évolutions morphologiques de la cellule en croissance. Ainsi cette

construction complexe permet à la paroi primaire d'assurer ces deux spécificités : rigidité, pour jouer le rôle d' « exo-squelette » cellulaire, et élasticité, permettant la croissance et la division de la cellule.

2.2. Composition et biosynthèse

Les principaux constituants de la paroi primaire impliqués dans ces réseaux tridimensionnels sont : la cellulose, les hémicelluloses, les pectines et les protéines, qui ont été présentés succinctement dans le paragraphe précédent.

Au moins 14 monosaccharides différents composent les polysaccharides pariétaux.¹⁴ Cette diversité, associée à la possibilité d'être connectés par différents types de liaison glycosidique, permet de comprendre aisément que leur biosynthèse soit complexe. Le processus central de la biosynthèse de ces polysaccharides pariétaux est l'action de glycosyltransférases (GTs). Chez *Arabidopsis thaliana*, 415 gènes ont été identifiés comme codant pour des GTs putatives.¹⁵

Compte tenu de l'importance de la cellulose et des xyloglucanes dans ces travaux, la structure et la biosynthèse de ces deux polysaccharides vont être détaillées avec plus de précision dans la suite de ce document.

2.2.1. La cellulose

Description

La cellulose est l'une des macromolécules les plus abondantes à la surface de la terre. Cet élément majeur des parois cellulaires représente entre 20 % et 30 % des polysaccharides présents dans les parois primaires des Dicotylédones. La cellulose est un homopolysaccharide linéaire constitué d'unités D-glucopyranosyle liées entre elles par des liaisons β -1,4. Ces unités sont orientées les unes par rapport aux autres de 180 ° le long de la chaîne, conférant à la cellulose une structure linéaire hélicoïdale. En conséquence, le motif constitutif de la cellulose cristalline est le cellobiose (Figure 9).

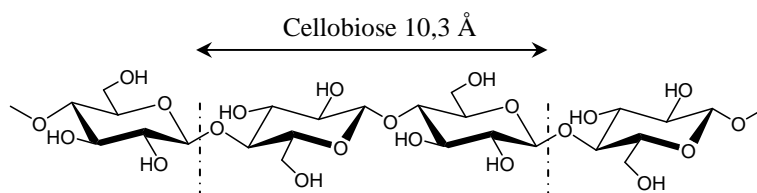


Figure 9 : Représentation schématique d'une chaîne de cellulose cristalline et identification de son motif élémentaire : le cellobiose

En dépit de la simplicité de la structure chimique de ce polymère naturel, certaines caractéristiques restent mal connues. En effet, bien que la structure cristalline de la cellulose native ait été examinée dès le début du 20^{ème} siècle par diffraction des rayons X, ce n'est qu'au début du 21^{ème} siècle qu'elle a été établie de façon précise.^{16,17}

La cellulose native est présente quasi-exclusivement sous la forme de cellulose I, où les chaînes de cellulose sont parallèles les unes aux autres. Suivant son origine, il existe d'importantes variations de taille des cristaux (Figure 2), de degré de cristallinité, ainsi que de composition en ses deux allomorphes cristallins principaux : I_α et I_β. La nature de la cellulose synthase ou des complexes terminaux de synthèse (TCs), dont le rôle sera développé au paragraphe suivant, pourrait être à l'origine de ces variations.¹⁸⁻²⁰ Dans les parois primaires des cellules végétales, la cellulose est organisée en rosettes composées de 36 chaînes de cellulose.²¹

Dans la cellulose II, les chaînes de cellulose ne sont plus orientées de façon parallèle mais anti-parallèle. Il n'existe que de très rares exemples de production de cellulose II dans la nature,²² cependant celle-ci peut être obtenue par traitement alcalin de la cellulose I, appelé mercerisation, au cours duquel les liaisons hydrogène responsables de l'organisation de la cellulose sont en partie rompues ce qui conduit à un réarrangement de cette structure.

Biosynthèse de la cellulose chez les bactéries

La biosynthèse de la cellulose est un processus complexe à étudier, en particulier chez les plantes supérieures. C'est la raison pour laquelle de nombreuses études ont été faites chez les bactéries. De plus, bien que la biosynthèse de la cellulose soit différente dans les plantes et dans les bactéries, de nombreuses d'études des interactions entre polysaccharides pariétaux ont utilisé la cellulose bactérienne. Il est donc important de préciser cette voie de biosynthèse.

L'obtention de cellulose bactérienne fait l'objet de nombreux travaux depuis plus d'un siècle.^{23,24} La bactérie la plus utilisée est une bactérie aérobie de forme ovale *Acetobacter xylinum* (Figure 10).

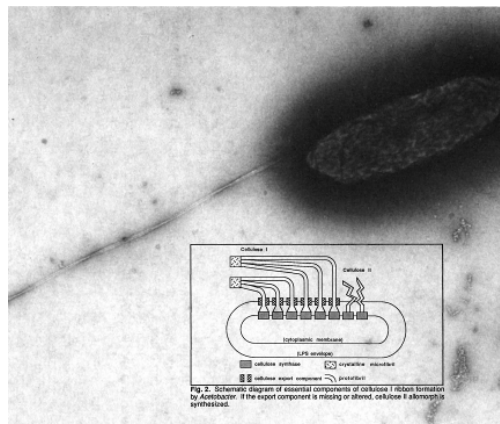


Figure 10 : Production de cellulose par voie bactérienne (*Acetobacter xylinum*)

Cette bactérie synthétise de la cellulose I sous forme de polysaccharide extra-cellulaire avec un excellent taux de pureté. Jusqu'à 200 000 molécules de glucose par seconde pourraient ainsi être polymérisées en chaîne cellulosique par une seule cellule d'*Acetobacter xylinum*.²⁵ Ces chaînes sont tout d'abord cristallisées sous forme de microfibrilles qui sont ensuite assemblées pour former une structure ruban vrillé. Le plan de cristallisation a été déterminé comme étant parallèle à la surface de dépôt de la cellulose²⁶ (Figure 11).

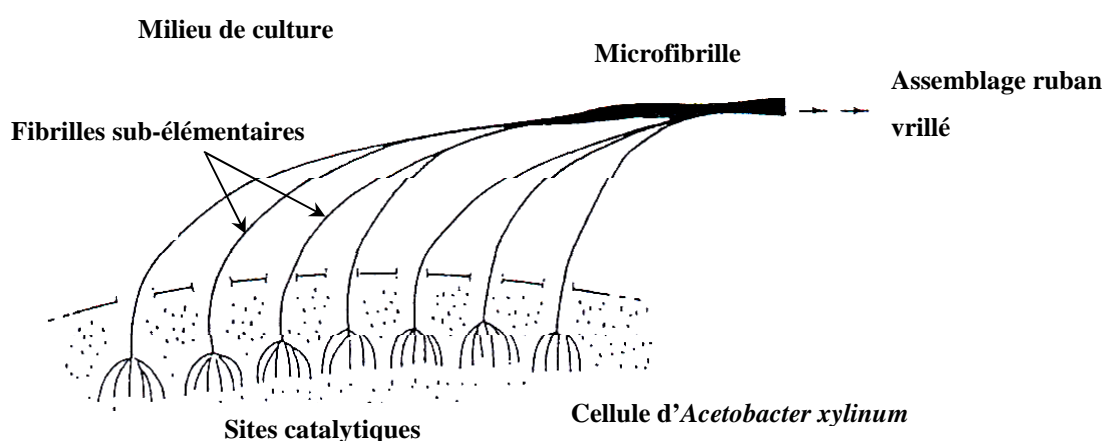


Figure 11 : Modèle représentant le procédé de formation de l'assemblage de type ruban vrillé dans le système d'*Acetobacter xylinum*²⁷

Deux voies métaboliques sont présentes chez *Acetobacter xylinum*,^{28,29} la voie des pentoses-phosphates et le cycle de Krebs pour l'oxydation des acides organiques et des constituants connexes.

Biosynthèse de la cellulose chez les plantes

Chez les plantes, les chaînes cellulosiques sont synthétisées au niveau de la surface externe de la membrane plasmique, grâce aux complexes terminaux de synthèse (TCs) situés à l'extrémité des microfibrilles naissantes. Ces TCs ont été identifiés par microscopie électronique de cryofractures de membranes plasmiques de plusieurs organismes.^{30,31} La faible stabilité de ces TCs de synthèse, qui rend leur extraction extrêmement délicate, est à l'origine du manque de connaissances précises acquises sur la biosynthèse de la cellulose. Récemment Lai-Kee-Him *et al.*³² sont néanmoins parvenus à synthétiser des quantités significatives de cellulose *in vitro*, à partir de fractions microsomales de culture de cellules de *Rubus fruticosus* (ronce). Les structures obtenues *in vitro* et *in vivo* se sont révélées similaires.

Les TCs sont constitués de sous-unités dont la nature, le nombre et l'organisation varient en fonction de l'espèce considérée. Chez les plantes supérieures, les TCs comportent 6 sous-unités,³⁰ « complexe de synthèse de cellulose » (CSC), qui donnent chacune naissance à une chaîne de cellulose, et sont organisées en rosette conférant, par conséquent, cette structure aux unités élémentaires des microfibrilles. Le diamètre de ces dernières dépend du nombre d'éléments constitutifs de la rosette et donc de l'organisation des complexes terminaux. Ces TCs se déplacent le long de la membrane plasmique et le dépôt des microfibrilles de cellulose est guidé par des microtubules adjacentes à la membrane. (Figure 12).

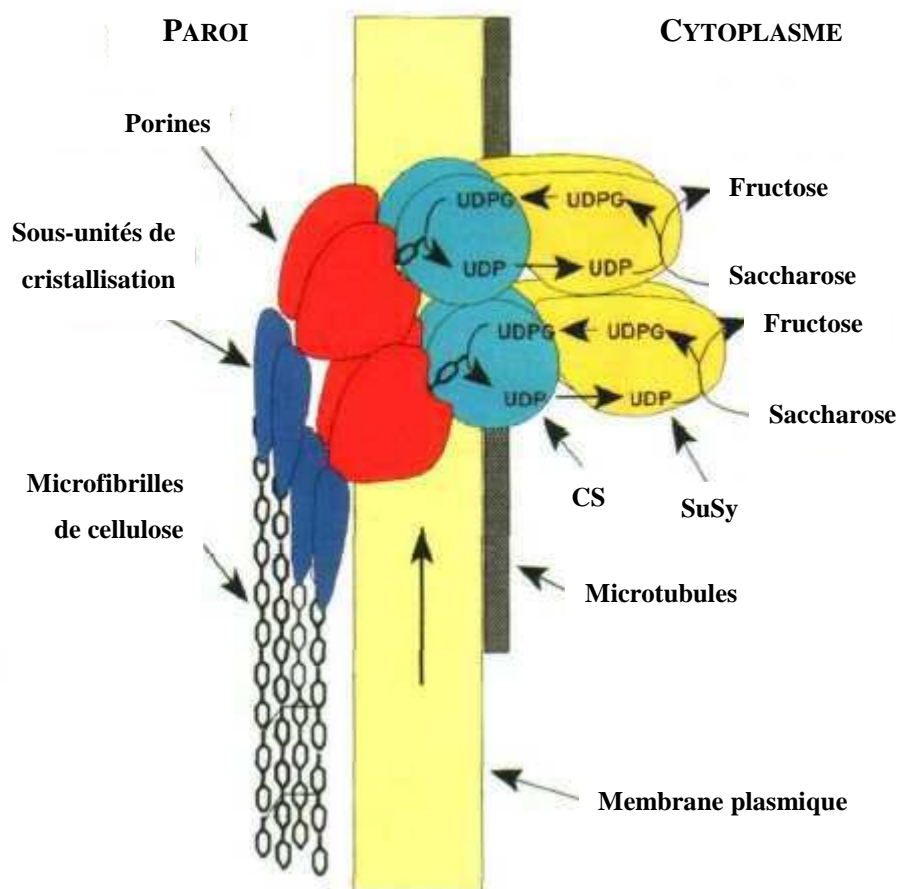


Figure 12 : Modèle hypothétique d'organisation du complexe cellulose synthase dans la membrane plasmique³³

Le mécanisme de synthèse de la chaîne glucosidique est, aujourd'hui encore, loin d'être entièrement établi, en particulier parce qu'il est actuellement impossible de déterminer avec précision la composition de ces TCs.³³ Certaines unités ont cependant pu être identifiées. Il s'agit d'enzymes nécessaires à la synthèse de la cellulose : les glycosyltransférases codées par les gènes *CesA*³⁴ appelées cellulose synthases. Ce sont des GTs processives appartenant à la famille GT2, de la classification CAZY.³⁵ Les TCs comporteraient plusieurs isoformes de cette enzyme,³⁴ parfois génétiquement redondantes.³⁶ Les protéines IRX1, IRX3 et IRX5 ont également été déterminées comme des protéines essentielles pour le fonctionnement des TCs, majoritairement dans la paroi secondaire mais de façon moindre dans la paroi primaire.³⁷ La présence de ces trois sous-unités semble requise pour un assemblage correct des TCs, mais leur rôle n'est pas encore précisément défini.

Compte tenu du fait que, comme mentionné précédemment, les unités glucosyle sont orientées, au sein de la cellulose, à 180 ° les unes par rapport aux autres selon l'axe de la

chaîne cellulosique, il a également été envisagé que le précurseur de biosynthèse de la cellulose soit le cellobiose. La possibilité de transférer directement une unité cellobiosyle a été développée par Albersheim *et al.*³⁸ ainsi que Carpita et Vergara.³⁹ En conséquence, le complexe catalytique serait constitué de deux sites actifs utilisant deux UDP-Glc.⁴⁰ Cette hypothèse est cependant à ce jour, toujours controversée.

D'autres protéines semblent jouer un rôle dans la biosynthèse de la cellulose comme par exemple les protéines KOR1⁴¹ et KOB1,⁴² identifiées chez *Arabidopsis thaliana*.

Une fois les unités élémentaires formées, elles s'associent pour former les microfibrilles comportant chacune 36 chaînes glucosidiques chez les plantes supérieures (Figure 13).

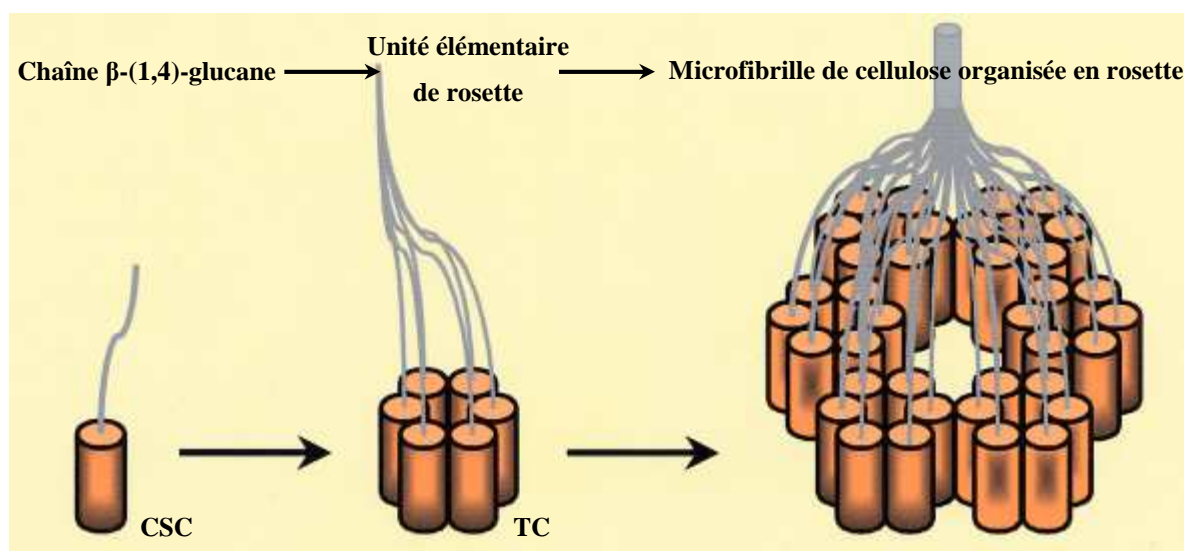


Figure 13 : Organisation en rosette des microfibrilles de cellulose⁴³

Les microfibrilles de cellulose ainsi extrudées vont alors se déposer dans la paroi primaire. Leur organisation et leur orientation sont dirigées par les TCs dans la membrane plasmique mais également par l'interaction de la cellulose ainsi formée avec les autres polymères présents dans la paroi au moment de leur extrusion tels que les xyloglucanes.

2.2.2. Les xyloglucanes (XGs)

Généralités

Les xyloglucanes sont les composés hémicellulosiques les plus abondants au sein de la paroi primaire des cellules végétales de Type I.¹³ Ils composent 20 % à 25 % des parois cellulaires en cours de croissance chez les plantes Dicotylédones.^{44,45} D'autres hétéropolysaccharides non cellulosiques peuvent être présents mais en proportion nettement plus faible. Le réseau formé par les XGs avec la cellulose est garant du maintien de l'organisation spatiale de ces parois. Ils ont, outre leur rôle structural, une importance sur le plan biologique en raison du rôle signalétique de leurs oligomères pour le métabolisme de la cellule végétale et peuvent avoir également un rôle de réserve. Ces différents rôles seront abordés ultérieurement dans un paragraphe spécifique.

Composition

Les xyloglucanes sont des hétéropolysaccharides ramifiés. De structure identique à la cellulose, la chaîne principale est constituée de résidus D-glucopyranosyle liés entre eux par des liaisons β -1,4. Celle-ci est substituée par des branches latérales dont la composition varie en fonction de l'origine des XGs considérés. Il existe une certaine régularité dans la distribution des unités D-xylopyranosyle, branchées en α -(1,6). En effet, le squelette cellulosique est composé d'un enchaînement de trois résidus D-glucosyle xylosylés consécutifs suivis par un glucose non substitué. Entre 30 et 50 % des résidus D-xylosyle sont substitués en position O-2, par des unités β -D-galactopyranosyle ou plus rarement par des résidus α -L-arabinofuranosyle. De plus, les résidus D-galactosyle peuvent également porter, au niveau de leur position O-2, une unité α -L-fucopyranosyle. La chaîne β -(1,4)-glucane possède donc des motifs mono-, di- ou trisaccharidiques liés en position O-6 des unités D-glucosyle. Des résidus α -L-arabinofuranosyle et β -D-xylopyranosyle peuvent aussi être liés, mais plus rarement, en position O-2.¹³ Certains hydroxyles peuvent être acétylés (5 % w/w), l'hydroxyle 6 des résidus D-galactosyle est le principal site d'acétylation (Figure 14).

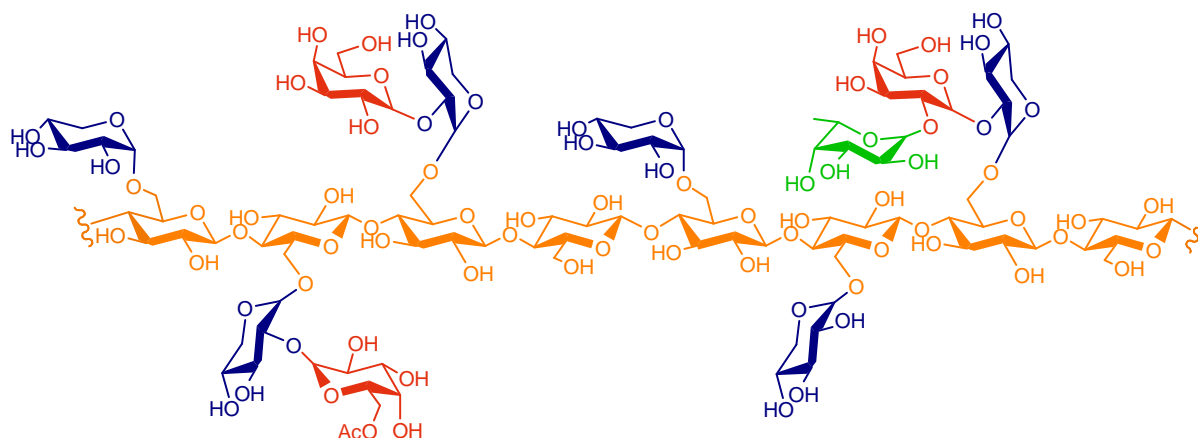


Figure 14 : Structure chimique des XGs de paroi cellulaire de Type I

Malgré la similitude du squelette de la cellulose et des xyloglucanes, la présence de ces ramifications leur confère des propriétés différentes et notamment l'incapacité à s'organiser en microfibrilles. Les XGs ont été classés en trois catégories suivant leur degré de branchement.⁴⁶ Les XGs de Type I pour lesquels approximativement 75 % des résidus D-glucopyranosyle sont substitués, sont présents dans les Dicotylédones non solanacées, les Monocotylédones non-graminées et les gymnospermes. Dans les Dicotylédones solanacées tels que le tabac, la pomme de terre ou la tomate,⁴⁷ les XGs de Type II sont prédominants, ils comportent 40 à 45 % de résidus glucosyle substitués et présentent une teneur en résidus arabinosyle importante et une absence de résidus fucosyle. Enfin, les XGs de Type III sont présents, en très faible quantité, dans les Monocotylédones graminées^{48,49} tels que les céréales et ne contiennent que 25 % à 35 % des résidus glucosyle substitués.

Afin de faciliter leur dénomination, une nomenclature a été établie où chaque chaîne latérale associée à son résidu glucosyle sera désignée par une lettre.⁵⁰ De plus, le résidu glucopyranosyle sera représenté par la lettre **G** alors que son dérivé glucitol, utilisé à des fins analytiques sera identifié par **Gol**. La correspondance entre lettre et groupement saccharidique issu de cette nomenclature est rappelée ci-dessous (Figure 15). C'est cette nomenclature qui sera utilisée par la suite.

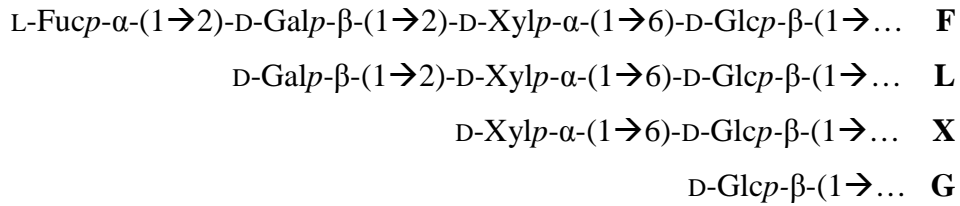


Figure 15 : Nomenclature associée à la dénomination des XGs et XGOs ⁵⁰

La nature et la substitution des chaînes latérales sont variables en fonction de l'espèce considérée. Par exemple, pour les XGs de tamarin qui ne sont pas fucosylés, les différents blocs constitutifs (Figure 16) sont présents en proportions allant de 9 % molaire pour XLXG jusqu'à 50 % molaire pour le XLXG, les oligosaccharides XXLXG et XXXXG étant représentés, pour leur part, à respectivement 28 % et 13 % molaire.⁵¹

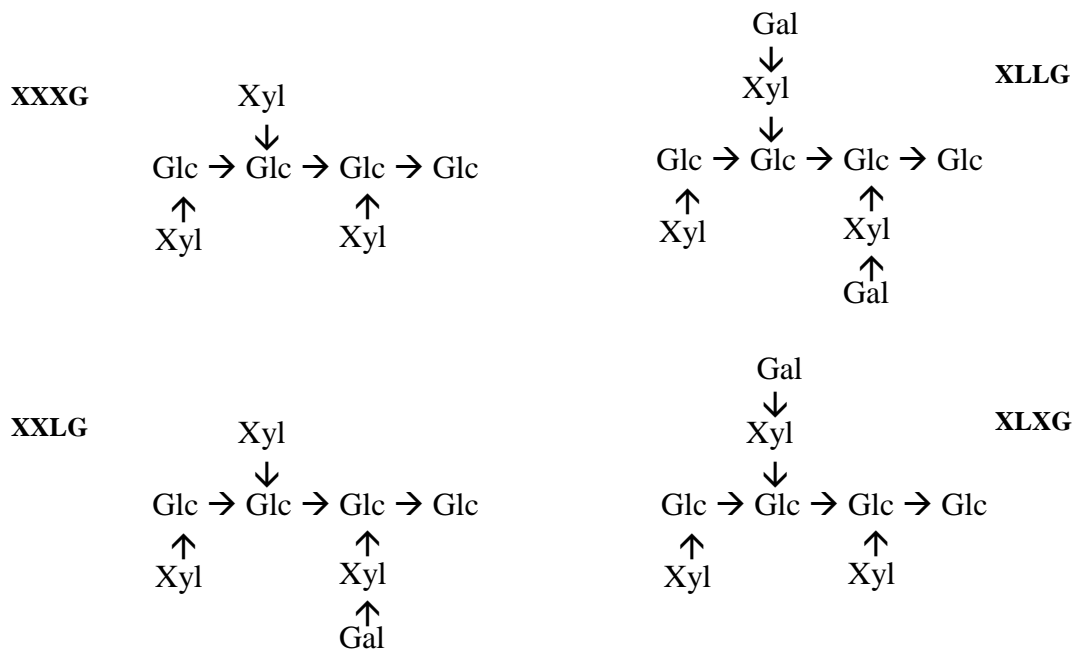


Figure 16 : Représentation des blocs constitutifs de XGs de tamarin [XGO]

La nomenclature utilisée est celle de Fry *et al.* ⁵⁰

Biosynthèse des XGs

Contrairement à la cellulose, les XG ne sont pas synthétisés dans le plasmalemme. Ils sont assemblés dans l'appareil de Golgi grâce à différentes glycosyltransférases qui catalysent

le transfert d'un monosaccharide activé, le plus souvent sous la forme d'un nucléotide sucre, sur un saccharide accepteur.⁵² Les XG ainsi synthétisés sont ensuite transportés par des vésicules de sécrétion, pour être intégrés à la paroi primaire pré-existante.^{45,53}

Compte tenu de la diversité des monosaccharides constitutifs des XGs, plusieurs glycosyltransférases sont nécessaires à leur biosynthèse.

Celles-ci ne présentent pas les mêmes caractéristiques mécanistiques. En effet, d'après les travaux de Gordon et Maclachlan⁵⁴ il semblerait que les courtes chaînes linéaires de (1,4)- β -D-glucane soient des accepteurs des α -xylosyltransférases qui transfèrent alors le donneur UDP-xylose sur un court fragment glucosidique. L'ajout du premier monosaccharide des chaînes latérales est donc nécessaire à l'élongation du squelette β -D-glucopyranosique. Les β -glucane-synthases et α -xylosyltransférases semblent donc agir de concert, en formant un complexe enzymatique dont la coordination n'est pas à ce jour déterminée avec précision. Les XGs présentent une chaîne principale identique à une chaîne cellulose, où les résidus glucosyle sont orientés de 180°C les uns par rapport aux autres. Les résidus xylosyle se situent donc alternativement de part et d'autre de la chaîne glucosidique. Cet éloignement de deux résidus xylosyle portés par deux résidus glucosyle consécutifs peut susciter l'interrogation quant à l'existence de plusieurs xylosyltransférases. L'activité de deux xylosyltransférases AtXT1 et AtXT2, appartenant à la famille 34 des glycosyltransférases, a été étudiée sur le cellotriose, cellotétraose et le cellopentaose,⁵⁵ ainsi que sur plusieurs XGOs présentant des degrés de xylosylation différents.⁵⁶ L'addition du premier résidu xylosyle se fait dans tous les cas sur le quatrième résidu glucosyle à partir de l'extrémité réductrice. Ainsi GXGGGG donne majoritairement lieu à GXXGGG. Les temps d'incubation nécessaires pour poursuivre la xylosylation sont ensuite extrêmement longs.⁵⁷ La difficulté à ajouter des résidus xylosyle supplémentaires, en utilisant uniquement les xylosyltransférases AtXT1 et AtXT2, est probablement liée à la présence, dans l'appareil de Golgi, d'autres enzymes de la famille GT34, selon la classification CAZY, qui assurent l'ajout des résidus xylosyle supplémentaires.

Contrairement à ce mécanisme concerté d'addition des résidus glucosyle et xylosyle, l'addition de monosaccharides supplémentaires sur les polysaccharides ainsi formés résulte de processus indépendants faisant intervenir d'autres enzymes telles que les β -D-galactosyl- et les α -L-fucosyltransférases. Une galactosyltransférase transférant l'UDP-galactose sur les XGs a été solubilisée à partir de membranes golgiennes de pois puis partiellement

caractérisée.⁵⁸ Il a été montré que cette enzyme transfère des résidus β -galactosyle sur les résidus xylosyle les plus proches des extrémités réductrices.

Camirand *et al.* ont démontré que le GDP-Fuc est bien utilisé comme substrat par les xyloglucane-fucosyltransférases⁵⁹ et plus récemment une fucosyltransférase de pois a également été isolée à partir de membrane golgienne.⁵⁸

Il n'est cependant encore pas certain que la polymérisation soit complète au sein de l'appareil de Golgi. En effet il semblerait que seuls les XGs d'une longueur maximale d'environ 100 nm puissent être transportés dans ces vésicules, compte tenu de la taille de celles-ci.⁶⁰ Or, des études par microscopie électronique⁶¹ montrent que la longueur des XGs peut atteindre 700 nm. Il est donc envisageable que la polymérisation des XGs se poursuive hors de l'appareil de Golgi, potentiellement grâce aux xyloglucane-*endo*-transglycosylases (XETs) présentes dans la paroi primaire des cellules végétales et responsables de sa grande plasticité (voir, § « Métabolisme des XGs et expansion cellulaire » ci-dessous). Parvenus dans la paroi, les XGs pourront ainsi interagir avec les microfibrilles de cellulose. Ce processus a lieu majoritairement au niveau des sites de synthèse de la cellulose,^{21,33} influençant, de ce fait, l'organisation des microfibrilles.

Le réseau XG-cellulose, indispensable au maintien de la paroi primaire des cellules végétales, est ainsi créé, puis, par association avec les autres réseaux pariétaux, la structure complète de la paroi primaire est élaborée.

Rôle et métabolisme des XGs dans la paroi

Rôle des XGs au sein des plantes

Les XGs ont plusieurs rôles au sein des végétaux. Ils peuvent servir de substance de réserve et sont, dans ce cas, présents dans les graines des plantes et non fucosylés. C'est par exemple le cas des XGs de *Tamarindus indica* (tamarin).¹ Ils sont mobilisés pendant la germination comme réserve d'énergie, avant que les jeunes plants ne soient photosynthétiquement autosuffisants.

Certains oligosaccharides peuvent, à très faibles concentrations, exercer des effets signalétiques dans les cellules végétales. De tels oligosaccharides sont appelés « oligosaccharines ». Le xylogluco-oligosaccharide XXFG, par exemple, à une concentration d'environ 10^{-9} M, inhibe l'élongation des segments de tiges de pois induite par l'auxine de synthèse 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), hormone qui, à l'état naturel, est responsable de la croissance cellulaire.⁶² Il a aussi été démontré que la plus petite entité possédant cette activité est le trisaccharide 2'-fucosyl-lactose, [L-fucopyranosyl- α -(1 \rightarrow 2-D-galactopyranosyl- β -(1 \rightarrow 4)-D-glucose], issu du lait humain, qui présente un enchaînement saccharidique, Fuc \rightarrow Gal, identique à celui présent dans le XXFG.⁶³

Enfin, les XGs ont un rôle structural majeur dans les plantes et en particulier au sein de la paroi primaire des cellules, grâce au réseau qu'ils forment avec la cellulose. L'activité d'enzymes telles que les fucosyltransférases⁶⁴ ou des xylosyltransférases^{65,66} a été démontrée comme étant plus importante dans les tissus en croissance que dans les tissus matures. Ceci illustre le rôle structural des XGs dans la paroi primaire, paroi qui assure le maintien de la cellule au cours de sa croissance, grâce à l'action de xylogluco-*endo*-transglycosylases (XETs). Le métabolisme des XGs dans ce cadre est détaillé au paragraphe suivant.

Métabolisme des XGs et expansion cellulaire

La paroi primaire des cellules végétales contrôle la vitesse et la direction de l'expansion cellulaire permettant la conservation de leur intégrité mécanique, malgré les variations importantes de taille subies par les cellules au cours de leur croissance. Le mécanisme d'extension de la paroi doit donc impliquer simultanément un relâchement et une restructuration de la paroi, ainsi que l'incorporation de nouveau matériel. Le métabolisme des XGs au sein de la paroi primaire serait stimulé par un pH acide ou par la présence de l'acide indolacétique (IAA).⁶⁷ Les expansines⁶⁸ participent à ce processus de modification de la paroi, en intervenant au niveau des liaisons entre les XGs et la cellulose. La nature exacte du processus de modification de la paroi en milieu acide est cependant encore inconnue.

Le réseau XGs-cellulose, structure portante de la paroi primaire, subit d'autres modifications de nature enzymatique, notamment par les *endo*- et *exo*-glycoside-hydrolases (Figure 17).

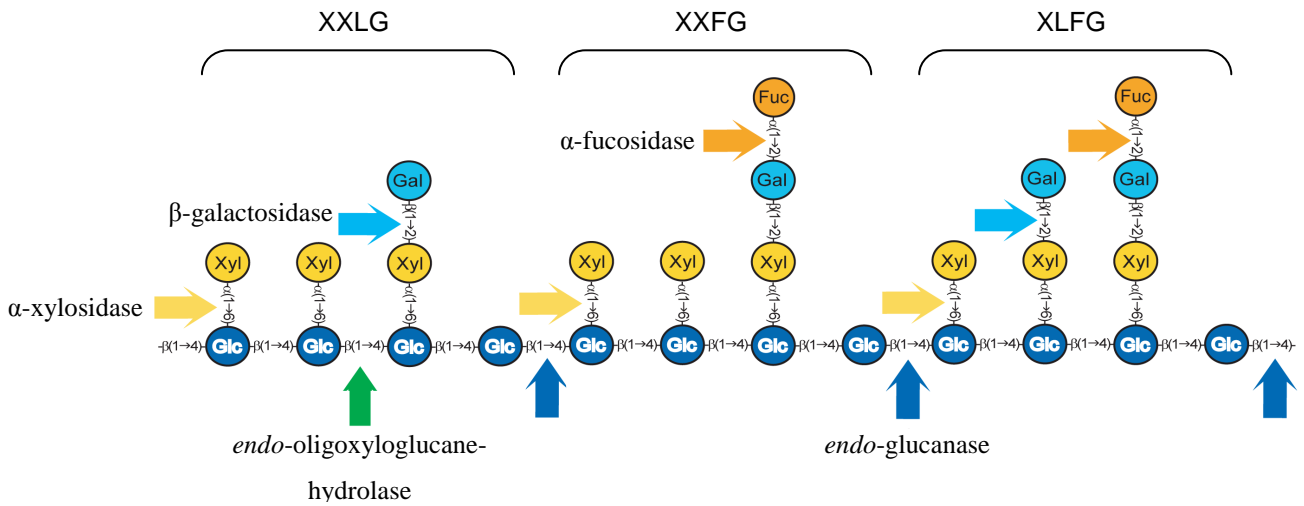


Figure 17 : Glycoside-hydrolases agissant sur les XGs

Une autre classe d'enzymes, appartenant à la famille 16 des glycoside-hydrolases et intervenant dans le métabolisme des XGs, a été décrite au début des années 90^{69,70} il s'agit des xyloglucane-*endo*-transglycosylases (XET), capables d'assurer le transfert d'un fragment xyloglucosidique sur une autre molécule de XG. La réaction générale de transglycosylation, assurée par des XETs, est représentée Figure 18.

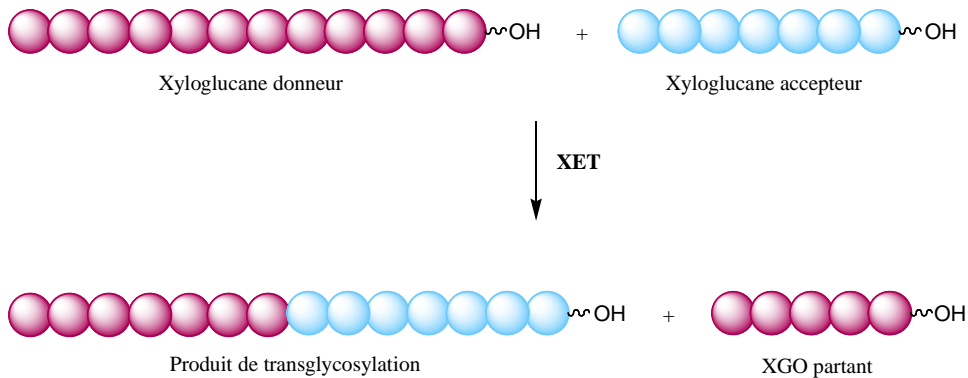


Figure 18 : Réaction de transglycosylation catalysée par les XETs

● représente les motifs de répétition des xyloglucanes de structure de base tétraglucosidique (XXXG, XLXG, XXLG, XLLG, ...)

Récemment, des études *in vitro* ont permis de préciser le mécanisme d'action de ces XETs. En effet, la synthèse par voie chimio-enzymatique de XGOs, de structure contrôlée et comportant uniquement des ramifications xylosidiques,⁷¹ a permis de déterminer les sites préférentiels de reconnaissance de la XET16A de *Populus tremula x tremuloides*.⁷²

L'action de ces différentes enzymes permet de garantir l'organisation de la paroi primaire et donc par conséquent le maintien de l'intégrité de la cellule.

2.3. Organisation de la paroi primaire

La paroi primaire est donc composée de nombreux polymères présentant à la fois des similitudes structurales mais également des différences radicales leur permettant d'assurer à la fois rigidité et flexibilité de la paroi. Ces polymères sont associés en trois réseaux principaux qui sont étroitement liés : le réseau cellulose-hémicellulose, imbriqué dans le réseau pectines-polysaccharides, auquel s'ajoute un troisième réseau indépendant constitué de protéines de structure. Plusieurs modèles ont été établis pour décrire ces assemblages.

2.3.1. Évolution du modèle de la paroi primaire des cellules végétales

Les différents composés présents dans la paroi primaire des cellules végétales sont associés les uns aux autres de façon à former un ensemble à la fois suffisamment rigide pour assurer le maintien de la cellule, mais également modulable et plastique pour permettre son développement.

Dès 1973, Keegstra *et al.* ont proposé un modèle au sein duquel les différents constituants de la paroi primaire sont associés par des liaisons covalentes et par des liaisons hydrogène entre la cellulose et les XGs.⁷³ La diminution de la force de ces liaisons en milieu acide permettrait alors le glissement des microfibrilles de cellulose, conduisant ainsi la croissance de la cellule. Cependant, le renforcement des liaisons hydrogène en milieu acide, observé par Valent et Albersheim⁷⁴ remet en question ce modèle.

Grâce à des études par microscopie électronique haute résolution et à des techniques d'extraction séquentielle de certains polysaccharides pariétaux, un nouveau modèle a été proposé par McCann *et al.* en 1990,⁷⁵ dans lequel le réseau XGs-cellulose est inclus dans une matrice pectique. Carpita et Gibeaut¹³ ont complété ce modèle en considérant un troisième réseau constitué de protéines structurales (Figure 19).

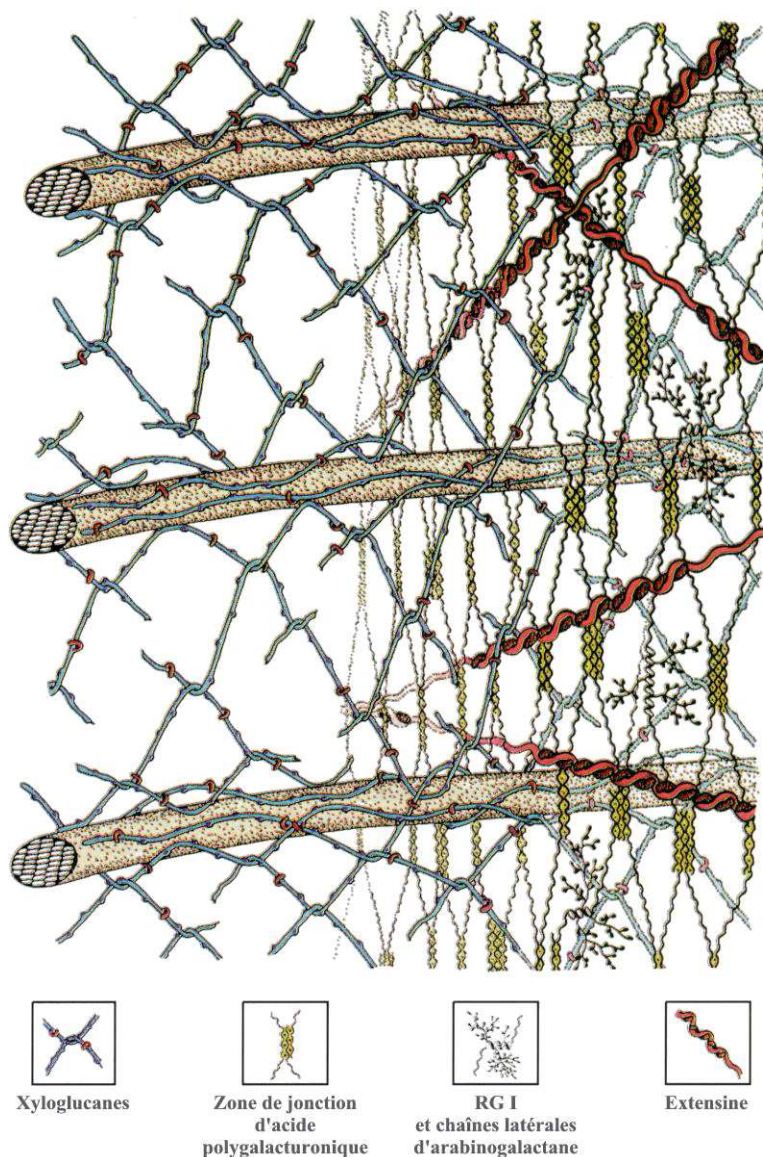


Figure 19 : Modèle de la paroi primaire des cellules végétales de Type I ¹³

Plus récemment, l'étude par spectroscopie RMN du solide ¹³C de parois de haricot mungo (*Vigna radiata* L.) a permis à Booten *et al.* ⁷⁶ de déterminer la présence de différents domaines de mobilité des XGs, suggérant deux populations de XGs au sein du réseau. Une fraction rigide, présente en faible quantité serait composée des XGs adsorbés à la surface des microfibrilles de cellulose, alors qu'une seconde fraction moins rigide, plus importante en quantité, représenterait les XGs situés entre les microfibrilles (pont, queue ...) ou en interaction avec d'autres polymères pariétaux. Ces observations laissent supposer que la quantité de XGs directement liés à la surface de la cellulose est plus faible que ce qui été supposé jusqu'à présent (Figure 20).

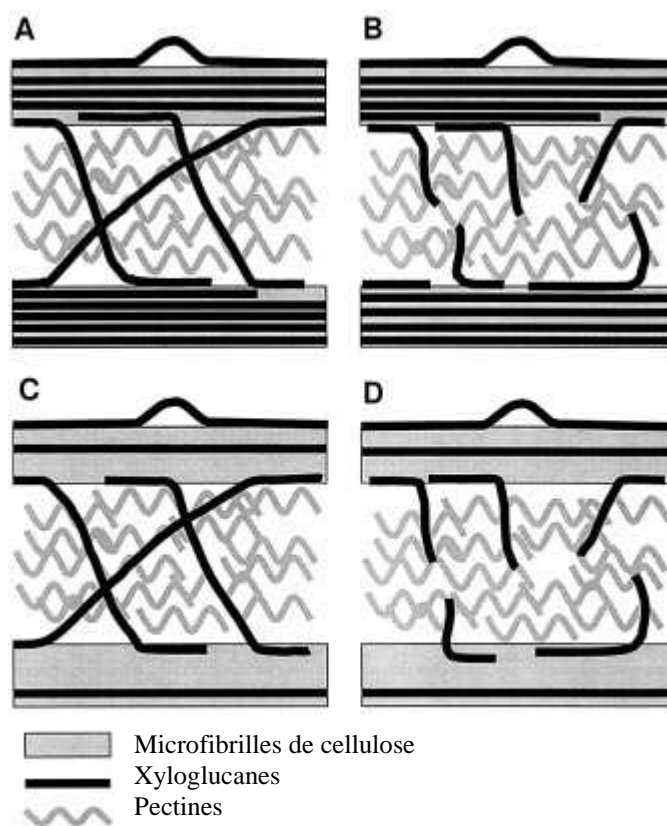


Figure 20 : Représentation schématique des parois primaires de haricot mungo (*Vigna radiata* L.)⁷⁶

La quantité de XGs liés directement à la cellulose est fortement diminuée dans le modèle de Booten (C, D) par rapport à l'ancien (A, B) favorisant les pontages (A, C) et les interactions avec les autres polysaccharides pariétaux (B, D)

Malgré ces légères améliorations, le modèle multi-réseaux de Carpita et Gibeaut reste cependant le plus accepté actuellement pour décrire la paroi primaire des cellules végétales. Chacun de ces réseaux se formerait de façon indépendante des autres. Leur structure sera détaillée par la suite à l'exception de celle de la matrice protéique qui ne semble pas intervenir directement dans les interactions XGs-cellulose, objet de ce travail.

2.3.2. Le réseau pectique

Les pectines sont des éléments déterminants de la paroi en raison de leur capacité à former des gels. En effet, les parties non estérifiées des chaînes d'HGA sont capables de se réticuler grâce à des interactions ioniques avec les ions Ca^{2+} et de constituer des zones de jonction. Ces liaisons ioniques sont coopératives et donnent lieu à une structure gélifiée de type « boîte à œufs ». Cette structuration est alors capable de réguler la porosité de la paroi.⁷⁷

Les pectines sont également associées entre elles via des liaisons covalentes.⁷⁸ La présence de liaisons covalentes entre les chaînes latérales d'arabinane et de galactane par l'intermédiaire de dimères d'acide férulique a été récemment démontrée par Ralet *et al.*⁹

Outre les liaisons pectines-pectines, les liaisons pectines-cellulose ont été étudiées,⁷⁹ via l'utilisation de systèmes modèles. Cette étude montre une forte affinité des chaînes latérales constitutives des pectines pour la cellulose, contrairement à leur chaîne principale. Ceci rend compte d'une interpénétration des différents réseaux, dont la forte cohésion est indispensable à la structuration de la paroi.

2.3.3. Le réseau XGs-cellulose

C'est le réseau le plus important d'un point de vue structural. En effet, comme cela a déjà été mentionné précédemment, c'est ce réseau qui assure la résistance de la paroi à la pression osmotique tout en permettant l'expansion cellulaire grâce à sa flexibilité.

Les XGs sont liés à la cellulose par des liaisons non covalentes, souvent restreintes aux seules liaisons hydrogène.⁸⁰ Cependant, la nature précise de ces interactions n'est pas encore connue. La structure du réseau, obtenu après exocytose des XGs et association avec les microfibrilles, suggère qu'il existe trois domaines xyloglucosidiques en fonction de leur force d'interaction.⁸¹ Ces trois domaines moléculaires ont été identifiés par extraction séquentielle de parois cellulaires de tiges de pois étiolées (Figure 21).

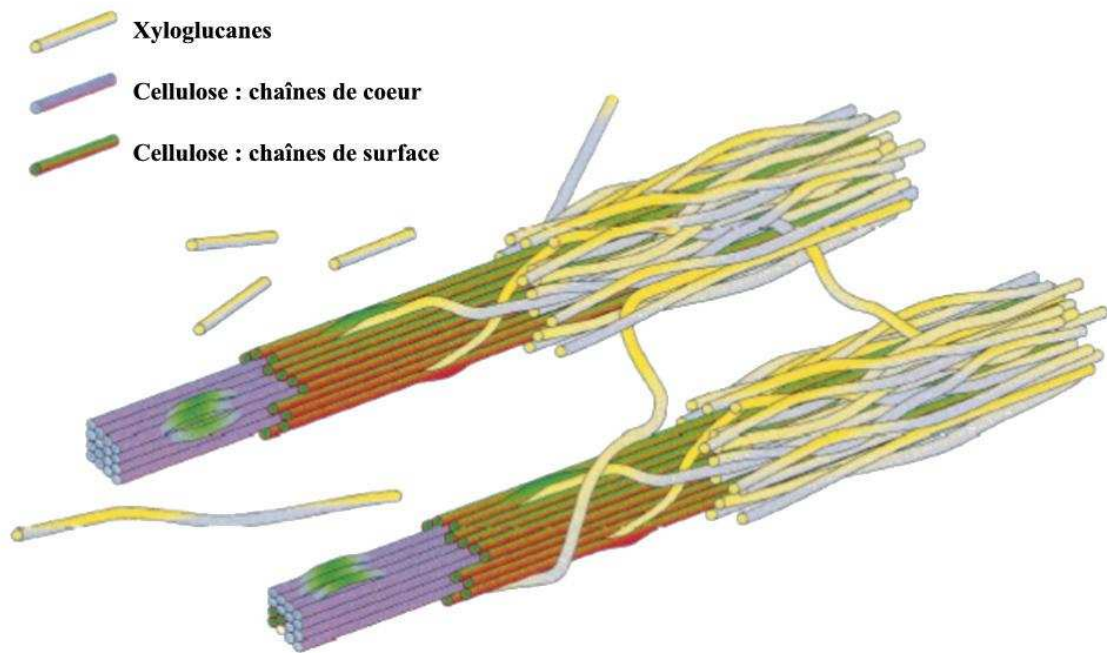


Figure 21 : Réseau xyloglucanes-cellulose de la paroi primaire des cellules végétales⁸²

- un premier domaine est composé des XGs qui ne sont pas directement en interaction avec la cellulose tel que les ponts, les boucles ou encore les queues. Ils sont facilement extractibles par utilisation d'une xyloglucane-*endo*-glucanase (XEG)
- une seconde partie des XGs est constituée des XGs directement en interaction à la surface de la cellulose. Elle peut être extraite avec une solution alcaline concentrée (KOH 24 %), postérieurement au traitement par la XEG.
- le troisième domaine de XGs, présent au sein de la paroi primaire pourrait être situé au cœur des microfibrilles de cellulose. Ces XGs ne peuvent être extraits de la paroi ni par l'utilisation d'une XEG ni en solution alcaline mais uniquement à l'aide de cellulases qui dégraderaient en même temps les microfibrilles.

L'existence de ce dernier domaine de XGs n'est cependant pas totalement certaine car il est possible que leur présence soit un artefact lié au traitement à la soude concentrée qui pourrait entraîner une mercerisation de la cellulose et l'encapsulation de certains XGs nécessitant par la suite l'utilisation d'une cellulase pour leur extraction.

La présence de ces différents domaines laisse néanmoins supposer que les mécanismes d'interaction présentent une certaine variabilité en fonction de la nature des XGs étudiés.

Les mécanismes d'interaction, de même que les facteurs influençant la capacité d'adsorption des XGs sur la cellulose, ne sont pas à ce jour clairement identifiés. Cela étant, les différentes approches que sont les études *in vivo*, *in vitro* et *in silico* ont d'ores et déjà permis d'apporter certaines informations.

3. Études *in vivo*, *in vitro*, *in silico* des interactions XGs-cellulose : trois approches complémentaires

3.1. Les approches *in vivo*

Lors des études *in vivo*, le réseau XGs-cellulose est étudié au sein même de la paroi des cellules végétales.

Il peut s'agir d'observations directes de la paroi ou de complexes XGs-cellulose extraits de celle-ci. Trois techniques de microscopie ont principalement été utilisées pour visualiser des complexes XGs-cellulose, issus de parois primaires de pois : observation par microscopie électronique, marquage [³H]-L-fucose et utilisation de la microscopie optique de fluorescence au moyen d'une lectine à L-fucose fluorescente. Ces observations ont permis de déterminer la présence de XGs à la surface et entre les microfibrilles de cellulose.⁸³ Ceci pourrait correspondre aux deux premiers domaines identifiés par Pauly *et al.*⁸¹

Parallèlement aux observations directes de la paroi, l'obtention de mutants et l'observation de leurs éventuelles différences de phénotype, par rapport au type sauvage, a permis d'apporter plusieurs renseignements sur les facteurs influençant la formation du réseau XGs-cellulose.

Le rôle des résidus fucosyle dans l'interaction a été particulièrement étudié mais les résultats obtenus sont contradictoires. Une approche génétique par criblage de plants d'*Arabidopsis thaliana* mutés, dans le but de modifier leur composition polysaccharidique, a permis de sélectionner des mutants présentant une composition de certains polysaccharides différente de celle du type sauvage. La mutation *mur1* d'*Arabidopsis thaliana* conduit à une

diminution de la quantité de résidus fucosyle et donne des plantes présentant un phénotype nain et des parois cellulaires fragilisées.⁸⁴ Parallèlement, dans le mutant *mur2*, l'activité de la fucosyltransférase spécifique des XGs (AtFUT1) est également affectée⁸⁵ et malgré la diminution de la fucosylation exclusivement sur les XGs, les plantes mutantes ne présentent pas de différence dans leur croissance ou dans leur physiologie. La paroi primaire des cellules ne montre par ailleurs pas d'affaiblissement. Suite à ces travaux, deux hypothèses sont alors envisageables. Tout d'abord, la mutation *mur1* affecte tous les polysaccharides pariétaux contrairement à *mur2* qui est décrite comme spécifique des XGs. Il est alors possible que les résidus fucosyle présents sur les polysaccharides pariétaux autres que les XGs soient responsables de l'altération de la croissance observée. Cependant, outre les XGs, seules les glycoprotéines et les pectines contiennent, en très faibles quantités, des résidus fucosyle, ce qui peut compromettre cette hypothèse. En effet, il semble peu probable que ces résidus soient indispensables à la structuration de la paroi. Une deuxième hypothèse peut alors être envisagée, selon laquelle la mutation *mur2* n'aurait pour conséquence qu'une faible diminution de l'activité fucosyltransférase insuffisante pour altérer la croissance de la plante alors que la mutation *mur1* entraîne l'absence totale de résidus fucosyle. Ces observations ne permettent donc pas d'apporter une réponse définitive sur l'importance des résidus fucosyle. Par ailleurs, les travaux de Zablackis *et al.*⁸⁶ laissent entendre que ces résidus seraient remplacés par des résidus galactosyle, ce qui illustrerait l'importance de la longueur des chaînes latérales, indépendamment de la nature des saccharides impliqués.

L'importance des résidus galactosyle a également pu être observée par cette approche génétique. Des plants d'*Arabidopsis thaliana*, issus du mutant *mur3*, qui possède une activité galactosyltransférase spécifique des XGs altérée, ont été étudiés.⁸⁷ Les XGs présents au sein de ce mutant ne contiennent plus de chaînes fuco-galactosylées. Les motifs XLFG sont absents au profit des motifs XLXG. Le phénotype qui en résulte ne présente pas de différences significatives, ce qui tend à prouver que le degré de galactosylation des XGs n'est pas un facteur d'importance pour la croissance des plantes. Pourtant, le mutant *reb1-1* d'*Arabidopsis thaliana*, dont le phénotype est caractérisé par une diminution de l'allongement des racines, présente également une déficience d'activité galactosyltransférase au niveau des XGs.⁸⁸ L'étude de ce mutant semble quant à lui révéler une influence du degré de galactosylation sur la croissance des cellules de certains tissus.

L'étude *in vivo* des parois cellulaires est donc un moyen efficace d'analyser les phénomènes tels qu'ils se passent réellement au sein de la plante. En effet, l'observation des modifications induites par les différentes mutations se fait directement dans le milieu naturel d'existence du réseau XGs-cellulose c'est-à-dire en tenant compte de tous les autres paramètres pouvant influencer sa construction.

L'analyse microscopique et l'approche génétique permettent d'accéder à différentes données, morphologie et localisation chimique par marquage en microscopie, altérations de structure primaire en génétique et c'est la raison pour laquelle les deux approches sont très souvent couplées. La sélection d'un mutant présentant une modification d'un caractère supposé d'importance pour la construction de la paroi, comme l'activité fucosyltransférase, et l'analyse du phénotype associé, comme par exemple l'altération de la croissance de la plante, permet ensuite de déterminer l'influence du paramètre modifié, tout ceci se faisant directement dans la plante. Malgré ces avantages incontestables, l'obtention de mutants présentant une délétion ou une surexpression d'un et un seul caractère est loin d'être triviale, en particulier la mutation spécifique de glycosyltransférases. De plus, certains paramètres, comme la taille des XGs, sont inaccessibles par une telle approche. Par ailleurs, et c'est là l'inconvénient majeur de cette approche, les conséquences d'une mutation sur des caractères, autres que celui attendu, peuvent être importantes mais sont souvent mal maîtrisées voire inconnues. Il est par exemple envisageable que pour le mutant *mur2*, un autre polysaccharide, ou une autre modification sur les XGs, permettent d'assurer les fonctions des XGs natifs, rendant ainsi les conséquences de la mutation invisibles sur le phénotype.

Afin de s'affranchir des contraintes et des complexités liées à l'analyse *in vivo*, les interactions XGs-cellulose ont été souvent étudiées à l'aide de systèmes modèles de la paroi primaire des cellules végétales.

3.2. Quelles avancées grâce aux approches *in vitro* ?

Plusieurs modèles ont été développés pour permettre une étude des interactions XGs-cellulose dans des conditions mieux contrôlées, notamment en ce qui concerne la nature des espèces en présence et la caractérisation des substrats utilisés. La construction de ces modèles *in vitro* peut se faire de deux façons : mise en présence des deux polysaccharides pariétaux

(XGs et cellulose) à étudier ou formation d'un composite XGs-cellulose par culture de cellulose bactérienne en présence de XGs.

3.2.1. Assemblages XGs-cellulose

Le simple mélange de XGs et de cellulose préalablement synthétisés et présentant des caractéristiques de structure ou de composition différentes, constitue un moyen simple de déterminer l'affinité de ces deux composés.

L'assemblage de xylogluco-oligosaccharides (XGOs) de tailles variables et de différents types de cellulose⁸⁹ a permis de proposer une longueur minimale du squelette glucosidique des XGOs pour observer des interactions. La comparaison de dérivés glucitol de XGOs, comportant de 3 à 12 résidus glucosyle sur leur chaîne principale, obtenus par hydrolyse partielle et dégalactosylation de XGs de tamarin, montre que le motif GXXXGol est le motif minimal donnant lieu à des interactions que ce soit avec la cellulose amorphe, la cellulose microcristalline ou bien la cellulose de filtre de papier. Par ailleurs, il existerait une taille optimale pour laquelle l'affinité est la plus élevée. En effet, suite à l'étude de l'adsorption de XGs de tamarin partiellement hydrolysés sur de la cellulose microcristalline Avicel,⁹⁰ l'adsorption maximale est obtenue pour les XGOs comportant de 20 à 44 résidus glucosyle sur la chaîne principale. Ceci va néanmoins à l'encontre des travaux de Hayashi *et al.*⁹¹ qui relatent une adsorption croissante des XGOs de tamarin non dégalactosylés sur la cellulose amorphe, en fonction du degré de polymérisation (DP), pour des XGOs comportant 64 à 3000 résidus glucosyle sur leur chaîne principale.

L'influence du degré de substitution des XGs a également été analysée par des études *in vitro*.

L'adsorption de XGs de *Tamarindus indica* et de *Hymenaea courbaril* sur la cellulose microcristalline Avicel, suivie de la détermination des XGOs constitutifs des XGs adsorbés ont permis à Lima *et al.*⁹² de montrer que le degré de galactosylation et la position de ces résidus ont une influence sur la capacité d'adsorption. En effet, les XGs de tamarin adsorbés contiennent plus de motifs XXXG et XLXG mais moins de motifs XXLG et XLLG que les XGs natifs. Ceci est en accord avec l'hypothèse de Vincken *et al.*,⁹⁰ selon laquelle la présence

de résidus galactosyle serait un obstacle à la pénétration des XGOs, dans les pores les plus petits de la cellulose.

L'influence des résidus fucosyle serait, quant à elle, très variable en fonction de l'origine du substrat cellulosique.⁹³ En effet, l'influence favorable d'une telle substitution, constatée par l'adsorption de XGs de *Rubus fruticosus* natifs et défucosylés sur de la cellulose commerciale 2700, apparaît notablement plus faible lors de l'adsorption, de ces mêmes XGs, sur de la cellulose issue de paroi de cellules de *Rubus fruticosus*.

Plusieurs autres travaux relatent une variabilité de l'adsorption des XGs de pois en fonction du type de cellulose considéré. Ainsi, les XGs de pois, comme ceux de tamarin, présentent une meilleure affinité pour la cellulose amorphe que pour la cellulose microcristalline de type Avicel.⁹¹ Les linters de coton⁹⁰ ou les fibres de cellulose⁹² conduisent à une adsorption moindre. Par ailleurs, l'adsorption de XGOs sur de la cellulose de papier filtre est plus faible que sur la cellulose amorphe mais plus importante que sur la cellulose microcristalline.⁸⁹ Toutes ces conclusions sont en accord avec les travaux de Hayashi⁹⁴ qui relie la dépendance de l'adsorption à la surface spécifique de la cellulose et donc au diamètre des fibres. Plus ce dernier diminue, plus la surface spécifique de cellulose augmente et plus la capacité d'adsorption de XGs de pois, sur ces différents types de cellulose (cellulose de pois, de *Valonia*, fibres de coton et cellulose d'*Acetobacter xylinum*), est importante.

Outre l'influence des caractéristiques des substrats, la nature propre des interactions a aussi été étudiée. L'influence modérée du pH, pour des valeurs comprises entre 2 et 7, sur les interactions entre des fragments de XGs et de la cellulose de papier filtre,⁷⁴ mais également sur les interaction entre XGs et cellulose de pois,⁹⁴ confirme l'existence de liaisons hydrogène entre les XGs et la cellulose. Des travaux postérieurs^{90,92} qui rapportent une influence, certes faible mais existante, du pH sur les interactions semblent contredire ces hypothèses. Cette influence du pH a cependant été attribuée à la présence d'impuretés que contiennent les celluloses commerciales, comme les acides uroniques, plus qu'à la nature des liaisons non covalentes.

Enfin, l'utilisation d'assemblages ternaires⁹⁴ a permis de mettre en évidence la spécificité et le caractère non compétitif des interactions XGs-cellulose. La présence d'arabinogalactanes, de pectines ou de β -glucanes non liés par des liaisons β -(1,4) n'affecte

pas la capacité d'interactions des XGs. Par ailleurs, l'affinité des polysaccharides constitués de β -1,4-glucanes, autre que les XGs,⁹⁵ laisse supposer un mécanisme d'interaction basé sur leur complémentarité de structure.

Les études *in vitro* d'assemblages XGs-cellulose ont donc permis d'apporter des informations pertinentes sur la nature des interactions XGs-cellulose présentes au sein des parois végétales. Mais ces systèmes sont parfois assez éloignés des complexes présents dans la paroi des cellules végétales. Pour mieux prendre en compte les mécanismes d'interaction présents lors de la biosynthèse, une deuxième voie d'étude *in vitro* a été développée, par formation de composites XGs-cellulose à partir de bactéries.

3.2.2. Obtention de composites XGs-cellulose

Dans la paroi des cellules végétales, les XGs sont supposés interagir avec la cellulose au niveau de son site de biosynthèse, après avoir été synthétisés eux même dans l'appareil de Golgi et transportés via des vésicules de sécrétion. Par analogie à cette obtention du réseau XGs-cellulose *in vivo*, la préparation et l'analyse de composites, par ajout de XGs dans le milieu de culture de cellulose bactérienne, a fait l'objet de plusieurs études. Par rapport à la constitution d'assemblages décrite précédemment, l'intérêt de cette approche est d'être plus en adéquation avec ce qui peut se produire dans la plante, tout en connaissant précisément la nature du polysaccharide utilisé, contrairement aux méthodes de déconstruction séquentielle des réseaux existants dans la paroi. En revanche, la limitation de ces systèmes modèles est liée aux différences de conditions de biosynthèse de la cellulose bactérienne et de celle s'opérant *in planta*.

La quantité de XGs incorporée lors de la production de cellulose en présence de XGs de tamarin (38 % w/w) est comparable à celle présente dans le réseau XGs-cellulose de la paroi primaire. De même, il semblerait qu'en présence de XGs, la cellulose bactérienne ait une organisation moléculaire comparable à celle de la cellulose pariétale.⁹⁶ Les XGs induisent une diminution de la cristallinité de la cellulose, en perturbant, par leur intercalation, l'auto-association des chaînes cellulosiques.⁹⁶ La modification de l'organisation cristalline de la cellulose ainsi que la diminution de la taille des fibres ont également été rapportées.

L'observation de ces composites par microscopie a montré que la proportion de XGs contenue dans les ponts reliant différentes microfibrilles est nettement plus faible que celle des XGs alignés avec la cellulose.⁹⁷ Ce travail rapporte également des résultats obtenus par analyse RMN du solide ¹³C, montrant qu'une fraction rigide de XGs constituerait 80 % des XGs adsorbés. Ceci tend à prouver que 80 % des XGs sont réellement en interaction avec la cellulose. Ces proportions ont aussi été déterminées par extraction enzymatique à partir des composites.⁹⁷ La différence notable entre ces proportions et celles déterminées par extraction séquentielle (§ 2.3.3)⁸¹ de la paroi primaire, pourrait être due à la masse molaire des XGs de tamarin utilisés dans ces composites, qui est plus importante que celles des composés pariétaux, ou à la plus grande accessibilité des XGs⁹⁷ à la xyloglucane-*endo*-glucanase utilisée pour l'extraction du deuxième domaine.

Des analyses de composites XGs-cellulose par spectroscopie infra-rouge (IR) dynamique en deux dimensions⁹⁸ ont permis d'observer également une forte proportion de XGs étroitement liés à la cellulose. En effet, ces deux polymères effectuent, suite à une stimulation, des déplacements simultanés. Ces mêmes études semblent confirmer la présence de liaisons hydrogène comme liaisons prépondérantes au sein du réseau.

Enfin, l'étude de composites gluco-/galactomannanes-cellulose montre une diminution du taux d'incorporation engendrée par une augmentation de la quantité de résidus galactosyle.⁹⁹ Ceci peut être rapproché, toute proportion gardée, de la diminution d'affinité des XGs pour la cellulose par augmentation du taux de galactosylation, mentionnée précédemment (§ 3.2.1).

En complément des approches *in vivo* et *in vitro* étudiant principalement l'influence de la nature des XGs et de la cellulose sur leurs interactions, des analyses *in silico* ont été effectuées afin d'apporter des informations d'ordre conformationnel et énergétique sur ces mécanismes d'interaction.

3.3. Les études *in silico* : des informations conformationnelles et énergétiques

Des études par dynamique moléculaire sur des XGOs suggèrent que, pour se lier à la cellulose, les XGs peuvent modifier leur conformation « vrillée » pour adopter une conformation en « ruban plat »¹⁰⁰ (Figure 22).

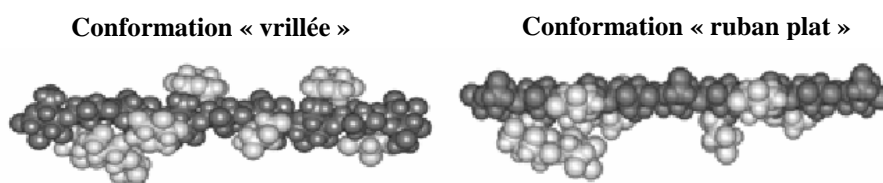


Figure 22 : Conformations « vrillée » et « ruban plat » des XGs

La conformation « vrillée » serait celle des XGs lorsqu'ils sont en solution, qui serait ensuite modifiée en conformation « ruban plat » lors des interactions avec la cellulose

Dans cette conformation, toutes les chaînes latérales sont disposées d'un même côté de l'axe glucosidique principal et la surface exposée du ruban est complémentaire de celle de la cellulose.

Les différents résultats obtenus par modélisation moléculaire concernant l'importance du rôle, direct ou indirect, des chaînes latérales des xyloglucanes, au niveau de ses interactions avec la cellulose, sont contradictoires. La présence de résidus fucosyle et donc nécessairement de chaînes latérales trisaccharidiques, a été, dans un premier temps, démontrée comme un facteur favorisant la conformation « ruban plat » des XGs et donc facilitant leurs interactions avec la cellulose.¹⁰¹ Cependant, des études plus récentes¹⁰² montrent par minimisation enthalpique que les trois XGOs : XXXG, XXLG, XXFG interagissent avec la cellulose et que la capacité d'interaction est sensiblement défavorisée par accroissement de la longueur de la chaîne latérale, contrairement aux conclusions précédentes. Par ailleurs, il semblerait que l'orientation de la chaîne principale du XGO par rapport à la chaîne de cellulose n'ait pas d'influence, ce qui remettrait en question la localisation des interactions au niveau des résidus glucosidiques.

Les analyses *in silico* permettent donc d'obtenir des informations de nature conformationnelle mais également des données d'ordre énergétique sur les interactions.

Cependant, les hypothèses nécessaires à de telles études excluent nécessairement certains paramètres d'influence comme la présence de solvant ou l'existence d'entropie de réaction.

L'utilisation conjointe de ces trois approches, *in vivo*, *in vitro*, *in silico*, a permis d'acquérir un certain nombre de connaissances importantes sur la structure et les interactions du réseau XGs-cellulose présent dans la paroi primaire des cellules végétales. Cependant, bien des aspects sont encore controversés et notamment, la longueur minimale nécessaire pour observer des interactions et l'influence des chaînes latérales, tant au niveau de leur nature que de leur répartition. La construction de XGOs modèles, possédant une structure contrôlée en taille et des chaînes latérales de nature et de répartition bien déterminées, peut être intéressante dans ce cadre. La préparation de tels composés n'est pas envisageable par des voies de synthèse saccharidique classiques car leurs masses molaires sont trop importantes. Par ailleurs, l'obtention de XGOs à partir de XGs par hydrolyse enzymatique contrôlée donne lieu à des fractions de XGOs pour lesquelles le nombre et la répartition des ramifications ne peuvent être déterminés avec précision. Il est donc nécessaire de disposer d'un outil permettant d'envisager la synthèse XGOs, pour lesquels le nombre et la position des ramifications seraient déterminés.

4. Les glycosynthèses : un outil précieux pour les études *in vitro*

4.1. Les β -D-glycoside-hydrolases natives

Ces enzymes catalysent des réactions enzymatiques acido-basiques mettant en jeu deux acides aminés,¹⁰³ un de type acido-basique, exerçant son rôle de donneur de proton, le second de type nucléophile-base. Ces deux acides aminés sont, le plus souvent, des aspartates et/ou des glutamates.¹⁰⁴ Les β -D-glycoside-hydrolases agissent, soit par un mécanisme de rétention de configuration, libérant un produit dont la configuration du carbone anomère est la même que celle du substrat, soit par un mécanisme d'inversion de configuration en libérant un oligosaccharide de configuration anomérique opposée à celle du substrat.¹⁰⁵ Le mécanisme impliqué peut être facilement identifié par RMN du proton, à partir du signal relatif au H-1 de l'extrémité réductrice d'un oligosaccharide de configuration identique, ou opposée, à celle du substrat.

4.1.1. Enzymes agissant avec inversion de configuration

Le mécanisme d'hydrolyse avec inversion de configuration se déroule en une seule étape (Figure 23). L'atome d'oxygène interglycosidique est protoné par le résidu acide/base et le départ de l'aglycone s'accompagne de l'attaque d'une molécule d'eau activée par la base. Cette substitution, dont le mécanisme peut s'apparenter à une substitution nucléophile du deuxième ordre, conduit donc à la formation d'un produit de configuration opposée à celle du substrat initial.

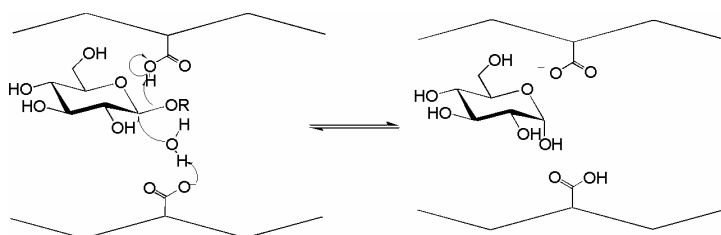


Figure 23 : Mécanisme d'une β -D-glycoside-hydrolase agissant avec inversion de configuration

Les acides aminés impliqués dans ce mécanisme doivent être distants de 1 nm afin que le substrat et une molécule d'eau puissent s'intercaler simultanément entre ces deux groupements catalytiques.

4.1.2. Enzymes agissant avec rétention de configuration

Ce mécanisme met en jeu deux inversions de configuration successives et passe par un intermédiaire réactionnel de type glycosyl-enzyme.

La première étape consiste en la protonation de l'oxygène interglycosidique par le résidu acide/base, en concertation avec le départ de l'aglycone assisté par le nucléophile, conduisant à l'intermédiaire covalent glycosyl-enzyme ¹⁰⁶ (Figure 24). Dans une seconde étape, il peut alors se produire deux types de réaction sur l'intermédiaire covalent : soit il est hydrolysé par une molécule d'eau, soit il subit une réaction de transglycosylation par attaque d'une molécule hydroxylée qui peut être un accepteur saccharidique et générer dans ce cas la formation d'un nouvel oligosaccharide.

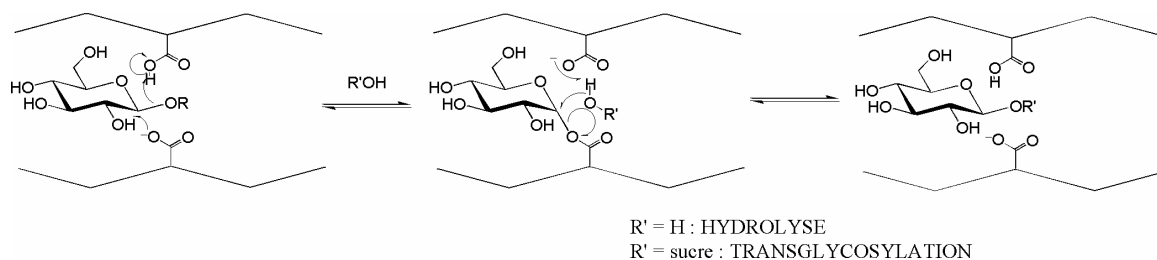


Figure 24 : Mécanisme d'une β -D-glycoside-hydrolase agissant avec rétention de configuration

Cette réactivité peut être utilisée à des fins de synthèse, cet aspect sera développé par la suite (§ 4.2).

Ce mécanisme se déroulant en deux étapes ne nécessite pas la présence simultanée du substrat et d'une molécule d'eau (ou du saccharide accepteur) entre les deux acides aminés impliqués dans la réaction. Dans ce cas, la distance entre eux n'est que de 0,55 nm.

4.1.3. Topologie des sites actifs

Indépendamment de leur mécanisme d'action, les enzymes présentent des sites actifs de topologie différente. Parmi la diversité de repliements des protéines, trois catégories principales de sites actifs peuvent être distinguées¹⁰⁴ (Figure 25).

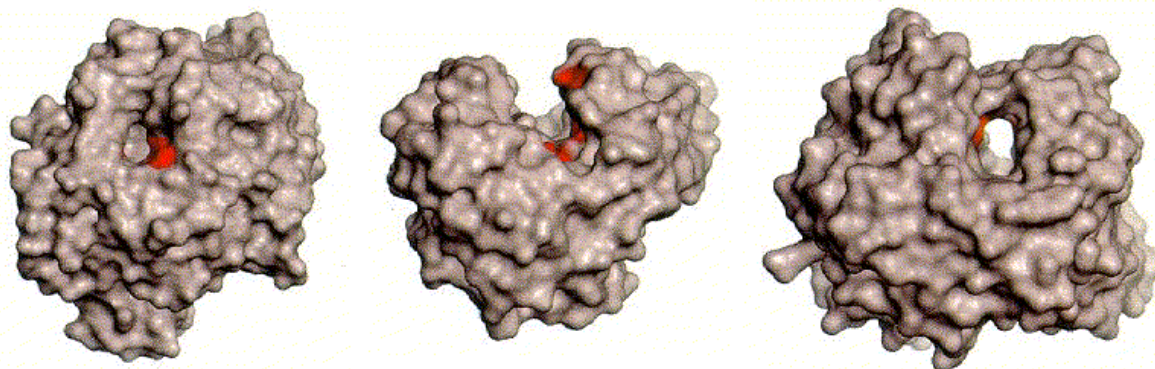


Figure 25 : Trois topologies possibles pour les sites actifs des glycoside-hydrolases

(a) poche, (b) crevasse et (c) tunnel

- Poche : cette topologie est présente chez les *exo*-enzymes, hydrolysant les oligo- et polysaccharides par l'extrémité non réductrice de la chaîne et libérant un

monosaccharide. Le fond de la poche accueille le sous-site donneur -1 et généralement 2 à 4 sous-sites accepteurs.

- Crevasse : c'est une structure ouverte permettant la fixation de plusieurs unités saccharidiques. Elle est présente chez les *endo*-glycoside-hydrolases, qui hydrolysent les chaînes saccharidiques de façon aléatoire. Le site actif est généralement constitué de 2 à 4 sous-sites de part et d'autre du point d'hydrolyse.

- Tunnel : c'est une crevasse couverte par une ou plusieurs boucles. Cette structure est rencontrée chez les enzymes qui hydrolysent les polysaccharides de façon processive. Le site actif est généralement constitué de 2 à 6 sous-sites de part et d'autre du point catalytique.

4.2. Les glycosynthèses

L'obtention d'oligosaccharides avec de bons rendements par synthèse chimique classique est difficile car elle nécessite de nombreuses étapes de protection et d'activation sélectives des différents groupements hydroxyle, pour former la liaison glycosidique. C'est la raison pour laquelle il est intéressant d'envisager ces synthèses par une approche chimio-enzymatique.

L'utilisation de glycoside-hydrolases pour l'obtention de dérivés de disaccharides¹⁰⁷ ou en milieu hydro-organique^{108,109} a, dans un premier temps, permis de synthétiser des oligosaccharides de faible degré de polymérisation (DP). En effet l'utilisation d'un milieu acétonitrile/tampon acétate permet de réduire la proportion d'hydrolyse au profit de la transglycosylation. Cependant, la synthèse de dérivés de degré de polymérisation plus élevé (DP7...) reste difficile car l'oligosaccharide formé a une meilleure affinité pour l'enzyme que le substrat et les produits de transglycosylation sont donc rapidement dégradés. Cette méthode de synthèse enzymatique d'oligosaccharides est donc limitée par l'activité hydrolytique de l'enzyme, qui entraîne la dégradation des produits formés.

En 1998, le concept de glycosynthase a été introduit par Mackenzie *et al.*,¹¹⁰ suite à la mise au point de mutant de glycoside-hydrolase dont l'activité enzymatique avait été modulée

par modification d'un des acides aminés catalytiques. A partir d'une glycoside-hydrolase agissant avec rétention de configuration, l'acide aminé nucléophile est remplacé, par mutagenèse dirigée, par un résidu non nucléophile, ce qui inhibe alors la capacité d'hydrolyse de l'enzyme mais permet de conserver son activité de transglycosylation. Les régio- et stéréosélectivités de ces enzymes sont également conservées. Les substrats utilisés doivent néanmoins être des dérivés α -fluorés afin de mimer l'intermédiaire glycosyle-enzyme nécessaire à la transglycosylation. Le mécanisme de ces glycosynthèses est présenté Figure 26.

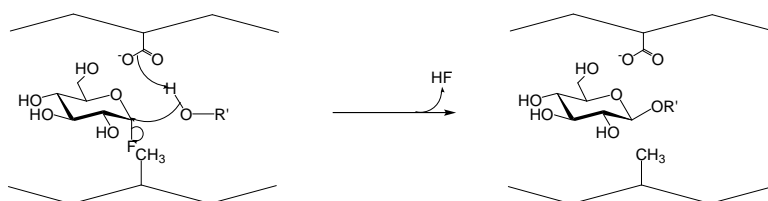


Figure 26 : Mécanisme d'une glycosynthase

La première glycosynthase a été décrite par Mackenzie *et al.*,¹¹⁰ il s'agit d'un mutant de la β -glucosidase d'*Agrobacterium sp.*. Grâce à l'obtention du mutant alanine (Abg E358A), l'activité d'hydrolyse est totalement inhibée et seule persiste l'activité de transglycosylation.

Par la suite, d'autres glycosynthèses ont été obtenues et caractérisées, en particulier la glycosynthase HiCel7B E197A,¹¹¹ dérivée de la cellulase Cel7B de *Humicola insolens*. Différents oligosaccharides^{112,113} notamment des oligosaccharides ramifiés,¹¹¹ ont été obtenus grâce aux propriétés de synthèse particulièrement intéressantes de ce mutant.

Par ailleurs, cette glycosynthase a également été utilisée pour préparer des XGOs à partir de cellobiose et de l'heptasaccharide XXXG, dans le but d'étudier le mécanisme des xyloglucane-*endo*-transglycosylases.^{71,72}

L'utilisation de glycosynthèses, mutants de glycoside-hydrolases, a été jusqu'à présent appliquée et limitée presque exclusivement à un nombre restreint de glycoside-hydrolases hydrolysant les liaisons glycosidiques β -D avec rétention de configuration. L'utilisation de ces mutants permet l'obtention d'oligosaccharides plus facilement que par une succession de réactions de protection et de déprotection et plus efficacement que l'utilisation d'enzymes

natives. Elle requiert cependant l'utilisation de donneurs α -fluorés, qu'il faut synthétiser chimiquement.

4.3. Les α -fluorures de glycosyle : des donneurs pour les glycosynthèses

L'utilisation de glycosynthèses comme outil de synthèse d'oligosaccharides requiert l'utilisation d' α -fluorures de glycosyle. En effet, ceux-ci présentent l'intérêt, outre le fait d'être de bons groupes partants, de mimer par leur conformation et de leur encombrement stérique, l'intermédiaire glycosyl-enzyme indispensable à l'attaque nucléophile de l'oligosaccharide accepteur. Le mutant Cel7B E197A est capable de condenser divers substrats grâce à l'utilisation de fluorures d' α -glycosyle présentant des substitutions différentes (Figure 27).

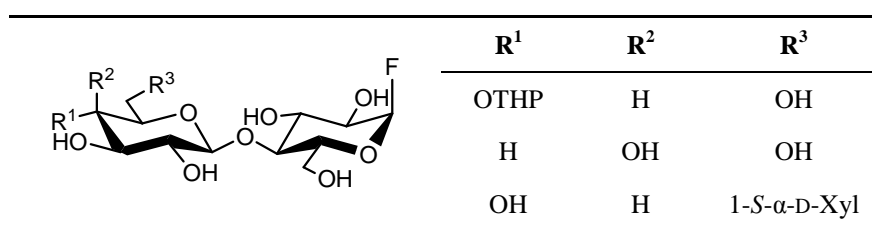


Figure 27 : Utilisation de fluorures d' α -glycosyle comme substrats de la glycosynthase *HiCel7B E197A* pour synthèse d'oligosaccharides liés en β -(1,4) ^{112, 111}

5. Conclusion et objectifs

La paroi primaire des cellules végétales joue un rôle central dans l'expansion cellulaire en raison de son rôle de structure portante de la paroi. Elle permet à la fois le maintien de la morphologie de la cellule et son extension grâce à une structure multi-réseaux complexe. Les assemblages de biopolymères correspondants ont été étudiés depuis de nombreuses années à partir de systèmes modèles divers, apportant chacun des connaissances tant au niveau de leur composition (XGs-cellulose ; XGs-pectines) que de leur organisation au sein de cet assemblage.

Suite à ces travaux antérieurs sur les interactions XGs-cellulose au sein de la paroi primaire, certaines interrogations subsistent sur l'influence d'une part de la structure des XGs et d'autre part de la morphologie de la cellulose. En effet, si les différents auteurs s'accordent sur le fait que, pour des XGOs de faibles masses, l'adsorption augmente avec la masse moléculaire, l'existence d'une masse optimale pour l'adsorption n'est encore aujourd'hui qu'une hypothèse. Par ailleurs, le rôle des substituants est toujours soumis à controverse, qu'il s'agisse des résidus galactosyle ou fucosyle. Enfin, la répartition des chaînes latérales n'a pas été étudiée et en particulier l'existence potentielle de zone présentant des résidus glucosyle non substitués. L'influence de la morphologie de la cellulose, et plus particulièrement l'existence de surfaces préférentielles d'adsorption, est également controversée.

Enfin, les caractéristiques thermodynamiques de ces interactions n'ont été que très peu étudiées,¹¹⁴ en raison de la difficulté de mise en œuvre des moyens d'analyse permettant d'accéder à de telles grandeurs, difficulté liée à l'insolubilité des constituants.

Afin de lever certaines de ces interrogations, des études *in vitro* ont été effectuées. Ces études présentent un intérêt dans la mesure où elles mettent en œuvre des moyens nouveaux, tels que l'utilisation de glycosynthèses ou la possibilité d'obtenir des composites XGs-cellulose de contraste isotopique variable, qui peuvent s'avérer utiles pour l'étude des interactions présentes au sein du réseau XGs-cellulose par RMN ¹³C du solide.

Le chapitre suivant décrira l'obtention de XGOs de structure (taille et degré de substitution) précisément définie, grâce à l'utilisation de glycosynthèses.

Puis, au cours du Chapitre 3, les capacités d'interactions de ces XGOs obtenus chimio-enzymatiquement mais également de XGs natifs d'origines diverses, avec des celluloses de caractéristiques variables seront étudiées grâce à la technique de titration calorimétrique et à la détermination d'isothermes d'adsorption. Enfin, l'obtention de composites XGs-cellulose de contraste isotopique variable permettra une analyse par RMN du solide.

Chapitre 2 :

*Préparation de substrats
xyloglucosidiques par hydrolyses et
synthèses chimio-enzymatiques*

1. Introduction

D'après les travaux antérieurs, bien que de nombreux systèmes modèles aient été étudiés, plusieurs conclusions sont encore aujourd'hui controversées.

Pour tenter de répondre à certaines questions non résolues, comme l'existence d'une taille optimale favorisant les interactions, l'impact de la nature des chaînes latérales ou encore l'influence de leur répartition, la préparation de XGOs de structures variées et bien définies a été réalisée.

Deux approches ont été utilisées pour l'obtention de ces composés : les extractions et les hydrolyses à partir de XGs natifs et la synthèse chimio-enzymatique. Si cette dernière présente l'avantage indiscutable d'aboutir à une structure totalement définie, elle ne permet pas d'obtenir tous types de XGOs, en particulier ceux de tailles relativement importantes, en raison de contraintes expérimentales qui seront abordées ultérieurement. C'est pour cela qu'il apparaît nécessaire dans un premier temps de disposer de XGs et de XGOs issus d'extractions et d'hydrolyses partielles de XGs natifs.

2. Extraction et hydrolyses de XGs d'origines diverses

Deux sources de XGs ont été utilisées pour ces travaux. Les XGs de *Rubus fruticosus*, largement étudiés au CERMAV,¹¹⁵ présentant la particularité d'être fucosylés, et les XGs de réserve de graines de *Tamarindus indica* qui, comme tous les XGs de réserve, ne sont pas fucosylés. Ces derniers sont par ailleurs commerciaux et donc disponibles en quantité importante.

2.1. Les XGs de *Rubus fruticosus*

Les cultures de cellules de *Rubus*¹¹⁶ permettent l'extraction de nombreux polysaccharides pariétaux tels que les galactoglucomannanes,^{117,118} les arabinogalactanes,¹¹⁹ ou encore les XGs.¹²⁰ Ces derniers peuvent être extraits à partir du milieu de culture ou bien par extraction séquentielle des parois. Ceci a donc donné lieu à deux lots de substrat : les XGs de *Rubus* extra-cellulaires (XG_{REC}) et les XGs de *Rubus* pariétaux (XG_{RP}). La

composition des XGs de *Rubus* varie en fonction de la durée de culture¹²⁰ des cellules. Dans le cas présent, ils ont été extraits à partir de cellules de 24 jours de culture.

2.1.1. Les XGs de *Rubus* extra-cellulaires (XG_{REC})

Lors de la culture de cellules de *Rubus*, les XGs qui n'ont pas été fixés par la paroi cellulaire sont excrétés vers le milieu de culture. Cependant, ces composés sont en mélange avec d'autres polysaccharides au sein du milieu extra-cellulaire. Il a donc été nécessaire de procéder à une extraction séquentielle de ces différents polysaccharides.

Dans un premier temps, après élimination des cellules de *Rubus*, les polysaccharides acides, tels que les homogalacturonanes, ont été précipités au moyen d'une solution de sulfate de cuivre.¹²¹ En effet, le Cu^{II} permet de complexer ces polysaccharides, les rendant ainsi insolubles. Puis, les XGs et les arabinogalactanes (AGs) ont été co-précipités à l'éthanol et séparés ensuite au moyen d'une résine échangeuse d'anions. La capacité des AGs à se fixer sur de telles résines a été observée par Aspinall.¹²¹ Les XGs peuvent ainsi être récupérés par simple élution à l'eau. Les AGs peuvent ensuite être décrochés de la résine, si nécessaire, par modification de la force ionique du milieu.

2.1.2. Les XGs de *Rubus* pariétaux (XG_{RP})

Parallèlement à ces extractions à partir du milieu de culture, les XGs peuvent également être extraits directement des parois de cellules de *Rubus*. L'obtention de ces XGs est plus contraignante car elle nécessite l'extraction séquentielle des différents polysaccharides pariétaux, tout en sauvegardant au maximum la structure des XGs.

Dans un premier temps, les pectines sont isolées par complexation à l'éthylène-diamine-tétraacétate de sodium (EDTA), utilisé pour son puissant pouvoir chélatant, suivie de plusieurs étapes d'extraction, notamment à l'oxalate d'ammonium et d'un traitement au borohydrure de sodium. Une faible proportion des hémicelluloses pariétales est solubilisée lors de cette étape, mais la majeure partie des XGs est ensuite extraite par une solution alcaline 2,5 M.

2.1.3. Caractérisations des XG_{REC} et XG_{RP}

Suivant leur localisation et leur mode d'extraction, les XGs de *Rubus* ne possèdent pas les mêmes caractéristiques. Le tableau présenté ci-dessous (Tableau 1) rassemble les données caractéristiques des deux lots de XGs obtenus. L'analyse des oses neutres permet de déterminer la proportion de chacun des oses composant les XGs et la chromatographie d'exclusion stérique d'analyser la masse molaire moyenne et l'indice de polydispersité de la fraction considérée.

	Dosage d'oses neutres				Chromatographie d'exclusion stérique	
	Glc	Xyl	Gal	Fuc	M _w (g.mol ⁻¹)	I _p
XG _{REC}	1,4	1,0	0,4	0,2	30.10 ³	1,5
XG _{RP}	1,3	1,0	0,4	0,3	110.10 ³	4,1

Tableau 1 : Composition en oses neutres et masse molaire moyenne des XG_{REC} et XG_{RP}

Les XG_{RP} ont une masse molaire moyenne près de quatre fois plus importante que celle des XG_{REC}, mais l'indice de polydispersité de cette fraction est beaucoup plus élevé. Par ailleurs, l'analyse d'oses neutres a permis de confirmer une composition similaire pour ces deux lots de XGs. Ainsi, entre ces deux lots de XGs, la masse molaire est la variable la plus importante. En effet, bien que la répartition des chaînes latérales ne soit pas déterminée, il est probable que celle-ci ne soit pas très différente entre ces deux lots de XGs de même origine.

Une autre variable est le degré d'acétylation. Ainsi, les XG_{REC} sont acétylés, contrairement aux XG_{RP} obtenus, comme le montre la présence de signaux caractéristiques à 174 ppm ainsi qu'à 21 ppm en analyse RMN ¹³C (Figure 28).

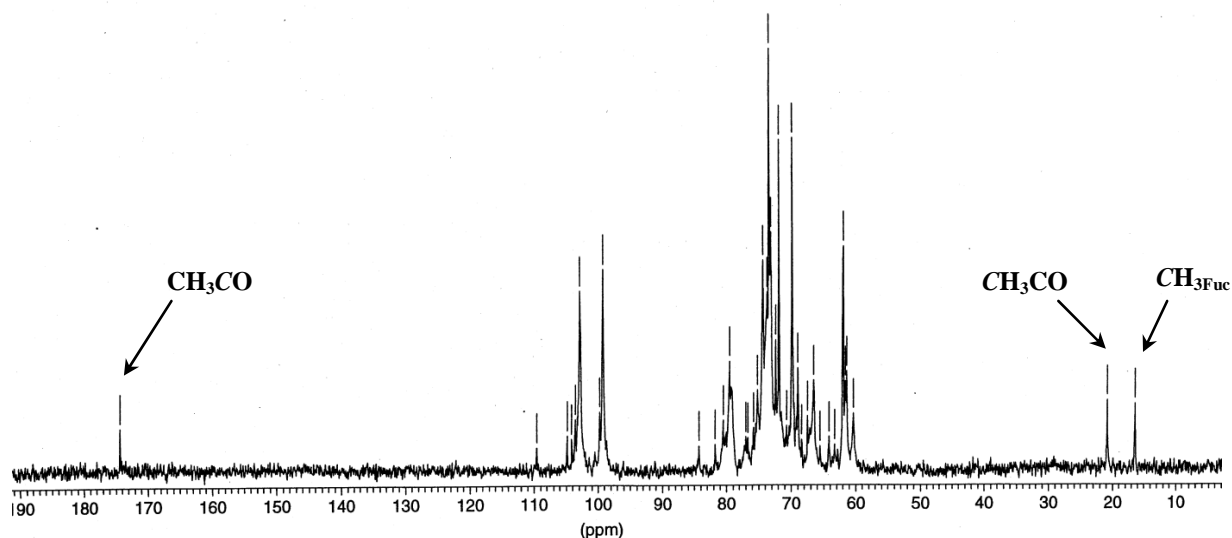


Figure 28 : RMN ^{13}C des XGs de *Rubus* extra-cellulaires (XG_{REC})

Les signaux à 174 ppm et 21 ppm sont respectivement caractéristiques des carbones CO et CH_3 des groupements acétate

Le fait que seuls les XG_{REC} sont acétylés n'est pas la conséquence d'une caractéristique intrinsèque de ce type de XGs, mais est lié au mode d'extraction à partir du milieu de culture par des méthodes n'impliquant pas une désacétylation, contrairement à l'extraction à la soude des XG_{RP} .

La masse molaire est donc la principale différence de structure entre ces deux lots de XGs. Ceux-ci présentent néanmoins deux autres paramètres variables, la proportion de résidus glucosyle substitués ainsi que le degré d'acétylation. Afin d'évaluer l'influence des groupements acétate sur la capacité d'adsorption des XGs indépendamment de toute autre variable structurale une partie des XG_{REC} a été désacétylée.

2.1.4. Désacétylation des XGs de *Rubus*

Le seul résidu saccharidique pouvant être acétylé dans les XGs de *Rubus* est le résidu galactosyle. Le site principal d'acétylation est le C-6, bien que les carbones C-3 et C-4 puissent également porter des groupements acétate. Afin de déterminer l'influence de l'acétylation sur les interactions XGs-cellulose, les XG_{REC} ont été désacétylés en milieu

alcalin. La désacétylation a été contrôlée par analyse RMN par la disparition des signaux à 174 et 21 ppm (Figure 29).

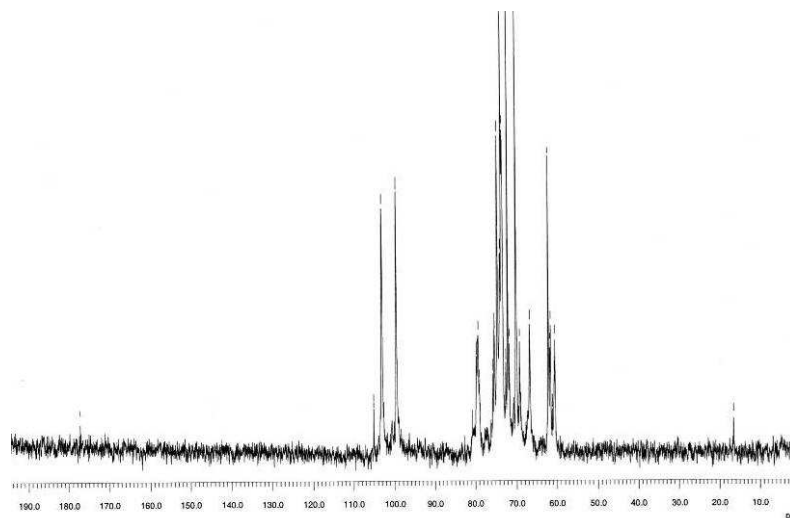


Figure 29 : Spectre RMN ^{13}C des XG_{REC} après désacétylation

Suite à la désacétylation, il est par ailleurs nécessaire de vérifier l'absence de modification, relative à la composition en oses neutres ou la polydispersité (Tableau 2).

	Dosage d'oses neutres				M_w (g.mol $^{-1}$)	I_p
	Glc	Xyl	Gal	Fuc		
$\text{XG}_{\text{REC}}^{\text{dés}}$	2,5	1,0	0,5	0,1	$20 \cdot 10^3$	1,2
XG_{REC}	1,4	1,0	0,4	0,2	$30 \cdot 10^3$	1,5

Tableau 2 : Dosage d'oses neutres et détermination des masses molaires par chromatographie d'exclusion stérique des XG_{REC} avant et après désacétylation

Il semble que le traitement à la soude utilisé lors de la désacétylation ait altéré la structure des XGs. En effet, la masse molaire déterminée par chromatographie d'exclusion stérique est plus faible après désacétylation et la proportion de résidus glucosyle non substitués est plus importante. Ces différences de structure ont été prises en compte lors des études d'interaction impliquant ces XGs avant et après désacétylation.

Les méthodes d'extraction utilisées à partir de cultures de cellules de *Rubus* ont donc permis d'obtenir des XGs naturels présentant des caractéristiques différentes, concernant la

masse molaire, la composition en oses neutres ainsi que le degré d'acétylation. Cependant, de nombreuses caractéristiques structurales varient en fonction de l'origine des XGs utilisés. Hormis la nature et la composition des chaînes latérales, la taille des XGs n'est pas reproductible entre les XGs d'origines différentes. Afin d'étudier spécifiquement l'influence de la taille, la préparation de xylogluco-oligosaccharides (XGOs) de degrés de polymérisation variables peut être effectuée par hydrolyse partielle à partir de XGs de graines de tamarin.

2.2. Xylogluco-oligosaccharides de taille contrôlée issus de XGs de *Tamarindus indica*

Les XGs de tamarin sont les seuls XGs commercialisés.¹²² Plusieurs catégories sont disponibles en fonction de leur solubilité dans l'eau, donc de leur masse molaire et de leur degré de substitution. Ainsi, la catégorie 3A est composée des XGs insolubles à froid mais solubles à chaud. La préparation 3S donne lieu à une solution visqueuse dans l'eau froide alors que les XGs constituant la préparation 3C sont solubles dans l'eau froide et donnent des solutions d'une grande limpidité.

Les catégories 3A et 3S ont été utilisées aux cours de ces travaux. Parmi ces deux lots de XGs, seule la catégorie 3A a été utilisée directement pour les études d'interaction, la catégorie 3S n'a été utilisée que pour des hydrolyses partielles.

Parallèlement à ces XGs commerciaux, des XGs préparés au laboratoire à partir de graines de tamarin préalablement broyées ont également été utilisés. Ils présentent une masse molaire moyenne plus faible que les XGs commerciaux de catégorie 3A (Tableau 3).

XGs de tamarin	M_w (g.mol ⁻¹)	I_p
Catégorie 3A (XG _{T700})	700.10 ³	1,1
Extraits de graines (XG _{T100})	100.10 ³	1,7

Tableau 3 : Détermination des masses molaires moyennes (M_w) et des indices de polydispersité (I_p) des XGs de tamarin utilisés par chromatographie d'exclusion stérique

Deux voies d'obtention ont été utilisées pour produire des XGOs issus de XGs de tamarin commerciaux. Dans les deux cas, les XGs de tamarin sont partiellement hydrolysés puis les différents oligosaccharides obtenus sont purifiés soit par précipitation fractionnée, soit par chromatographie.

2.2.1. Hydrolyse enzymatique partielle de XGs de tamarin et purification par précipitation

Ces préparations ont été réalisées lors de travaux antérieurs.¹²³ Après l'hydrolyse partielle des XGs de tamarin par l'*endo*-glucanase Cel5A, les différents échantillons de XGOs ont été obtenus par précipitation fractionnée dans des mélanges eau/méthanol de proportions variables. En effet, plus la quantité de méthanol dans le précipitant est importante et plus les masses molaires des XGOs précipités sont faibles.

Parmi les fractions ainsi obtenues, deux lots de XGOs ont été utilisés : les XGO_{1/2} et les XGO_{4/3}, précipités dans des mélanges eau/méthanol de proportions 4/3 et 1/2 (v/v) respectivement.

Les masses molaires de ces oligosaccharides, évaluées par spectrométrie de masse et chromatographie d'exclusion stérique sont données dans le Tableau 4.

	Spectrométrie de masse	Chromatographie d'exclusion stérique	
	M _w (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	I _p
XGO _{4/3}	1.10 ³ – 3. 10 ³	1,8.10 ³	6,2
XGO _{1/2}	1.10 ³ – 3. 10 ³	1,7.10 ³	7,9

Tableau 4 : Évaluation des masses molaires des XGO_{4/3} et XGO_{1/2} par spectrométrie de masse et par chromatographie d'exclusion stérique

Les valeurs des masses molaires moyennes de ces deux fractions sont proches et inférieures aux valeurs attendues. Les données issues des deux techniques sont néanmoins convergentes. En effet, les spectres de masse présentent deux massifs, un situé vers 1,2.10³ g.mol⁻¹ et le second vers 2,6.10³ g.mol⁻¹, ce qui est cohérent avec la valeur moyenne d'environ 2.10³ g.mol⁻¹ et l'indice de polydispersité élevé déterminés par chromatographie d'exclusion.

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI a permis d'observer la présence de pics identiques pour les deux lots d'oligosaccharides. Il s'agit des pics représentatifs des XGOs possédant 4 et 8 résidus glucosyle sur leur chaîne principale. Les spectres de masse de ces composés sont présentés en Annexe 6.

La méthode de précipitation fractionnée utilisée n'a pas permis d'obtenir plusieurs fractions de XGOs de masses molaires suffisamment différentes. Par ailleurs, la polydispersité des fractions est très importante. Cette méthode est cependant facile à mettre en œuvre et permet l'obtention de quantité importante de XGOs. Ainsi, les fractions de masses $2 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ ont été utilisées pour les études d'interaction nécessitant d'importantes quantités de substrat.

Il a donc été nécessaire de développer une autre méthode permettant l'obtention de XGOs de tailles suffisamment différentes et de faible polydispersité.

2.2.2. Hydrolyse enzymatique partielle de XGs de tamarin et purification par chromatographie

L'utilisation de la cellulase de *Trichoderma reesei* dans des conditions contrôlées permet d'obtenir des XGOs de masses molaires variables. Malgré une activité résiduelle isoprimevérase, les sites privilégiés de cette cellulase sont situés entre les résidus glucosyle non substitués et le motif isoprimevérose adjacent (Figure 30). Les appellations relatives au degré de polymérisation (DP) sont mentionnées sur la Figure 30 uniquement à titre indicatif car cette dénomination est couramment utilisée pour les XGOs. Néanmoins, celle-ci tient compte des résidus saccharidiques portés par les chaînes latérales, ce qui ne correspond donc plus à un réel degré de polymérisation et peut créer une certaine confusion. Cette nomenclature sera donc autant que possible évitée par la suite au profit de la nomenclature développée par Fry *et al.*⁵⁰

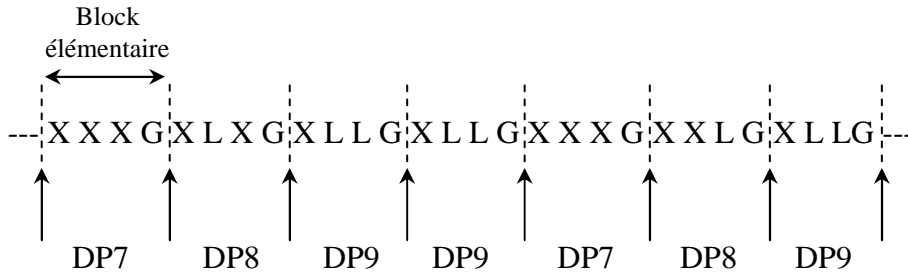


Figure 30 : Sites d'hydrolyse privilégiés des cellulases sur les XGs de tamarin

La cellulase de *Trichoderma reesei* n'ayant aucune activité d'hydrolyse envers les résidus xylosyle ou galactosyle, les chaînes latérales des XGOs de masses variables ainsi préparés sont de nature et de proportions similaires à celles des XGs natifs.

La purification de XGOs de différentes tailles a été effectuée, dans un premier temps, grâce à l'utilisation de la technique d'ultrafiltration. En effet, si la solution d'hydrolyse est introduite dans une cellule d'ultrafiltration possédant une membrane de seuil de coupure $10.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, les XGOs formés, sont évacués du milieu contenant l'enzyme, au fur et à mesure de leur formation. Ceci a permis d'éviter l'obtention exclusive de motifs élémentaires, au profit de XGOs de masses molaires plus élevées. Les différents XGOs extraits ont ensuite été séparés, en fonction de leur masse molaire, par chromatographie sur gel de silice.

Les trois fractions ainsi obtenues ont été analysées par spectrométrie de masse. Les XGOs présents dans la fraction appelée $[\text{XGO}]_1$ sont constitués d'un seul motif élémentaire, soit 4 résidus glucosyle sur leur chaîne principale. Par analogie, les fractions $[\text{XGO}]_2$ et $[\text{XGO}]_3$ sont constituées d'un ensemble de XGOs comportant respectivement 8 et 12 résidus glucosyle sur la chaîne principale et sont ainsi constitués respectivement de 2 et 3 motifs élémentaires. La nature et le nombre des ramifications sont variables. L'analyse par spectrométrie de masse (Figure 31) montre que les deux produits majoritaires de la fraction $[\text{XGO}]_2$ sont les oligosaccharides $\text{G}_2\text{L}_2\text{X}_4$ et $\text{G}_2\text{L}_3\text{X}_3$ (voir nomenclature ci-après). De même, pour la fraction $[\text{XGO}]_3$ les oligosaccharides $\text{G}_3\text{L}_4\text{X}_5$ et $\text{G}_3\text{L}_5\text{X}_4$ sont prépondérants. La fraction $[\text{XGO}]_1$ est, quant à elle, principalement constituée de motifs élémentaires monogalactosylés. Ceci montre donc bien que, quelque soit leur taille, ces trois fractions sont constituées majoritairement de XGOs composés de motifs élémentaires monogalactosylés.

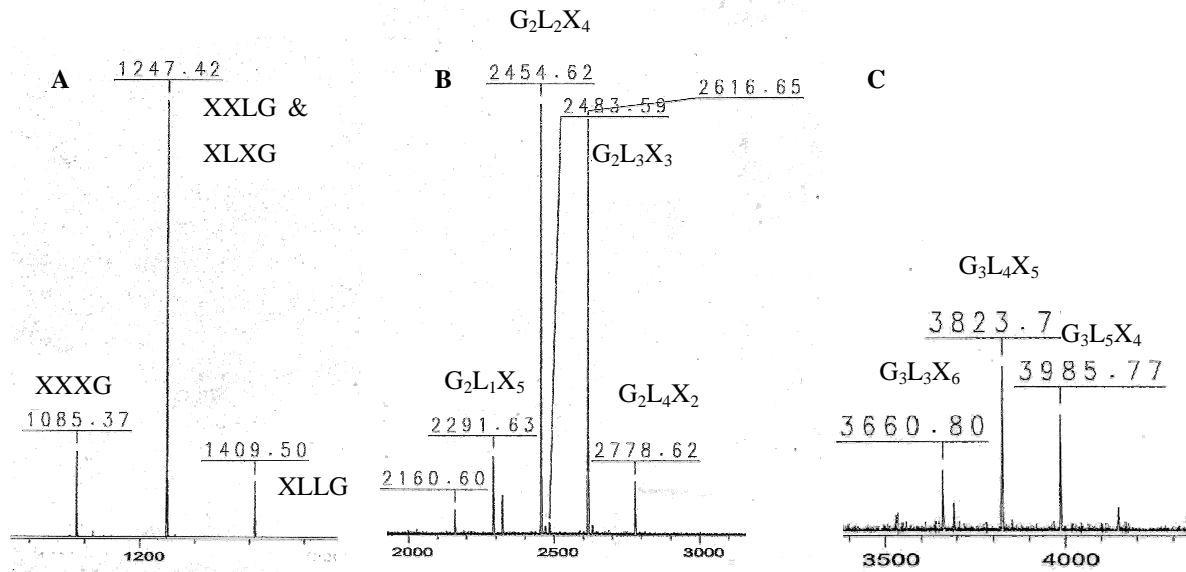


Figure 31 : Spectre de masse des fractions $[XGO]_1$ (A), $[XGO]_2$ (B) et $[XGO]_3$ (C)

Nomenclature : la notation utilisée ici permet de nommer globalement un ensemble d'oligosaccharides comportant les mêmes ramifications mais réparties de manières différentes tout en évitant d'utiliser la nomenclature relative au DP, qui peut, comme cela a été mentionné précédemment, conduire à une certaine confusion. Ainsi, $G_aL_bX_c$ désigne un XGOs comportant a résidu(s) glucosyle non substitué(s), donc a motif(s) élémentaire(s), b résidu(s) glucosyle substitué(s) par une chaîne latérale disaccharidique, constituée d'un résidu xylosyle et d'un résidu galactosyle et c résidu(s) glucosyle substitué(s) uniquement par un résidu xylosyle. Ainsi la notation $G_2L_2X_4$ représente l'ensemble des XGOs suivants : $XXXGXXLG$, $XLLGXXXG$, $XXLGXXLG$, $XLXGXLXG$, $XLXGXXLG$ et $XXLGXLXG$.

Aucune fraction ne contenant des masses supérieures à $4.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ n'a été obtenue, bien que la membrane utilisée ait un seuil de coupure de $10.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Des oligosaccharides de masses plus importantes auraient donc dû, en théorie, être évacués de la cellule avant de subir une hydrolyse plus importante. La difficulté de purification des composés de masses molaires importantes par chromatographie sur gel de silice, pourrait être une explication à l'absence de fraction de taille supérieure. Néanmoins, les quantités de produits obtenues après la chromatographie sont analogues à celles introduites en tête de colonne. Il semble donc que peu voire pas de produit soit resté accroché sur la silice.

Enfin, l'absence de fraction de XGOs de masse molaire supérieure peut aussi découler du temps de contact trop important entre l'enzyme et les poly- et oligosaccharides, qui peut être lié à un débit trop faible lors de l'ultrafiltration, cette explication semble la plus probable.

Une méthodologie permettant d'obtenir des XGOs de taille bien déterminée à partir de XGs naturels a donc été mise au point. Elle s'est avérée efficace pour produire trois fractions de XGOs constituées de 1, 2 ou 3 motif(s) élémentaire(s). La composition des chaînes latérales semble également homogène dans les trois fractions. Malgré leurs tailles relativement restreintes, ces XGOs ont été utilisés par la suite pour des études d'interaction avec la cellulose.

Les XGOs préparés par hydrolyse partielle permettent de disposer d'une gamme de XGOs tailles variables, mais la répartition des chaînes latérales ne peut pas être déterminée. Afin de mieux contrôler la nature et la répartition de ces ramifications, pour déterminer leur impact sur les interactions des XGs avec la cellulose, la synthèse chimio-enzymatique de XGOs peut s'avérer être un outil puissant.

3. Synthèse chimio-enzymatique de XGOs

Les XGs sont généralement constitués de motifs élémentaires xylogluco-oligosaccharidiques, comportant principalement 4 résidus glucosyle sur leur squelette cellulosique, qui se retrouvent le long de la chaîne. Cependant, bien que la nature de ces motifs élémentaires soit déterminée, leur répartition est encore aujourd'hui inconnue, ce qui confère un caractère aléatoire à la répartition des chaînes latérales. L'idée principale, pour l'obtention de XGOs de structure contrôlée, est de « démonter » la structure pour en isoler chacun des motifs élémentaires, puis de ré-assembler des motifs de même nature, ou de nature bien déterminée, afin de maîtriser totalement la structure des XGOs modèles ainsi synthétisés. En ce sens, l'utilisation de glycosynthèses présentées dans le Chapitre 1 (§ 4.2) apparaît comme un outil pertinent.

3.1. Molécules cibles choisies

Les synthèses chimio-enzymatiques ont été effectuées à partir de XGs commerciaux issus de graines de tamarin, dont les quatre motifs élémentaires sont les oligosaccharides : XXXG, XXLG, XLXG et XLLG. Il est possible d'isoler trois de ces oligosaccharides XXXG, XXLG et XLLG par hydrolyses enzymatiques et chromatographie. En conséquence, les oligosaccharides $(XXXG)_n$, $(XXLG)_n$ et $(XLLG)_n$ sont susceptibles d'être obtenus par cette voie.

La synthèse de l'ensemble de ces molécules cibles choisies a été abordée en deux temps : tout d'abord la synthèse des précurseurs α -fluorés, nécessaires à l'utilisation de glycosynthèses, puis l'addition enzymatique des différents oligosaccharides.

Il peut également être envisagé que certains résidus glucosyle des XGs naturels ne soient pas substitués, ce qui pourrait avoir des conséquences importantes sur la capacité d'interaction en raison de la similitude structurale entre la cellulose et la chaîne principale des XGs alors facilement accessible. Afin d'étudier une éventuelle influence de la présence de zones non substituées, le composé ci-dessous (Figure 32) a été synthétisé.

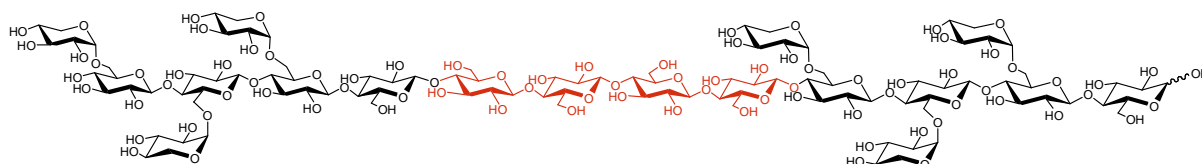


Figure 32 : XXXGGGGXXXG (**45**), XGO présentant une zone non substituée

Un paragraphe a donc été consacré à la « construction » de ce xyloglucosaccharide **45**.

3.2. Synthèse de XGOs à partir des motifs élémentaires de XGs de tamarin

3.2.1. Obtention des motifs élémentaires des XGs de tamarin

Afin de pouvoir synthétiser les différents oligosaccharides, il est nécessaire d'obtenir les quatre oligosaccharides de base. Les xyloglucanes de graines de tamarin qui sont des xyloglucanes de réserve non fucosylés, comportent essentiellement les quatre motifs élémentaires suivants (Figure 33).

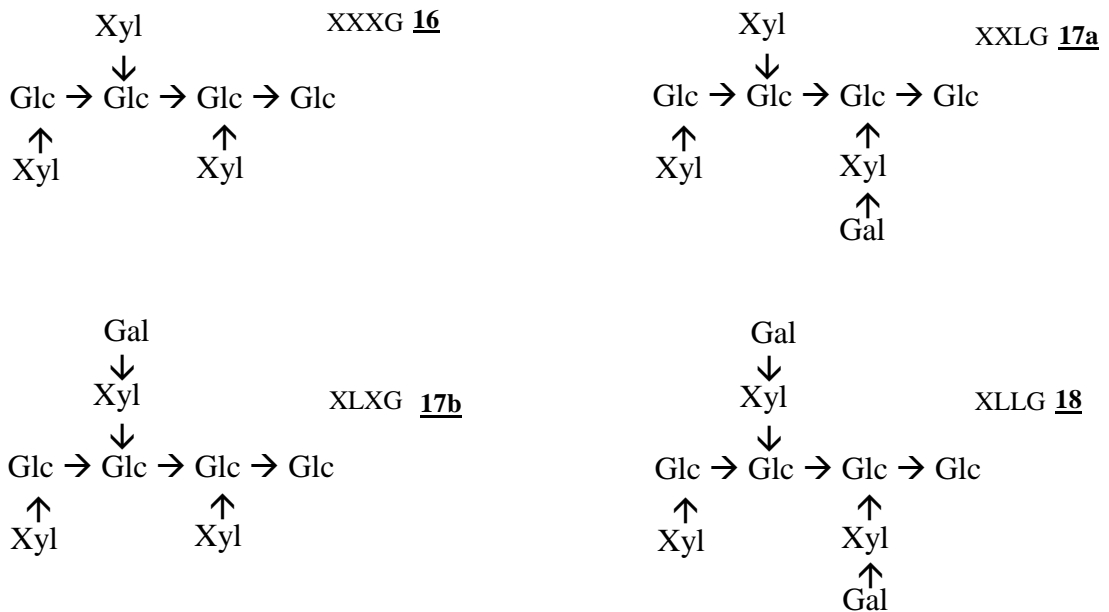


Figure 33 : Les quatre motifs élémentaires constitutifs des XGs de tamarin

Ces oligosaccharides sont obtenus par hydrolyse contrôlée de XGs de tamarin soit en utilisant uniquement une cellulase, soit en complétant l'action de celle-ci par l'utilisation d'une β -D-galactosidase.

L'utilisation des cellulases 3042A de Genencor et celle de *Trichoderma reesei* de Megazyme a permis d'obtenir les monomères XXXG (7 % w/w) et XLLG (37 % w/w) après purification par chromatographie sur gel de silice des oligosaccharides peracétylés correspondants. Cependant, les deux monomères monogalactosylés (XXLG et XLXG) n'ont

pas pu être séparés par cette technique, du fait de leur similitude de structure qui conduit à un niveau d'élution identique.

Il est néanmoins possible d'obtenir un motif élémentaire monogalactosylé à partir de XGs de tamarin, par l'utilisation successive de deux enzymes, la cellulase utilisée précédemment puis une β -D-galactosidase, qui, dans des conditions contrôlées, hydrolyse spécifiquement le résidu galactosyle pénultième.¹²⁴ Ainsi, l'action d'une β -D-galactosidase sur le mélange des motifs élémentaires, XXXG, XLXG, XLXG et XLLG, obtenu après hydrolyse par la cellulase, conduit à l'hydrolyse des dérivés XLLG et XLXG pour donner respectivement XXLG et XXXG, qui sont alors les deux seuls oligosaccharides présents dans le milieu, ce qui facilite d'autant plus la purification.

Deux β -D-galactosidases ont été testées :

- β -D-galactosidase 3042B (Genencor)
- β -D-galactosidase d'*Aspergillus niger* (Mégazyme)

La β -D-galactosidase 3042B a été testée avec deux concentrations différentes d'enzyme. Les données sont rassemblées dans le Tableau 5.

	Conditions 1	Conditions 2	Conditions 3
Solution de XG de tamarin (2 mg.ml⁻¹)	250 ml	250 ml	250 ml
Préparation commerciale de cellulase 3042A	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml
Préparation commerciale de galactosidase 3042B	0,25 ml	25 μ l	-
Galactosidase d'<i>Aspergillus niger</i> (1,2 mg.μl⁻¹)	-	-	62 μ l
Acide acétique (50 % v/v)	-	-	200 μ l
Rendement massique en XXLG	48 %	50 % env.*	45 %

Tableau 5 : Conditions d'utilisation des β -D-galactosidases 3042B et d'*Aspergillus niger* pour l'obtention de l'oligosaccharide XXLG

* évaluation du rendement par CCM

Sur ces essais en faibles quantités, les deux β -D-galactosidases ont conduits à des rendements comparables (Tableau 5 Conditions 1 & 3). Dans ces deux cas, l'action de la β -D-

galactosidase a permis d'observer la disparition de XLLG et l'augmentation des proportions de dérivés mono- et non galactosylés. Une quantité d'enzyme plus importante dans le cas de la préparation commerciale 3042B (Tableau 5 Conditions 2) n'a pas montré de différence par analyse CCM par rapport à l'essai utilisant 100 fois moins d'enzyme. C'est la raison pour laquelle le produit issu de cet essai en faible quantité n'a pas été purifié. Les deux enzymes possèdent une activité cellulase résiduelle mais les proportions d'oligosaccharides de masses molaires plus faibles formés semblent, par évaluation sur CCM, négligeables et similaires pour les deux enzymes. Par ailleurs, seule la β -D-galactosidase d'*Aspergillus niger* est actuellement commercialisée. Ainsi, cette enzyme sera utilisée par la suite, sur des quantités de produit plus importantes.

Ainsi, l'utilisation de la cellulase combinée à l'action de la β -D-galactosidase d'*Aspergillus niger* sur les XGs de tamarin a permis après peracétylation et purification par chromatographie sur gel de silice, d'obtenir le composé XXLG peracétylé avec un rendement de 45 % (w/w) par rapport aux XGs de tamarin.

Il est à noter que l'utilisation de cette β -D-galactosidase dans des conditions plus sévères (proportions d'enzyme plus importantes, temps plus long, température plus élevée), peut amener à la dégalactosylation totale des XGOs. Il est donc primordial de respecter les conditions d'hydrolyse partielle et de contrôler rigoureusement l'état d'avancement de la réaction.

Cette capacité de dégalactosylation totale a parallèlement été utilisée pour obtenir le produit non galactosylé (XXXG) à partir des XGs de tamarin. En effet, si lors de l'hydrolyse par une cellulase, ce composé peut être isolé de la même manière que les autres motifs élémentaires, l'utilisation combinée d'une cellulase et de cette β -D-galactosidase permet d'améliorer considérablement le rendement. Ainsi, après peracétylation et purification par chromatographie sur gel de silice, le composé XXXG peracétylé est obtenu avec un rendement de 26 % contre 3 % en l'absence de dégalactosylation, en raison de la faible quantité de ce motif élémentaire au sein des XGs de tamarin natifs (13 %).

Suite à ces étapes d'hydrolyse, trois motifs élémentaires ont pu être préparés à l'échelle de plusieurs grammes : XXXG, XXLG et XLLG. Afin de réaliser des synthèses enzymatiques à partir de ces composés, il a été nécessaire de synthétiser par voie chimique les

fluorures d' α -glucosyle correspondants, pour qu'ils puissent être reconnus comme donneurs par des glycosynthases.

3.2.2. Synthèse des fluorures d' α -glycosyle

La synthèse des fluorures d' α -glycosyle par voie chimique a été réalisée en cinq étapes à partir des oligosaccharides XXXG, XXLG et XLLG, obtenus précédemment par hydrolyse enzymatique.

Les deux premières étapes ont permis de libérer sélectivement le carbone anomère. Il s'agit d'une peracétylation et d'une déprotection anomère (Schéma 1), permettant par la suite de fonctionnaliser uniquement le carbone anomère.

XYLOGLUCANES

DE TAMARIN

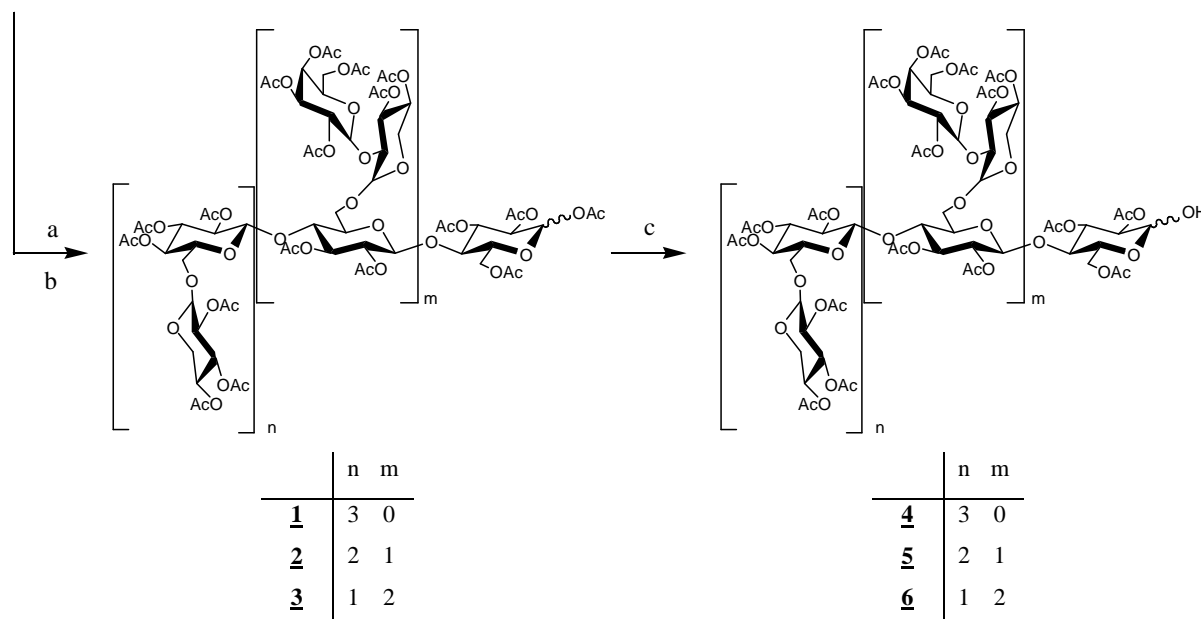


Schéma 1 : Acétylation et déprotection anomère des différents XGOs

a) Cellulase 3042A, 37°C, β -D-galactosidase d'*Aspergillus niger** ; b) Pyridine, Ac₂O, DMAP, T_A ; c) Acétate d'hydrazine, DMF, 50 °C

* la β -D-galactosidase d'*Aspergillus niger* est utilisée uniquement pour la préparation des composés 1 à 60 °C et 2 à 25 °C

Les différents oligosaccharides ont été acétylés en mélange directement après hydrolyse enzymatique. Les composés **1**, **2** et **3** ont été obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice avec des rendements variables en fonction des conditions d'hydrolyse enzymatique, avec ou sans dégalactosylation, partielle ou totale. Dans les conditions optimales spécifiques à chacun des trois produits les rendements ont été de 40 %, 48 % et 37 % pour les composés **1**, **2** et **3** respectivement. Ces rendements sont des rendements massiques car ils sont calculés par rapport aux XGs de tamarin. Les étapes ultérieures ont été ensuite effectuées sur chacun des XGOs séparément.

L'analyse RMN de ces composés indique la présence d'un mélange de composés α - et β -acétylés. En effet, les spectres font apparaître deux doublets, l'un vers 6 ppm, possédant une faible constante de couplage (3,7 Hz), caractéristique du H-1^{Glc Ia} et l'autre à champ plus fort environ 5,5 ppm présentant une constante de couplage plus importante (8,5 Hz), caractéristique du H-1^{Glc Ib}, les proportions de ces deux isomères sont variables mais le composé de configuration β est dans les trois cas majoritaire. Les spectres RMN du composé **3** sont présentés en Annexe 7.

L'étape de déprotection anomère utilisant l'acétate d'hydrazine¹²⁵ a, dans certains cas, conduit à une double déprotection. Ceci a engendré deux inconvénients majeurs, d'une part la diminution du rendement de la réaction et d'autre part une grande difficulté de purification, en raison de la similitude de structure des composés mono- et dihydroxylés.

Des modifications des conditions expérimentales ont donc été effectuées pour tenter d'améliorer la sélectivité. Une diminution de la température de 50 °C jusqu'à la température ambiante a été testée pour diminuer la vitesse de réaction car l'acétate anomère, plus réactif, est désacétylé en premier. Cependant, dans ces conditions, l'acétate d'hydrazine n'est pas soluble dans le DMF, qui a été déterminé comme le meilleur solvant pour cette réaction lors des travaux antérieurs.¹²⁵ Par ailleurs, la quantité d'acétate d'hydrazine a également été modifiée. Il apparaît alors que ce réactif doit être en excès mais il est nécessaire de ne pas excéder deux équivalents afin d'éviter des hydrazinolyses supplémentaires. Par ailleurs, le temps de réaction à 50 °C est relativement court (20 min), ce qui rend difficile le contrôle du taux d'avancement de la réaction et facilite la possibilité de déprotéger deux groupements acétate. Un contrôle rigoureux de l'avancement de la réaction a donc été nécessaire pour minimiser la formation du produit secondaire. Suite à ces essais, les produits **4**, **5** et **6** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 60 %, 99 % et 59 %. La disparité de ces

rendements peut s'expliquer par la difficulté de maîtriser la cinétique de la réaction, car la nature de l'oligosaccharide utilisé ne semble pas avoir d'influence.

L'analyse RMN de ces composés a bien mis en évidence la disparition des signaux caractéristiques des H-1 correspondant aux composés peracétylés et l'apparition d'un triplet à $\delta \approx 5,6$ ppm avec une constante de couplage de 9,7 Hz qui semble caractéristique des composés présentant un groupement hydroxyle sur le carbone anomérique. Les spectres RMN du composé **6** sont présentés en Annexe 8.

Les deux étapes suivantes ont consisté dans un premier temps à introduire le groupement fluorure sur la position anomérique, puis dans un deuxième temps à anomériser le mélange pour obtenir exclusivement le composé de configuration α -D (Schéma 2).

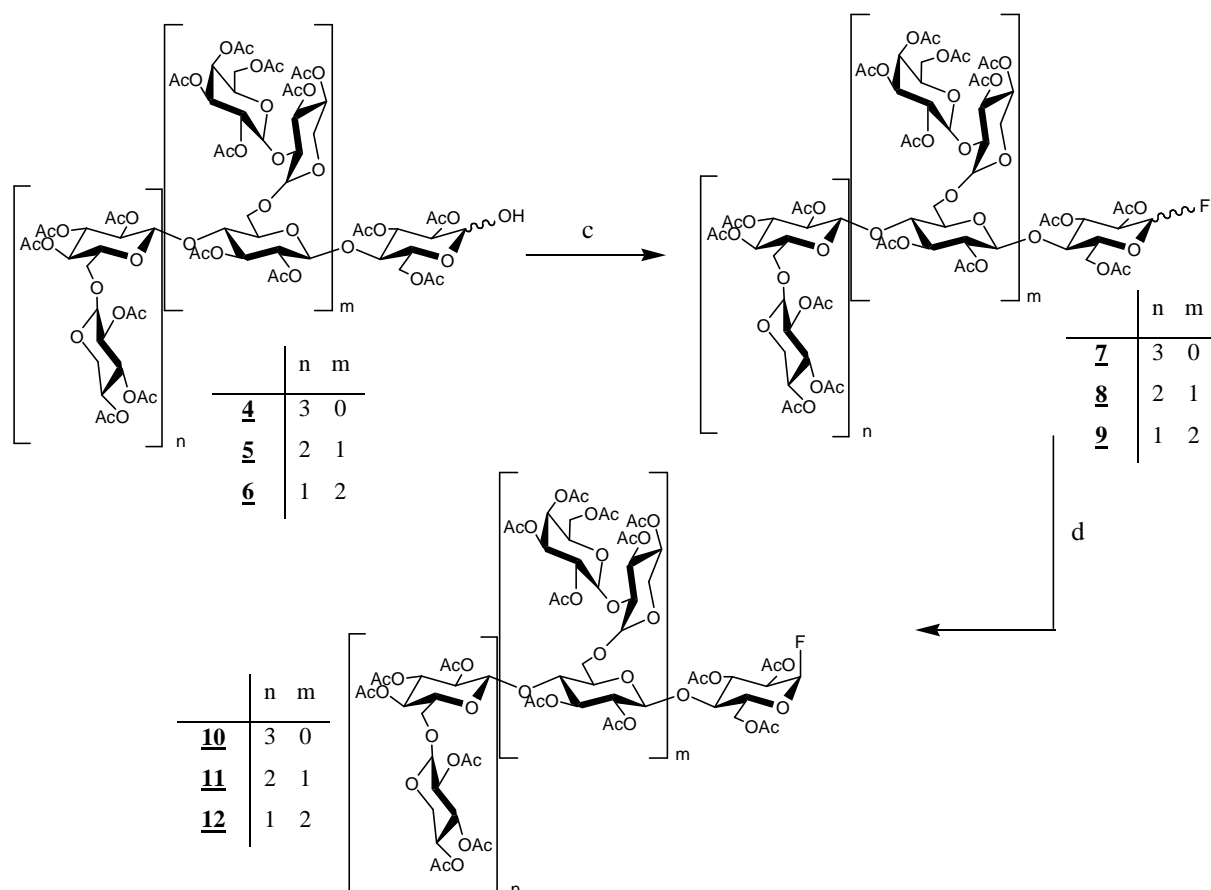


Schéma 2 : Schéma réactionnel des réactions de fluoration et d'anomérisation

c) DAST, CH_2Cl_2 , $-30\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow T_A$; d) HF/pyridine, $-50\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow -20\text{ }^\circ\text{C}$

La fluoration en position anomère des composés **4-6** a été effectuée par l'utilisation du trifluorure de diéthylaminosulfure (DAST), agent de fluoration couramment utilisé en

particulier sur les saccharides.¹²⁶ Cette étape ne présente pas de difficulté particulière et les produits **7**, **8** et **9** ont été obtenus avec de très bons rendements : 88 %, 97 % et 97 % respectivement.

La présence du groupement fluorure a été confirmée par analyse RMN, par dédoublement des signaux caractéristiques des protons H-1^{Glc 1} dû à la présence de l'atome de fluor. En effet, ces protons sont couplés non seulement avec les protons H-2 mais également avec le fluor.

L'étape d'anomérisation est quant à elle une étape délicate. En effet, outre le fait que le β -fluorure n'est pas un donneur vis-à-vis des glycosynthases, une mauvaise anomérisation du dérivé fluoré, a entraîné lors de la désacétylation la formation du β -D-glucoside de méthyle, formé à partir du β -fluorure selon le Schéma 3 :

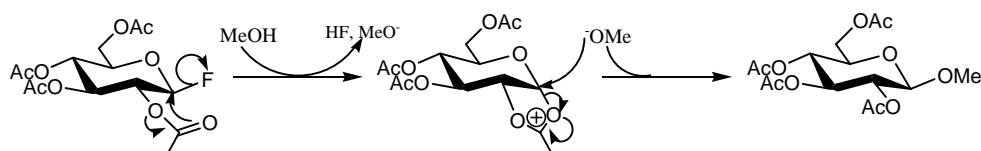


Schéma 3 : Mécanisme de formation du β -D-glucoside de méthyle

Il n'a pas alors été possible de séparer de manière efficace le dérivé α -fluoré du glucoside de méthyle. C'est la raison pour laquelle il est indispensable que la réaction d'anomérisation soit totale. Cependant, l'utilisation de l'acide fluorhydrique rend le suivi de la réaction en temps réel assez difficile. Par ailleurs, sur les produits considérés ici, de masses molaires assez importantes, il est impossible de suivre la réaction par CCM car les dérivés α - et β -fluorés ont le même R_f dans les conditions d'élution qui ont été testées. Les réactions d'anomérisation ont donc été analysées, après traitement du milieu réactionnel, par RMN ¹H et RMN ¹³C. L'anomérisation entraîne la disparition des signaux du composé β -fluoré : C-1^{Glc 1 β} , doublet $\delta \approx 105$ ppm ; $J_{C-\beta F} \approx 217$ Hz, au profit des signaux du composé α -fluoré C-1^{Glc 1 α} , doublet $\delta \approx 104$ ppm ; $J_{C-\beta F} \approx 228$ Hz. Les spectres RMN du composé **12** sont présentés en Annexe 9.

Cette réaction d'anomérisation utilisant l'acide fluorhydrique est décrite dans la littérature¹²⁷ à -50 °C. Si dans la plupart des cas, notamment pour l'obtention des composés **10** et **12**, ces conditions ont permis d'obtenir le composé attendu, certains essais n'ont pas

donné lieu à une anomérisation complète. Le milieu réactionnel a alors été à nouveau engagé dans une réaction similaire mais à 0°C afin d'améliorer la transformation du composé de configuration anomérique β en son homologue de configuration α .

Cette modification a en particulier été apportée pour l'obtention du composé **11**. Ainsi, le signal RMN du H-1 $^{Glc\ \beta}$ a bien disparu au profit du H-1 $^{Glc\ \alpha}$ (Figure 34A) de même pour la RMN ^{13}C (Figure 34B). Par ailleurs, sur le spectre RMN ^{13}C du mélange des deux isomères, certains signaux des carbones anomériques situés dans l'environnement proche du résidu glucosyle de l'extrémité réductrice sont dédoublés en raison de la présence du fluorure sous deux configurations. C'est le cas de deux signaux : C-1 $^{Gal\ II}$ et C-1 $^{Xyl\ II}$. Lorsque le composé est exclusivement de configuration α , ces deux signaux n'apparaissent plus que sous la forme de deux singulets (Figure 34B).

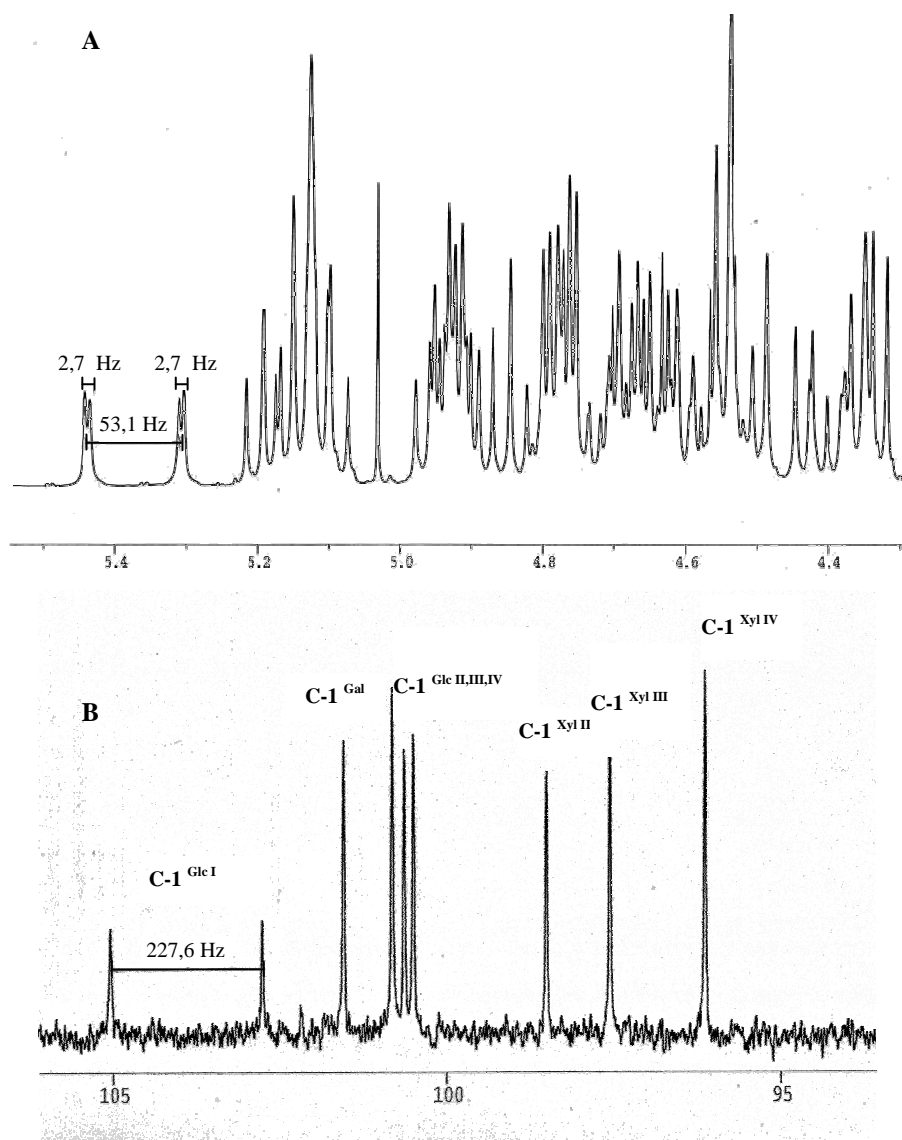


Figure 34 : Spectre RMN 1H (A) et RMN ^{13}C (B) du composé **11**

Malgré ces difficultés, les fluorures d' α -glucosyle **10**, **11** et **12** ont pu être obtenus à partir des composés **7**, **8** et **9** avec des rendements respectifs de 79 %, 53 % et 84 %. L'anomérisation du produit **11**, qui a été faite en deux temps, est probablement à l'origine du faible rendement.

Enfin la dernière étape de ces synthèses de fluorures d' α -glycosyle a été une étape de désacétylation (Schéma 4).

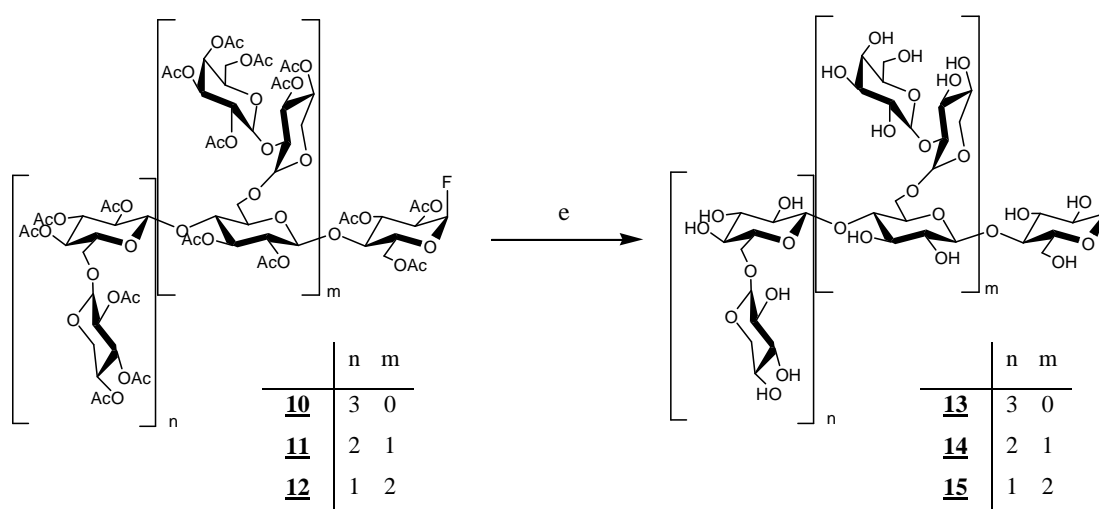


Schéma 4 : Schéma réactionnel de la désacétylation des composés **10-12**

e) (MeO⁻, Na⁺), MeOH, 0 °C

Les fluorures d' α -glycosyle libres **13**, **14** et **15** ont alors été obtenus avec des rendements supérieurs à 90 %. L'analyse RMN de ces composés n'a pas été réalisée en raison du caractère instable du groupement fluorure dans l'eau, seules les analyses par spectrométrie de masse ont été faites.

Cette voie d'obtention des fluorures d' α -glycosyle a donc pu être adaptée sans grandes difficultés aux motifs élémentaires de xyloglucanes de tamarin, qu'ils soient ou non galactosylés. Cependant, les quantités de produits obtenus ont été relativement faibles avec des rendements massiques globaux de 6 à 7 % pour les fluorures d' α -glycosyle libres **13**, **14** et **15** par rapport aux XGs de départ.

Ces xylogluco-oligosaccharides fonctionnalisés ont ensuite été utilisés en tant que donneurs lors de réactions de couplage enzymatique, afin d'obtenir des XGOs de masse

molaire supérieure tout en contrôlant la structure et en particulier la répartition des ramifications.

3.2.3. Tests enzymatiques

Les couplages enzymatiques utilisant une glycosynthase, en l'occurrence le mutant *HiCel7B E197A*, ont déjà été optimisés pour l'obtention de XGOs non galactosylés.⁷¹ Ces travaux ont permis d'obtenir l'oligosaccharide XXXGXXXG **19**. Une quantité moindre du composé XXXGXXXGXXXG **21** a alors été isolée.¹²⁸ Les conditions de couplage ont donc dû être adaptées dans le cas présent, afin d'optimiser la formation du composé XXXGXXXGXXXG **21**. Par ailleurs, il a également été nécessaire d'étudier les conditions d'utilisation de cette glycosynthase vis-à-vis des composés galactosylés.

*Détermination des conditions optimales d'obtention des dérivés **19** et **21***

Dans un premier temps, les conditions décrites par Fauré *et al.*⁷¹ ont été reprises et adaptées en fonction des molécules cibles choisies à savoir : XXXGXXXG **19** et XXXGXXXGXXXG **21**. En effet, bien qu'il soit envisageable d'obtenir des oligosaccharides de tailles supérieures par condensation enzymatique¹²⁸ il paraît difficile a priori de purifier, par des techniques usuelles, des composés de masses molaires si élevées.

Différentes proportions d'accepteur ainsi que différentes concentrations d'enzyme ont été testées, les conditions de ces différents essais sont rassemblées dans le Tableau 6.

Entrée	Donneur	Accepteur	Quantité d'enzyme	Rendement XXXGXXXG 19	Rendement XXXGXXXGXXXG 21
1	XXXG- α F 13 (1 éq.)	XXXG 16 (1 éq.)	2 mg/ml	18 %	13 %
2	XXXG- α F 13 (1 éq.)	XXXG 16 (2 éq.)	2 mg/ml	37 %	15 %

Tableau 6 : Récapitulatif des essais de condensation enzymatique : XXXG- α F + XXXG

La glycosynthase *HiCel7B E197A* a été utilisée dans du tampon carbonate (0,1 M ; pH = 10) à 37 °C

Ces résultats montrent donc que l'augmentation de la proportion d'accepteur conduit à une augmentation de la quantité du tétradecasaccharide XXXGXXXG (entrée 1 et 2). Ceci est

une confirmation de résultats précédemment établis,¹²⁸ montrant qu'en utilisant le composé donneur **13** en auto-condensation, un polymère insoluble est formé alors qu'en présence d'une quantité 5 fois plus importante d'accepteur **16** que de donneur **13**, le composé **19** est majoritairement formé (63 %) au détriment des XGOs de masses molaires supérieures.

Il est important ici d'obtenir le composé **21** avec un rendement satisfaisant car ce composé présente un plus grand intérêt pour l'étude des interactions que le composé **19**. Ainsi, à la suite à ces essais, l'utilisation d'une quantité deux fois plus importante d'accepteur par rapport au donneur semble un bon compromis pour l'obtention des deux XGOs **19** et **21** en quantités suffisantes.

*Tests préliminaires de condensation enzymatique des composés **14** et **17a***

Après avoir mis au point les conditions d'obtention des composés XXXGXXXG et **19** et XXXGXXXGXXXG **21**, les conditions de réaction et notamment les quantités de donneur et d'accepteur ont été optimisées pour l'obtention des produits XXLGXXLG **20** et XXLGXXLGXXLG **22**. Un essai d'auto-condensation et un essai utilisant un mélange équimolaire de donneur et d'accepteur ont été réalisés. Les résultats de ces essais préliminaires sont rassemblés dans le Tableau 7.

Entrée	Donneur	Accepteur	Quantité d'enzyme	Rendement XXLGXXLG 20	Rendement XXLGXXLGXXLG 22
1	XXLG- α F 14	-	2 mg/ml	37 %	9 %
2	XXLG- α F 14 (1 éq.)	XXLG 17a (1 éq.)	4 mg/ml	25 %	16 %

Tableau 7 : Récapitulatif des essais de couplage entre XXLG- α F (14**) et XXLG (**17a**) utilisant la glycosynthase HiCel7B E197A**

Le fluorure **14**, utilisé en auto-condensation, n'a pas conduit à la formation de polymère comme dans le cas du composé non galactosylé **13**, probablement à cause d'une reconnaissance moindre de ce substrat par l'enzyme. Les proportions des XGOs **20** et **22** formés dans ce cas sont très déséquilibrées. L'utilisation d'un mélange équimolaire de donneur et d'accepteur monogalactosylés conduit à la formation des oligosaccharides attendus **20** et **22** avec des proportions du même ordre de grandeur, puisqu'ils sont obtenus avec respectivement 25 % et 16 % de rendement. Ces conditions semblent donc plus adaptées à la

production de ces XGOs en quantités suffisantes pour l'étude des interactions avec la cellulose.

Couplage enzymatique des composés 15 et 18 utilisant la glycosynthase Cel7B E197A

Comme dans le cas des composés monogalactosylés, les conditions de couplage ont été dans un premier temps basées sur les essais antérieurs effectués sur l'heptasaccharide XXXG.

Les résultats des couplages des dérivés digalactosylés, ont été uniquement évalués par CCM, car ces essais, réalisés sur de très faibles quantités de substrat (1-2 mg), n'ont pas été suivis d'une étape de purification. Comme dans le cas précédent, différentes proportions d'accepteur (1 et 2 éq.) et quantité d'enzyme ont été testées. De plus, le pH du milieu a également fait l'objet de modification avec un essai à pH = 7. Les résultats de ces tests préliminaires sont rassemblés dans le Tableau 8.

Entrée	Donneur	Accepteur	Quantité d'enzyme (mg.g _{donneur} ⁻¹)	pH	Temps de réaction	Produits formés*
1	XXXG- α F <u>13</u> (1 éq.)	XXXG <u>16</u> (2 éq.)	43	10	15 h	<u>19</u> et <u>21</u>
2	XXXG- α F <u>13</u>	-	76	10	3j	<u>19</u> et insolubles
3	XLLG- α F <u>15</u> (1 éq.)	XLLG <u>18</u> (2 éq.)	43	10	4 j	-
4	XLLG- α F <u>15</u> (1 éq.)	XLLG <u>18</u> (2 éq.)	487	10	15 h	-
5	XLLG- α F <u>15</u> (1 éq.)	XLLG <u>18</u> (2 éq.)	468	7	15 h	-
6	XLLG- α F <u>15</u>	-	71	10	3 j	-
7	XXXG- α F <u>13</u> (1 éq.)	XLLG <u>18</u> (2 éq.)	61	10	2 j	<u>19</u>
8	XLLG- α F <u>15</u> (1 éq.)	XXXG <u>16</u> (2 éq.)	48	10	2 j	-

Tableau 8 : Essais de couplage enzymatique des dérivés digalactosylés utilisant le mutant Cel7B E197A

La glycosynthase a été utilisée dans du tampon carbonate (0,1 M) à 37 °C

* pour ces tests enzymatiques, la formation d'éventuels produits est uniquement évaluée par CCM

Dans les conditions similaires à l'essai de référence (entrée 1) et malgré une quantité plus importante d'enzyme, le fluorure du nonasaccharide digalactosylé 15 n'a donné aucun produit de réaction (entrée 3). Une quantité d'enzyme 10 fois plus importante (entrée 4) ou une diminution du pH (entrée 5) n'ont pas permis pas d'accéder aux produits attendus. Le

fluorure **15** a été alors testé en auto-condensation (entrée 6). Ces conditions, qui, dans le cas des dérivés non galactosylés, conduisent à la formation de produits insolubles (entrée 2), n'ont généré la formation d'aucun produit de réaction.

Sachant que les composés non galactosylés **13** et **16** sont respectivement donneur et accepteur vis-à-vis de la glycosynthase Cel7B E197A, des essais de couplage entre des produits non galactosylés et digalactosylés ont été effectués (entrée 7 et 8) afin de savoir lequel des caractères donneur ou accepteur des dérivés digalactosylés est en cause dans l'absence de formation de produit de couplage. Lors de ces essais aucun produit de réaction digalactosylé n'a été observé, ce qui a permis de déterminer que le nonasaccharide n'est ni donneur ni accepteur vis-à-vis de l'enzyme HiCel7B E197A.

L'accès aux dérivés XLLGXLLG et XLLGXLLGXLLG n'est donc pas envisageable par l'utilisation de la cellosynthase HiCel7B E197A. Une autre glycosynthase a donc été testée.

Couplage enzymatique des composés **15** et **18** utilisant la glycosynthase PttXET16A E85A

La xyloglucane-*endo*-transglycosylase de *Populus tremula x tremuloides*, PttXET16A a été cristallisée par Johansson *et al.*¹²⁹ La mutation de l'acide carboxylique nucléophile en alanine donne le mutant PttXET16A E85A,¹³⁰ qui pourrait posséder une activité de glycosynthase. Celle-ci a alors été testée vis-à-vis des dérivés digalactosylés. Les résultats de ces essais sont présentés dans le Tableau 9.

Dans un premier temps, l'auto-condensation du fluorure **15** a donné lieu à la formation de l'octadécasaccharide XLLGXLLG (entrée 1). Cependant, aucun oligosaccharide de taille plus importante ne semble avoir été formé, contrairement à ce qui avait été observé lors de l'auto-condensation du fluorure **13** utilisant le mutant Cel7B E197A. Comme dans le paragraphe précédent, le couplage des dérivés digalactosylés et non galactosylés a été effectué (entrée 2 et 3). Le dérivé **15** a bien été reconnu comme donneur par ce mutant. De même, le dérivé **18** est un accepteur potentiel. En effet, ces deux essais ont permis d'obtenir les dérivés XXXGXLLG et XLLGXXXG, ainsi que les produits correspondant à une auto-condensation de fluorures.

Entrée	Donneur	Accepteur	Quantité d'enzyme (mg.g _{donneur} ⁻¹)	pH	Temps de réaction	Produits formés*
1	XLLG- α F 15	-	10	5,6	6 j	(XLLG) ₂
2	XXXG- α F 13 (1 éq.)	XLLG 18 (2 éq.)	26	5,6	2 j	XXXGXLLG XXXGXXXG
3	XLLG- α F 15 (1 éq.)	XXXG 16 (2 éq.)	20	5,6	2 j	XLLGXXXG XLLGXLLG

Tableau 9 : Essais de couplage enzymatique des dérivés digalactosylés utilisant la glycosynthase *PttXET16A E85A*

La glycosynthase a été utilisée dans du tampon carbonate (0,1 M) à 37 °C

* la formation d'éventuels produits a été analysée par spectrométrie de masse des mélanges réactionnels

Malgré ces essais qualitatifs encourageants, les quantités de produits formés sont extrêmement faibles et les composants majoritaires du milieu après réaction restent néanmoins les substrats de départ. Il n'a donc pas été envisagé d'utiliser cette enzyme pour produire des quantités de produit suffisantes pour une étude des interactions de ces XGOs avec la cellulose, et ce d'autant plus que les quantités de mutant *PttXET16A E85A* disponibles sont relativement faibles. Les XGOs correspondants à (XLLG)_n ne sont donc pour l'instant pas accessibles.

Spécificité de reconnaissance d'enzymes agissant sur les XGs

D'après les essais de condensation enzymatique réalisés avec les différents motifs élémentaires de XGs de tamarin, il apparaît que la spécificité de reconnaissance des deux glycosynthases utilisées soit sensible à la présence de résidus galactosyle.

En effet, l'auto-condensation du fluorure XXXG- α F **13** a donné lieu à la formation de produits insolubles, signe d'une activité enzymatique importante. Or, la même réaction enzymatique utilisant le composé monogalactosylé XXLG- α F **14** a permis d'obtenir le composé XXLGXXLGXXLG mais n'a pas généré la formation de précipité dans le milieu indiquant l'absence de XGOs de masse molaire élevée. Enfin, l'essai auto-condensation du dérivé digalactosylé XLLG- α F **15** n'a donné lieu à aucun produit de couplage ce qui montre une absence de reconnaissance par l'enzyme. Cette observation amène à la conclusion que, dans le cas du monomère digalactosylé, le résidu galactosyle situé sur l'unité glucose

pénultième, constitue un obstacle à la reconnaissance par la cellosynthase, car c'est l'unique différence structurale de ce composé avec l'octasaccharide XXLG.

Cette modification de l'activité enzymatique pourrait s'expliquer par la structure tridimensionnelle des XGOs. En effet, comme il a été mentionné dans la partie bibliographique, le squelette glucosidique de XGs présente la même structure que la cellulose. Les résidus glucosyle sont ainsi orientés de 180 °C les uns par rapport aux autres. Ceci a pour conséquence une orientation des chaînes latérales alternativement de part et d'autre de la chaîne principale (Figure 35).

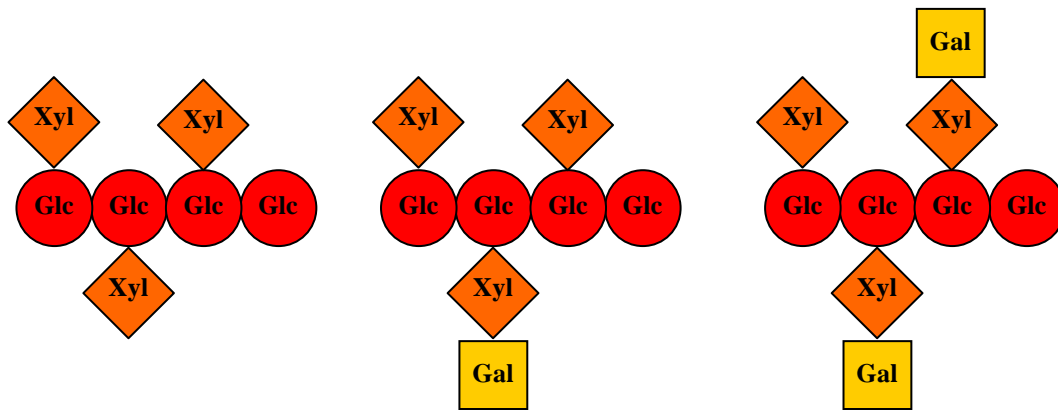


Figure 35 : Représentation schématique de motifs élémentaires de XGs illustrant la position alternée des chaînes latérales par rapport au squelette glucosidique

En conséquence, il est donc possible que la présence de deux chaînes latérales galactosylées portées par deux résidus glucosyle adjacents rendent impossible la fixation du XGO dans le site actif de l'enzyme en raison de son encombrement stérique. Parallèlement, la présence d'une seule ramification sur l'unité antépénultième, qui peut alors se positionner en dehors de la crevasse catalytique, n'empêche pas la fixation de l'oligosaccharide dans le site actif de l'enzyme (Figure 36). L'encombrement stérique est néanmoins plus important qu'en l'absence de résidus galactosyle ce qui pourrait expliquer l'absence de formation de polymère lors des essais d'auto-condensation.

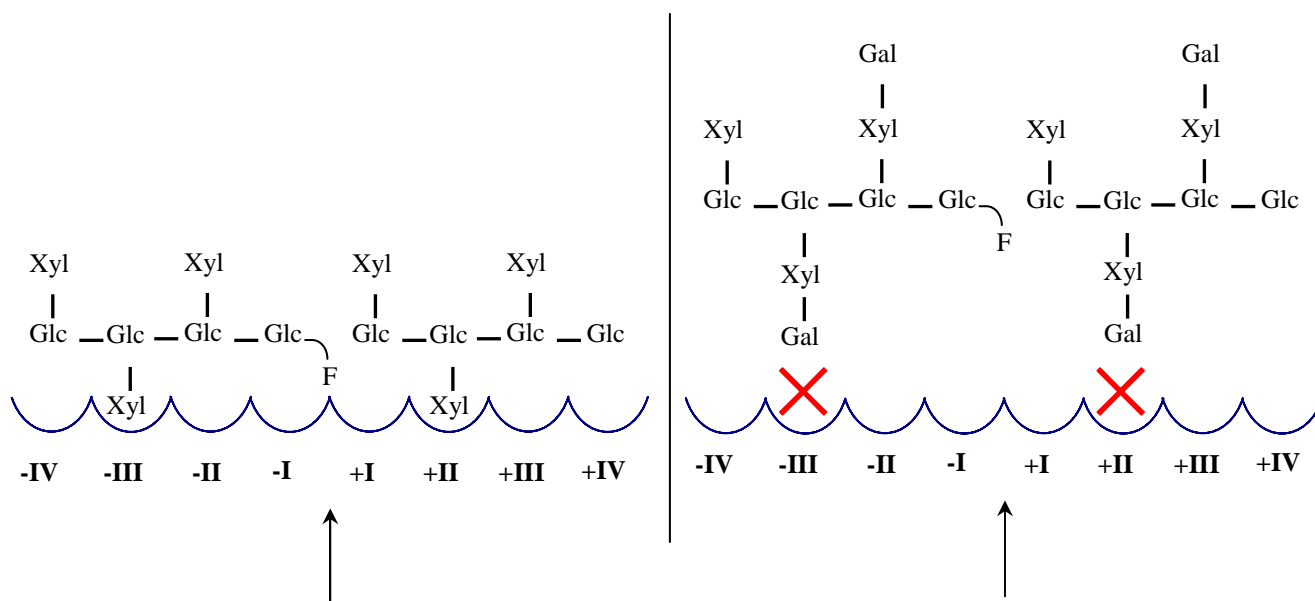


Figure 36 : Représentation de l'effet de structure des XGOs et de leurs dérivés fluorés sur la reconnaissance par l'enzyme *HiCel7B E197A*

Parallèlement, il a été montré (§ 3.2.3) que les dérivés digalactosylés **15** et **18** sont des substrats du mutant E85A de la *PttXET16A* alors qu'ils ne sont ni donneurs ni accepteurs vis-à-vis de la glycosynthase *HiCel7B E197A*. Il semble donc que la présence de deux chaînes latérales disaccharidiques ne soit pas un obstacle à la fixation de tels XGOs dans le site actif de cette enzyme.

Deux autres glycosynthases obtenues à partir de *PttXET16A* ont été testées par Piens *et al.*¹³⁰ par mutation du glutamate, site catalytique nucléophile, non plus en alanine mais en glycine et sérine. Les essais de ces enzymes sur le fluorure du nonasaccharide XLLG préparé précédemment ont montré que, quelque soit la mutation, les résultats sont similaires. Ainsi, dans les trois cas des multimères de type (XLLG)_n ont été obtenus et la différence de réactivité entre ces mutants et la glycosynthase *HiCel7B E197A* a également été confirmée.¹³⁰ Comparativement à l'heptasaccharide XXXG, la cinétique de l'activité enzymatique est différente (Tableau 10). En effet, la valeur du rapport k_{cat}/K_m , caractérisant l'efficacité de l'enzyme, est plus importante dans le cas du donneur non galactosylé. Par rapport à l'enzyme *PttXET16A E85A*, l'activité de l'enzyme *HiCel7B E197A* est plus importante sur le produit non galactosylé, mais celle-ci est nulle dans le cas du produit digalactosylé.

Donneur	Glycosynthase	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ .min ⁻¹)
XXXG- α F (13)	<i>HiCel7B</i> E197A	5,17 \pm 0,41	6,68 \pm 1,06	0,77
XXXG- α F (13)	<i>PttXET16A</i> E85A	1,06 \pm 0,06	1,59 \pm 0,36	0,66
XLLG- α F (15)	<i>PttXET16A</i> E85A	1,44 \pm 0,04	3,78 \pm 0,22	0,38

Tableau 10 : Valeurs des grandeurs cinétiques de catalyse de XXXG- α F (**13**) par *HiCel7B* E197A et XXXG- α F (**13**) et XLLG- α F (**15**) par *PttXET16A* E85A

Malgré ces résultats encourageants, les conditions d'obtention de composés du type (XLLG)_n n'ont, pour l'instant, pas été optimisées pour disposer des quantités de produit nécessaires. Par ailleurs, la faible activité des glycosynthases obtenues à partir de la xyloglucane-*endo*-transglycosylase *PttXET16A* nécessite de disposer de quantités d'enzyme importantes.

3.2.4. Synthèse des XGOs modèles

Suite à la détermination des conditions optimales d'obtention de différentes molécules cibles choisies, la production de ces XGOs a été effectuée sur des quantités de produits suffisantes pour permettre l'étude de leurs interactions avec la cellulose.

Ainsi, les produits XXXGXXXG **19** et XXXGXXXGXXXG **21** ont été obtenus à l'échelle de plusieurs dizaines de milligrammes avec des rendements de 27 % et 21 % respectivement par rapport au fluorure, espèce en défaut, puisque, dans ce cas, l'accepteur a été utilisé en excès (2 éq.).

Les produits XXLGXXLG **20** et XXLGXXLGXXLG **22** ont quant à eux été isolés à l'échelle d'une vingtaine de milligrammes avec des rendements de 25 et 16 % respectivement, toujours par rapport au fluorure. Dans ce cas le donneur et l'accepteur ont été utilisés en mélange équimolaire.

Les quantités de produits disponibles à la suite de ces condensations enzymatiques sont indiquées dans le Tableau 11.

Produit	Quantité obtenue	Rendement *
XXXGXXXG <u>19</u>	52 mg	27 %
XXXGXXXGXXXG <u>21</u>	62 mg	21 %
XXLGXXLG <u>20</u>	20 mg	25 %
XXLGXXLGXXLG <u>22</u>	19 mg	16 %

Tableau 11 : Quantités d'oligosaccharides de structure contrôlée obtenus par voie chimio-enzymatique

* les rendements sont déterminés par rapport à l'espèce en défaut dans le cas présent le fluorure, malgré sa capacité d'hydrolyse non négligeable

Les différents dérivés obtenus ont été purifiés par chromatographie sur gel de silice. Ces purifications ont été complexes et parfois relativement longues en raison des masses molaires importantes des XGOs. L'éluant utilisé lors de ces purifications constitué d'un mélange eau/acétonitrile, a nécessité par la suite une filtration sur filtres Millex 0,45 µm pour retirer la silice entraînée par l'eau contenue dans éluant. Des filtres en PVDF, poly(difluoro-vinylidène), ont été utilisés à la place de filtres en cellulose, plus courant mais sur lesquels les XGOs auraient pu être retenus.

3.3. Xylogluco-oligosaccharides présentant une zone non substituée

3.3.1. Introduction

Bien que l'existence de zones non substituées au sein des XGs n'ait pas été prouvée, l'influence des résidus xylosyle a été étudiée *in vivo* et de tels XGs présentant une déficience en nombre de ramifications ne semble pas générer une altération du phénotype des plantes issues de tels mutants. Par ailleurs, Hayashi *et al.* ont montré que comparativement aux XGOs, les cello-oligosaccharides ont une affinité pour la cellulose plus importante,⁸⁹ probablement en raison de leur similitude de structure.

Ainsi, l'affinité de XGOs présentant une zone non substituée et celle de leurs homologues très substitués vis-à-vis de la cellulose, ont été comparées pour confirmer ces

hypotheses et, en conséquence, situer avec certitude les interactions au niveau du squelette cellulosique des XGs.

3.3.2. Analyse rétrosynthétique pour l'obtention du XXXGGGGGXXXG 45

L'obtention du XGO peut se faire par voie chimio-enzymatique. Cependant, afin d'éviter les réactions d'auto-condensation des fluorures utilisés lors des réactions de couplage, il est nécessaire que ceux-ci soit protégés sur le carbone C-4 de l'extrémité non réductrice.

Ainsi, compte tenu de cette contrainte il est alors possible d'envisager l'obtention du composé 45 par le schéma rétrosynthétique suivant (Schéma 5) :

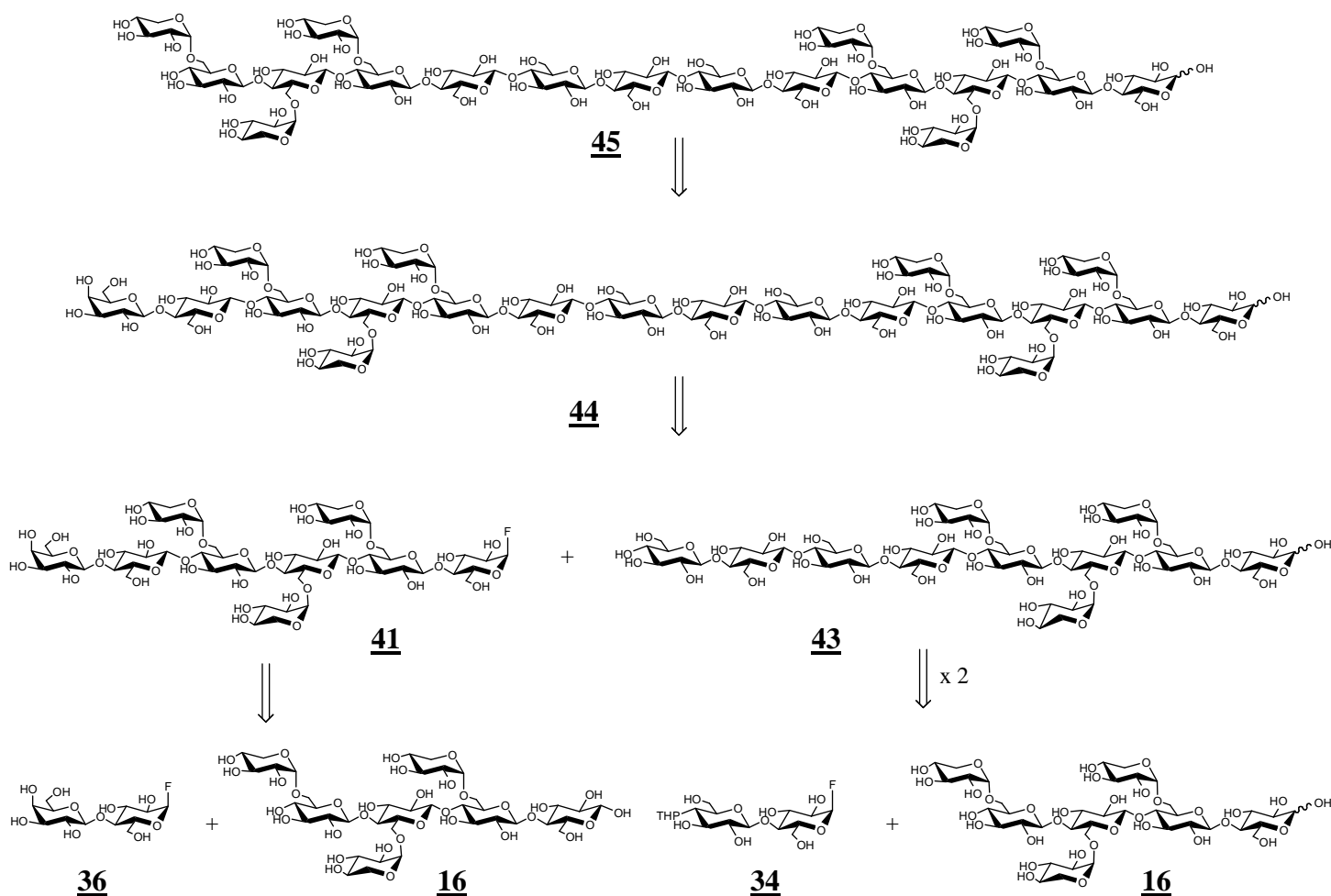


Schéma 5 : Rétrosynthèse pour l'obtention du composé XXXGGGGGXXXG par voie chimio-enzymatique utilisant la glycosynthase *HiCel7B E197A*

D'après cette analyse, le fluorure d' α -lactosyle **36** ainsi que le fluorure d' α -cellobiosyle protégé en position 4ⁱⁱ **34** doivent être synthétisés afin de conduire ensuite aux composés **41** et **43** en utilisant l'heptasaccharide **16** dont l'obtention a été décrite précédemment.

3.3.3. Obtention du LacXXXG- α F **41**

Un motif lactosyle introduit en position 4 sur l'extrémité non réductrice terminale d'oligosaccharides constitue un groupement protecteur.¹³¹ En effet, la présence d'un résidu galactosyle inhibe la reconnaissance des oligosaccharides ainsi protégés comme accepteurs par les cellosynthases, en raison de la position axiale du groupement hydroxyle en position 4 terminale. En outre, la présence d'un tel motif sur un xylogluco-oligosaccharide n'altère pas le caractère donneur de son dérivé fluoré vis-à-vis de la glycosynthase Cel7B E197A de *Humicola insolens*.¹¹¹ Le couplage se fait alors uniquement sur l'oligosaccharide accepteur. Si nécessaire, le motif lactosyle peut ensuite être hydrolysé enzymatiquement grâce notamment à la β -glucosidase d'*Agrobacterium sp.* qui hydrolyse successivement les deux unités du motif lactosyle (Schéma 6).¹³²

L'introduction de ce motif lactosyle sur le XXXG **16** a également été réalisée par voie enzymatique et requiert donc la synthèse préalable du fluorure d' α -lactosyle.

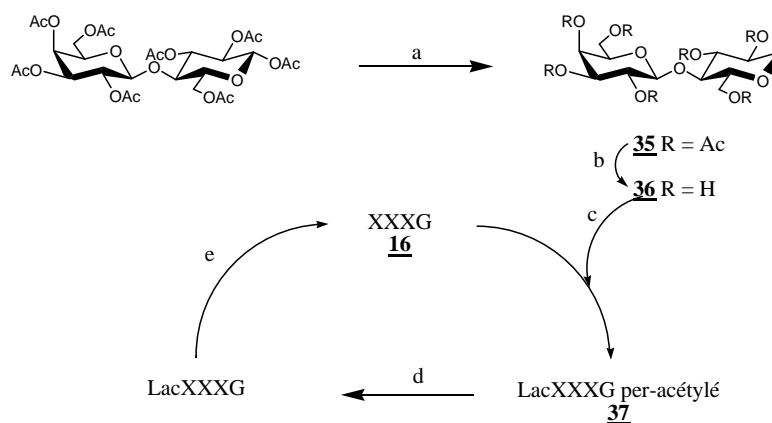


Schéma 6 : Utilisation du motif lactosyle comme groupement protecteur

- a) i : HF/Pyridine, 0 °C ; ii : acétate d'hydrazine, DMF, 50 °C ; b) (MeO⁻,Na⁺), MeOH ; c) i : Cel7B E197A, T_p carbonate (0,1 M ; pH = 10) ; ii : Ac₂O, Pyridine, DMAP ; d) (MeO⁻,Na⁺), MeOH ; e) β -glucosidase d'*Agrobacterium sp.*, T_p phosphate (0,1 M ; pH = 7)

Le lactose peracétylé utilisé était quasi-exclusivement de configuration β , après réaction avec l'acide fluorhydrique,¹³³ le fluorure peracétylé **35**¹³⁴ a été obtenu avec un rendement de 72 %. Afin de faciliter la purification du composé **35**, le produit peracétylé éventuellement restant a été soumis à une déprotection anomérique par traitement du milieu brut réactionnel avec de l'acétate d'hydrazine dans le DMF. Le composé **35** a été caractérisé par spectrométrie de masse et analyse RMN. En RMN ¹H, la présence d'un doublet dédoublé à 5,63 ppm représentant 1 proton avec des constantes de couplage $J_{1,2} = 2,4$ Hz et $J_{H,F} = 53,4$ Hz confirme la présence d'un atome de fluor en position α . En RMN ¹³C, la nature du composé **35** a été confirmée par la présence d'un doublet à 103,9 ppm présentant une constante de couplage de $J_{C,F} = 226,5$ Hz.

Après déprotection, le fluorure de lactosyle **36** a été engagé dans une réaction de couplage enzymatique avec la glycosynthase *HiCel7B E197A*. Sans purification préalable, le mélange a ensuite été peracétylé pour conduire au nonasaccharide **37**.

Afin de pouvoir engager le nonasaccharide LacXXXG dans une réaction de couplage enzymatique comme décrit dans l'analyse rétrosynthétique, il est nécessaire de synthétiser son dérivé α -fluoré.

Le composé **37** peracétylé a donc été désacétylé sur la position anomère. Après un premier essai utilisant l'acétate d'hydrazine, conduisant à de nombreuses déprotections, une autre méthode de déprotection anomère a alors été appliquée sur cet oligosaccharide. Il s'agit d'une désacétylation par une lipase supportée (Schéma 7).

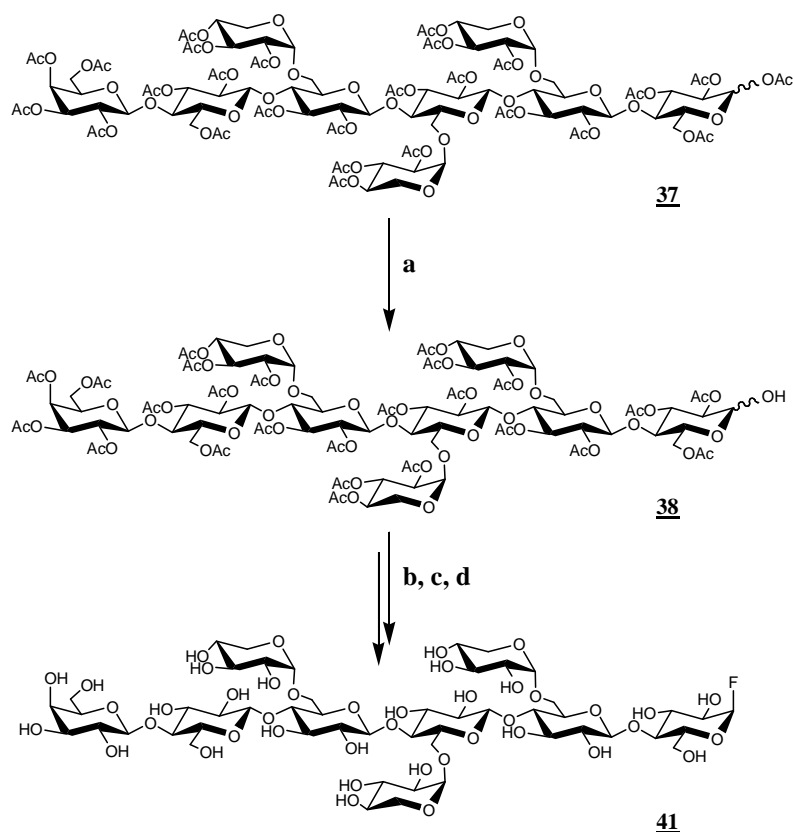


Schéma 7 : Obtention du composé α -fluoré **41**

a) 2-méthyl-2-butanol, lipase supportée Novozyme 435, 50 °C \rightarrow 80 °C ; b) DAST, CH₂Cl₂, -30 °C \rightarrow T_A ; c) HF/pyridine, -50 °C \rightarrow -20 °C ; d) (MeO⁻, Na⁺), MeOH, 0 °C

L'utilisation d'une lipase supportée est une méthode de désacétylation plus douce, or la réactivité du groupement acétate porté par le carbone anomère est plus importante que celle des autres groupements présents, ainsi dans les conditions qui ont été utilisées, seule la position anomère est déprotégée. Cependant la réaction doit être attentivement suivie car un temps de réaction trop long ou une température trop importante pourrait induire la déprotection d'autres positions. Ainsi, la température a été dans un premier temps fixée à 50 °C puis elle a été augmentée jusqu'à 80 °C progressivement pour accélérer la réaction. Un contrôle régulier par CCM a permis de constater la disparition du produit **37** au profit du composé **38** qui a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 82 % contre 51 % par la méthode utilisant l'acétate d'hydrazine. L'analyse RMN du produit **38** montre la disparition du doublet dédoublé à 5,63 ppm et l'apparition d'un triplet à 5,58 ppm.

Les étapes suivantes, qui ont conduit à la formation du fluorure libre **41**, sont identiques à celles précédemment décrites pour l'obtention des produits **13-15** (§ 3.2.2).

3.3.4. Synthèse du fluorure de cellobiosyle protégé en position 4^{II} **34**

Le second précurseur nécessaire à la synthèse du composé **44** est le fluorure de cellobiosyle **34**. Ce composé est un accepteur de la glycosynthase *HiCel7B* E197A, au même titre que le fluorure de cellobiosyle non protégé. Cependant ce dernier, engagé dans une réaction enzymatique avec l'heptasaccharide **16**, ne permettrait pas l'obtention du composé **43** mais donnerait lieu à la formation de cello-oligosaccharides. C'est la raison pour laquelle il a été nécessaire de protéger la position 4^{II} de ce disaccharide. La protection exclusive de cette position par le groupement THP a été réalisée en 11 étapes.^{112,135}

Dans un premier temps, les positions 1^I et 6^I ont été protégées afin de pouvoir par la suite fonctionnaliser la position 6^{II} (Schéma 8).

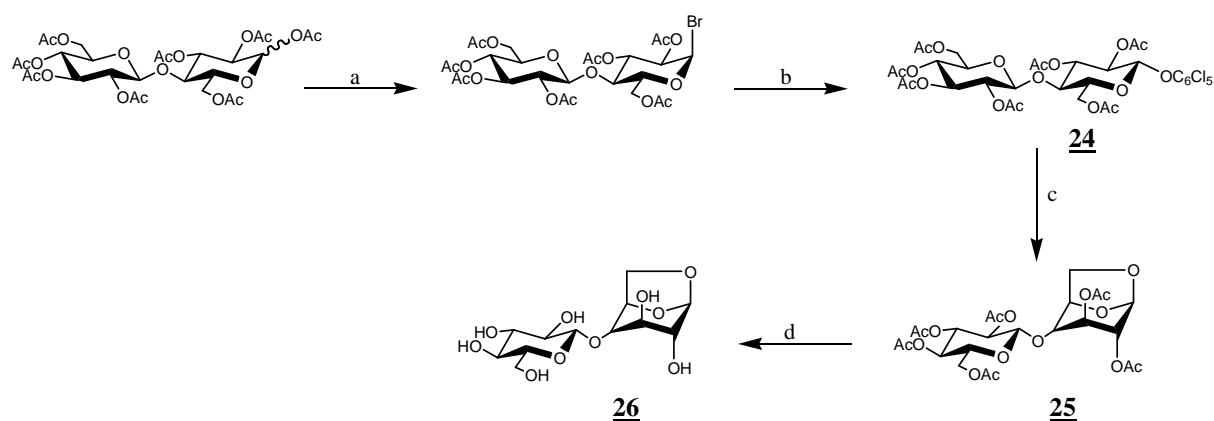


Schéma 8 : Protection des positions 1^I et 6^I du cellobiose

a) HBr/CH₃CO₂H, 0 °C → T_A ; b) (C₆Cl₅O⁻, Na⁺), acétone, 80 °C ; c) i : NaOH ; ii : Ac₂O, pyridine, DMAP, 35 °C ; d) (MeO⁻, Na⁺), MeOH

La bromation en position anomère conduit exclusivement au composé de configuration α -D car c'est le produit thermodynamiquement le plus stable. Le groupement pentachlorophénolate a alors été introduit exclusivement en position β par une réaction de type S_N2. Ces deux réactions ont été faites sans purification intermédiaire et le composé **24** a été obtenu avec un rendement de 67 %. L'apparition de signaux caractéristiques des protons aromatiques ($\delta > 5,2$ ppm) atteste de la nature du produit **24**.

La formation du pont 1,6-anhydro est ensuite effectuée sur le glucose I, qui possède un bon groupement partant en position anomère, avec un rendement de 54 %. Les positions 1^I et 6^I ont ainsi été protégées et la désacétylation quantitative du produit **25**, préalablement

caractérisé en RMN par la disparition des signaux relatifs aux protons et aux carbones aromatiques, a permis de former le composé libre **26**, ne présentant plus de signaux caractéristiques des groupements acétate ($1,97 < \delta \text{ (ppm)} < 2,09$) en RMN ^1H .

Une fois les positions 1^I et 6^I bloquées il a alors été possible de fonctionnaliser spécifiquement les positions 4^{II} et 6^{II} avec des groupements de réactivité différente (Schéma 9)

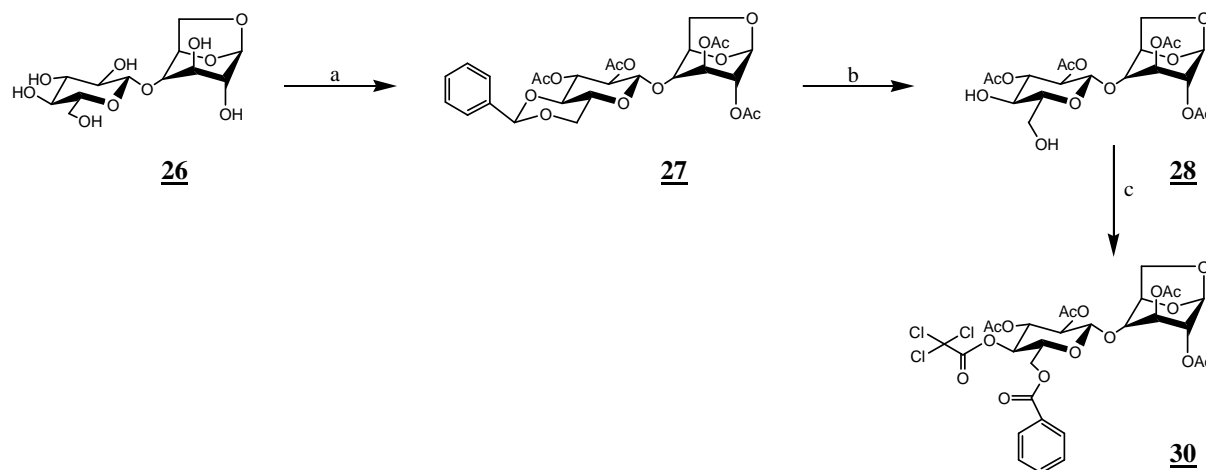


Schéma 9 : Protection des positions 4^{II} et 6^{II} du cellobiosyle par des groupes protecteurs de réactivité différente

a) Benzaldéhyde, ZnCl_2 , T_A ; b) HBF_4 , acétonitrile, T_A ; c) i : 1-(benzoyloxy)-benzotriazole, Et_3N ; ii : TCA, Et_3N , CH_2Cl_2

Afin de protéger spécifiquement les positions 4^{II} et 6^{II}, l'introduction d'un groupement benzylidène a, dans un premier temps, été effectuée. Seuls les hydroxyles en position 4^{II} et 6^{II} sont impliqués dans cette réaction car le cycle ainsi généré est un cycle à 6 atomes donc stabilisé. L'acétylation des positions libres restantes a été faite dans un deuxième temps, directement dans le milieu brut réactionnel, ce qui a permis l'obtention du composé **27**, avec un rendement global de 54 %. La nature de ce produit a été vérifiée en RMN par l'apparition de signaux caractéristiques des protons et des carbones aromatiques ainsi que ceux relatifs aux groupements acétate.

L'hydrolyse spécifique du benzylidène a conduit à la formation du composé **28**, avec un rendement quantitatif. Les hydroxyles 4^{II} et 6^{II} ont pu ensuite être fonctionnalisés.

Tout d'abord, la position 6^{II} a été protégée par un groupement benzoylé. L'utilisation du (benzoyloxy)-benzotriazole a permis, en raison de contrainte stérique, une addition

régiosélective, dont l'efficacité a été contrôlée en RMN par l'apparition des signaux relatifs aux groupements aromatiques et détermination de leurs intégrales.

Puis le trichloroacétate (TCA) a été introduit sur l'hydroxyle restant, formant ainsi le produit **30**.

Ce dernier est caractérisé en RMN. Les signaux des protons H-4^{II} et H-5^{II} sont plus déblindés ($\delta = 5,27$ et $4,13$ ppm) que pour le composé **28** ($\delta = 3,63$ et $3,47$ ppm) en raison des groupements électronégatifs introduits. De plus, la présence de signaux relatifs à des protons aromatiques, $\delta > 7,4$ ppm, confirme la présence du groupement benzoyle. Par ailleurs, plusieurs signaux supplémentaires ont été identifiés en RMN ¹³C dont ceux relatifs aux deux carbones des groupements carbonyles ajoutés ($\delta = 166,0$ et $161,0$).

Le fluorure, puis le tétrahydropyranyle ont ensuite pu être introduits (Schéma 10).

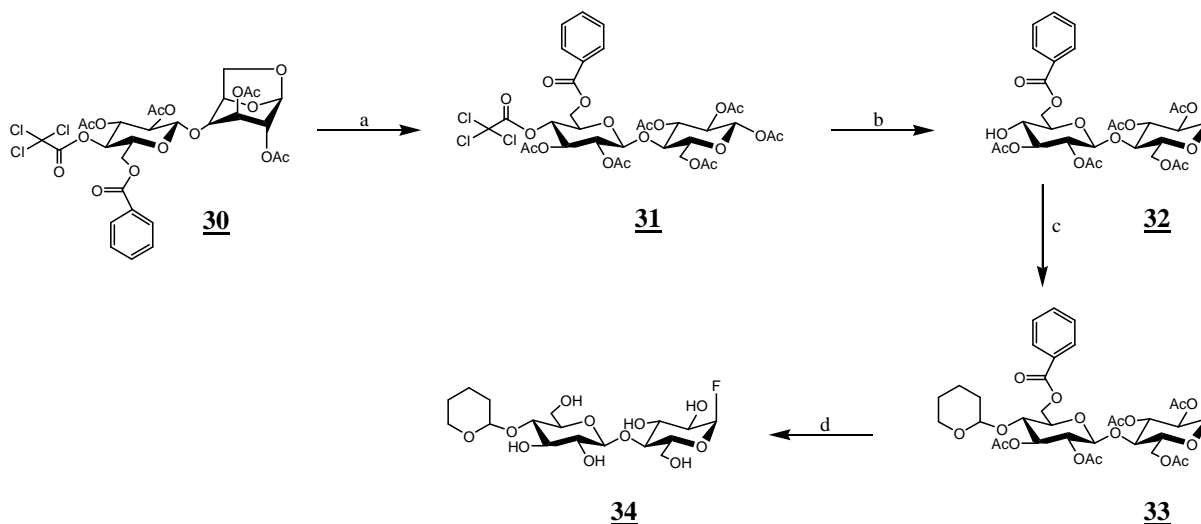


Schéma 10 : Obtention du fluorure d'α-cellobiosyle protégé en position 4^{II}

a) i : Ac₂O, CF₃SO₃Si(C₂H₅)₃ ; ii : HBr ; iii : Ac₂O, AcOH, AcOAg ; b) i : HF/Pyridine, 0 °C ; ii : Et₃N ; c) DHP, acide camphorsulfonique ; d) (MeO⁻, Na⁺), MeOH

L'hydrolyse du pont 1,6-anhydro a permis l'insertion d'un groupement fluorure en position anomère. Celle-ci se fait uniquement en position α car le composé peracétylé **31** a été obtenu préalablement exclusivement en position β, en passant par le dérivé α-bromé.

Par hydrolyse du groupement TCA en milieu basique le composé **32** a été obtenu à partir du composé **31** avec un rendement de 91 %. La configuration du composé **32** a été vérifiée par RMN ¹H. La présence d'un doublet dédoublé à 5,62 ppm caractéristique du proton anomère présentant une petite constante de couplage ($J_{1,2} = 2,4$ Hz) confirme la

configuration α et une constante de couplage plus importante ($J_{H, F} = 53,1$ Hz) est la conséquence de la présence d'un groupement fluorure.

L'ajout du groupement tétrahydropyrane (THP) a été réalisé avec un rendement 95 % et une désacétylation quantitative conduit au composé **34** attendu, caractérisé uniquement en spectrométrie de masse en raison de l'instabilité du groupement halogène et de la formation de deux diastéréoisomères induite par l'introduction du groupement THP.

L'ensemble des précurseurs nécessaires à la « construction » enzymatique du XGO comportant une zone non substituée a ainsi été obtenu.

3.3.5. Utilisation de la glycosynthase *HiCel7B E197A* pour l'obtention du produit **44**

Comme mentionné précédemment dans l'étude rétrosynthétique du composé **44**, ce dernier peut être obtenu par des condensations enzymatiques successives grâce à l'utilisation de la glycosynthase *HiCel7B E197A* avec les précurseurs dont les synthèses viennent d'être décrites.⁵⁶

Le fluorure de cellobiosyle protégé en position 4^H permet d'ajouter des motifs cellobiosyles de façon contrôlée à l'extrémité non réductrice de l'heptasaccharide **16** (Schéma 11).

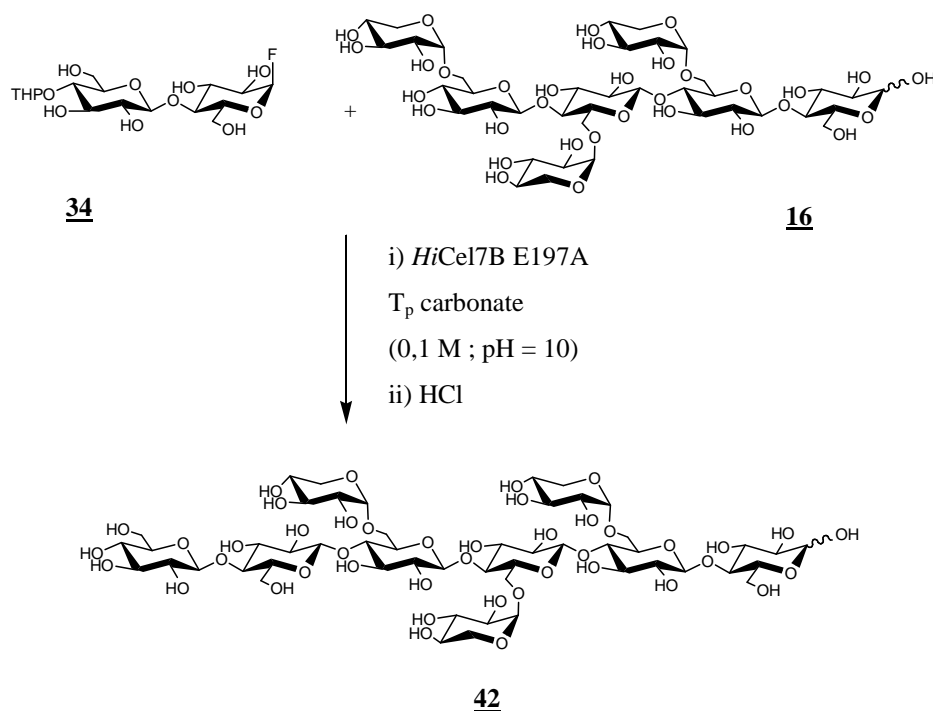


Schéma 11 : Addition d'un motif cellobiosyle sur l'heptasaccharide XXXG 16

L'addition enzymatique d'un premier cellobiosyle suivie de l'hydrolyse du groupement tétrahydropyrane en milieu acide a été réalisée avec un rendement de 74 %. Puis, un second motif a pu être ajouté dans les mêmes conditions avec un rendement de 70 %, constituant ainsi une succession de quatre résidus glucosyle non substitués et conduisant à l'undécasaccharide GGGGXXXG 43. Le choix de la longueur de cette zone non substituée a été déterminé en cohérence avec les motifs élémentaires des XGs. En effet, les XGs étant constitués de répétition de XGOs comportant 4 résidus glucosyle dans la chaîne principale, il était nécessaire que la longueur de la zone cellulosique du composé chimio-enzymatiquement synthétisé soit proportionnelle à cette valeur. Un composé possédant 4 motifs cellobiosyles, soit 8 résidus glucosyle, aurait également pu être synthétisé mais son obtention et plus particulièrement sa purification aurait pu s'avérer délicate en raison de son importante masse molaire. Par ailleurs, la solubilité d'un tel composé aurait été nettement plus faible.

Le couplage enzymatique entre l'undécasaccharide 43 et le nonasaccharide fluoruré 41 a pu ensuite être effectué grâce à l'utilisation de la glycosynthase *HiCel7B* E197A (Schéma 12).

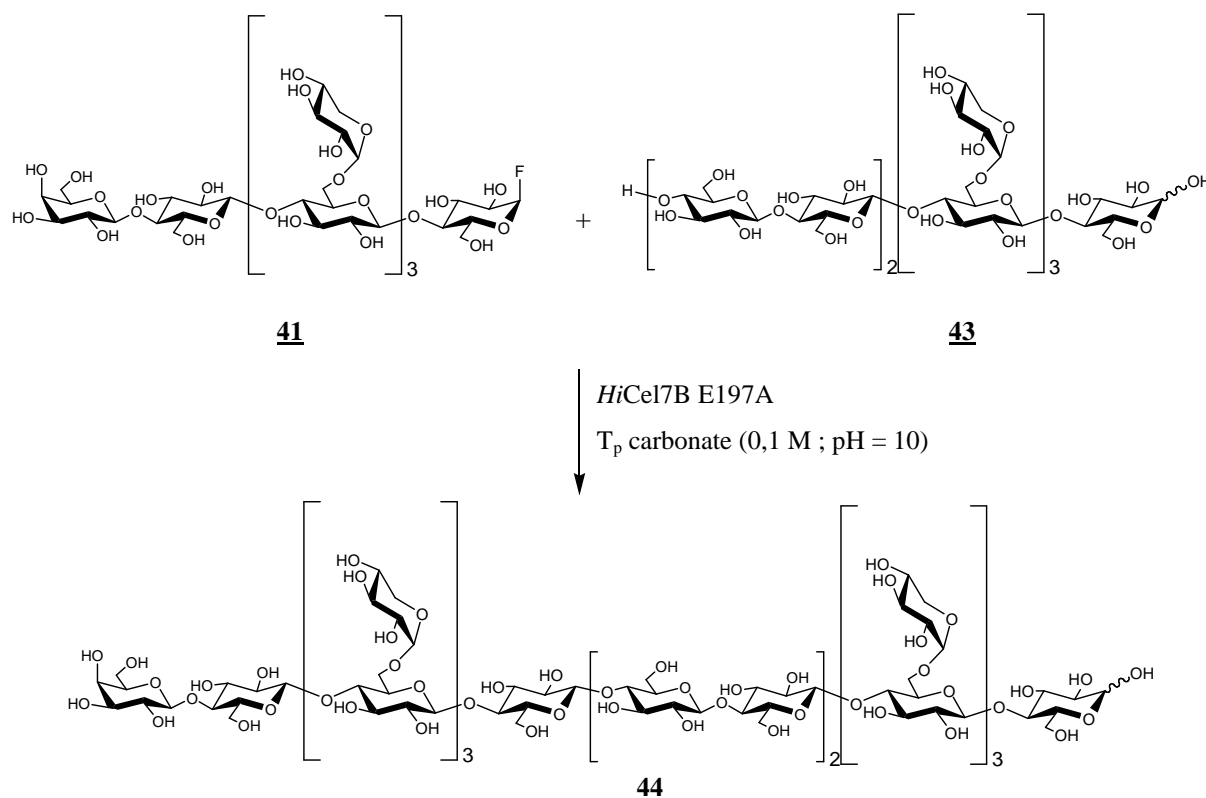


Schéma 12 : Obtention par voie chimio-enzymatique de l'oligosaccharide LacXXXGGGGGXXXG **44**

Le produit résultant **44** a été obtenu avec un rendement de 71 % après purification par chromatographie sur gel de silice et filtration sur 0,45 μm . Malgré un rendement correct, la quantité de produit **44** synthétisé est la quantité minimale nécessaire à l'étude des interactions. Or il resterait, a priori, à hydrolyser le motif lactosyle protecteur pour obtenir le composé **45**. Cette réaction n'a pas été réalisée pour ne pas risquer une diminution de la quantité de produit disponible qui pourrait devenir insuffisante pour l'étude des interactions. Cependant, afin de comparer des XGOs comparables, un motif lactosyle a été ajouté à l'extrémité non réductrice des oligosaccharides **20** et $[\text{XGO}]_3$ par couplage chimio-enzymatique dans des conditions identiques à celles décrites précédemment (Schéma 6) en utilisant le fluorure de lactosyle **36**. Les rendements correspondant sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (Tableau 12).

Donneur	Accepteur	Produit obtenu	Rendement
Lac- α F 36 (3 éq)	XXXGXXXGXXXG 21	LacXXXGXXXGXXXG 45	71 %
Lac- α F 36 (5 éq)	$[\text{XGO}]_3$	Lac $[\text{XGO}]_3$ 46	48 %

Tableau 12 : Rendements des couplages enzymatiques du produit **36** sur les XGOs **21** et $[\text{XGO}]_3$

Lors de ces réactions enzymatiques, le donneur a été utilisé en excès afin de faciliter la purification des produits de couplage. Ceci ne génère pas d'auto-condensation du fluorure en raison de son absence de caractère accepteur vis-à-vis de la glycosynthase *HiCel7B E197A*. L'excès de fluorure n'a pas été déterminé a priori mais ce composé a été ajouté petit à petit jusqu'à disparition de l'accepteur évaluée par CCM. Il est en effet préférable d'ajouter le fluorure par petites quantités afin de minimiser son hydrolyse.

Grâce à cette voie de synthèse chimio-enzymatique plusieurs composés xylogluco-oligosaccharidiques de structure contrôlée ont été obtenus. Cependant, malgré un bon contrôle de la répartition des ramifications, les XGOs synthétisés sont de tailles relativement faibles. Une nouvelle approche a donc été abordée pour obtenir des XGOs de longueur de chaîne plus importante.

4. Les bola xylogluco-oligosaccharides : un moyen de mimer des XGOs de masse molaire plus élevée ?

Les synthèses chimio-enzymatiques décrites précédemment n'ont pas permis d'accéder à des XGOs de tailles supérieures à douze résidus glucosyle sur leur chaîne principale. Or cette longueur semble être la longueur minimale pour l'adsorption des XGOs sur la cellulose.⁹⁰ Afin de disposer de XGOs de tailles plus importantes, tout en maîtrisant la répartition de ramifications il a été envisagé de mimer ces derniers au moyen de structures hybrides constituées de XGOs associés entre eux par l'intermédiaire d'un bras espaceur (Schéma 13).

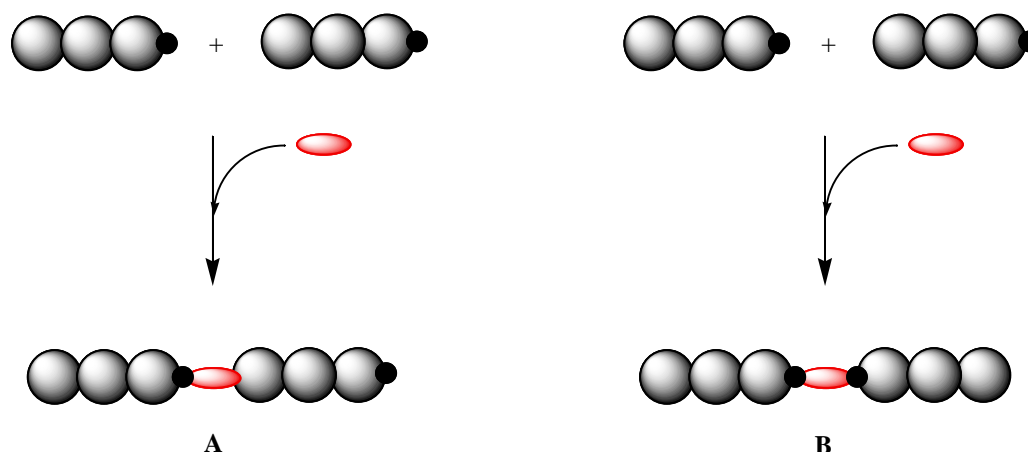


Schéma 13 : Utilisation de structures hybrides pour mimer des XGOs de tailles plus importantes, enchaînement de type tête-à-queue (A) ou de type tête-à-tête (B)

- représente les motifs élémentaires des xyloglucanes de structure de base tétraglucosidique (XXXG, XLXG,...)
- représente le saccharide réducteur de chaque XGO
- représente le bras espaceur

Le bras espaceur doit pouvoir être introduit sans modifier les caractéristiques des XGOs et ne doit pas interférer, par sa nature, dans les interactions XGOs-cellulose.

De plus, il est possible d'envisager un enchaînement de type tête-à-queue ou bien tête-à-tête. La possibilité de coupler les deux XGOs tête-à-queue permettrait de conserver une régularité de structure primaire tout le long du bola-oligosaccharide. Cependant, le couplage nécessiterait la fonctionnalisation du saccharide situé à l'extrémité non réductrice. L'introduction d'un groupement azide ou amine en position 6^{II} d'un motif lactosyle a déjà été réalisée au laboratoire (résultats non publiés) mais cette fonctionnalisation, déjà complexe sur ce disaccharide pourrait s'avérer inaccessible sur les XGOs. Par contre, l'enchaînement de type tête-à-tête est plus accessible car il ne nécessite que la fonctionnalisation du carbone anomère du saccharide réducteur.

4.1. Choix du bras espaceur

Le choix du bras espaceur est assez restreint compte tenu des conditions requises. Il doit pouvoir être couplé aux XGOs et les structures hybrides résultantes doivent conserver la solubilité dans l'eau. En conséquence, les oligo- et poly(éthylène glycol) (OEG et PEG) sont de bons candidats. Ces composés présentent plusieurs avantages, ils sont tout d'abord commerciaux et plusieurs degrés de polymérisation sont disponibles. Ils sont hydrosolubles et leur fonctionnalisation est relativement simple. Enfin, leur flexibilité permettra une certaine

adaptation conformationnelle de la molécule afin de permettre les interactions avec les chaînes de cellulose.

4.2. Stratégie de synthèse

Comme précisé en introduction, l'enchaînement des deux XGOs sera de type tête-à-tête. Ceci peut s'avérer être un obstacle aux interactions XGOs-cellulose car, vis-à-vis d'une même microfibrille de cellulose, un des deux XGO de la structure hybride sera alors orienté de façon anti-parallèle, comme les chaînes de cellulose dans la cellulose II. Ceci pourrait constituer un obstacle à l'adsorption, c'est pourquoi, plusieurs longueurs de OEG et PEG doivent être utilisées, pour conférer à la structure hybride des longueurs et des flexibilités variables permettant d'aborder les différents types d'interaction envisagés entre la cellulose et les XGs.

Il est ainsi possible d'utiliser un di(éthylène glycol) pour induire des interactions dans la configuration représentée Figure 37A et déterminer alors si l'orientation antiparallèle des XGOs vis-à-vis de la cellulose est un obstacle aux interactions. L'utilisation d'un bras espaceur plus long de type PEG (Figure 37C) permettrait de surmonter cet obstacle. Enfin l'octa(éthylène glycol) pourrait également permettre de faire abstraction de cette orientation, susceptible d'être défavorable, par interaction des XGOs sur deux microfibrilles de cellulose différentes (Figure 37B).

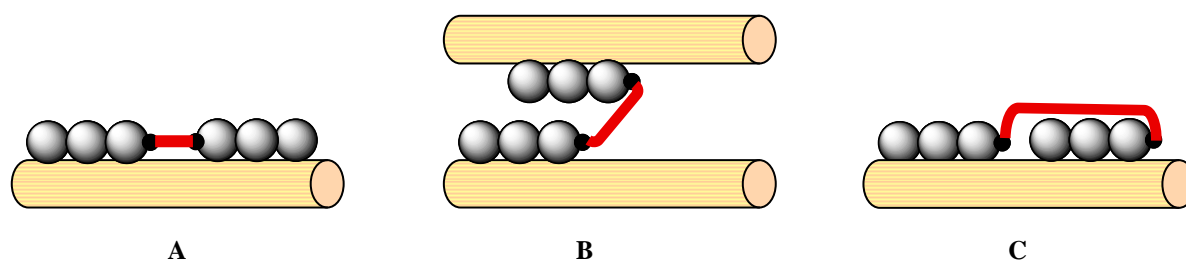


Figure 37 : Représentation schématique des interactions entre les structures hybrides XGOPEGXGO et la cellulose

En fonction de la longueur du bras espaceur différentes conformations sont susceptibles d'être adoptées par les structures hybrides XGOPEGXGO lors des interactions avec la cellulose

Deux voies de synthèse peuvent être envisagées pour l'obtention de ces structures hybrides : une amination réductrice des XGOs par des dérivés oligo- poly(éthylène glycol) diamine ou une cycloaddition catalysée par le cuivre (« click-chemistry ») à partir de diazido

oligo-poly(éthylène glycol) et des XGOs fonctionnalisés par une fonction alcyne. Les deux méthodes envisagées pour l'obtention des structures hybrides requièrent la fonctionnalisation d'oligo- et de poly(éthylène glycol) (OEG/PEG) en leurs dérivés α,ω -diamines ou α,ω -diazides.

4.3. Fonctionnalisation des oligo- et poly(éthylène glycol)

Les OEG et PEG possédant des groupements azotures ou amines à leurs deux extrémités ont été synthétisés de manière identique pour les deux premières étapes, la formation des composés aminés nécessitant ensuite une étape supplémentaire (Schéma 14).

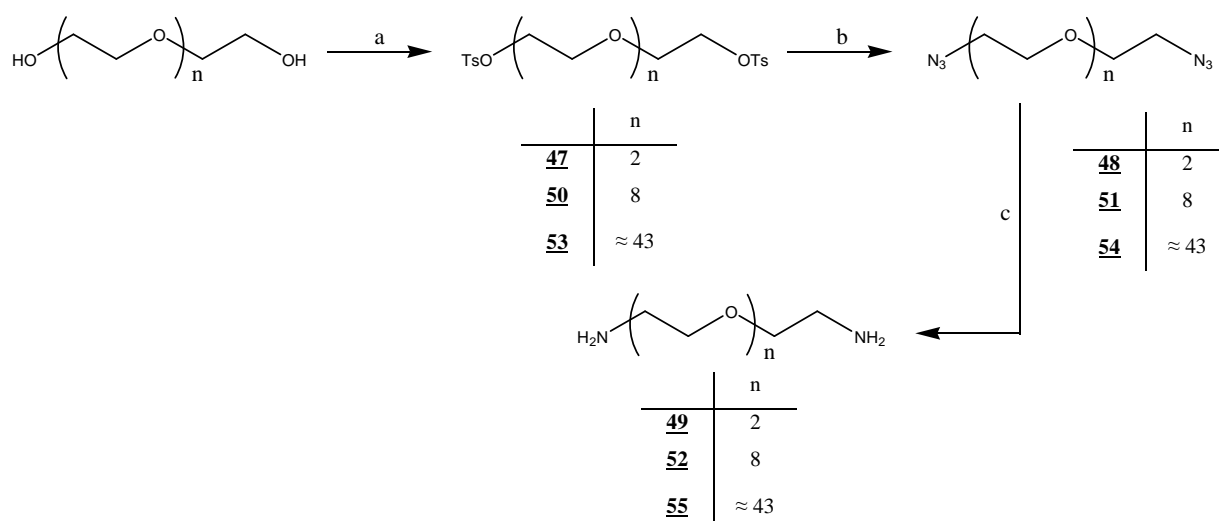


Schéma 14 : Voie d'obtention des dérivés $N_3(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2N_3$ et $NH_2(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2NH_2$

a) TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 30 °C ; b) NaN₃, Et₃N ; c) H₂, Pd/C ou H₂S, pyridine/eau

Plusieurs méthodes de tosylation sont décrites dans la littérature utilisant le chlorure de tosyloxy associé à une base qui peut être la pyridine,^{136,137} la triéthylamine¹³⁸ ou encore la potasse.¹³⁹ Dans le cas présent, la triéthylamine a été utilisée comme espèce basique. Les produits 47, 50 et 53 ont ainsi été obtenus avec des rendements respectifs de 88 %, 47 % et 100 %.

Ils ont été analysés par spectrométrie de masse. En raison de la polydispersité du PEG₄₃, le spectre de masse présente un massif de pics et ne permet pas de conclure quant à la nature du composé 53. La structure de ces composés a été confirmée par analyse RMN ¹H, par la présence de deux doublets à 7,7 et 7,3 ppm de constante de couplage 8-9 Hz,

caractéristiques des protons aromatiques et d'un singulet à 2,4 ppm caractéristique des protons du groupement méthyle (Figure 38A). L'ensemble des spectres RMN ^1H et ^{13}C sont, par ailleurs, conformes à la littérature.^{139,140}

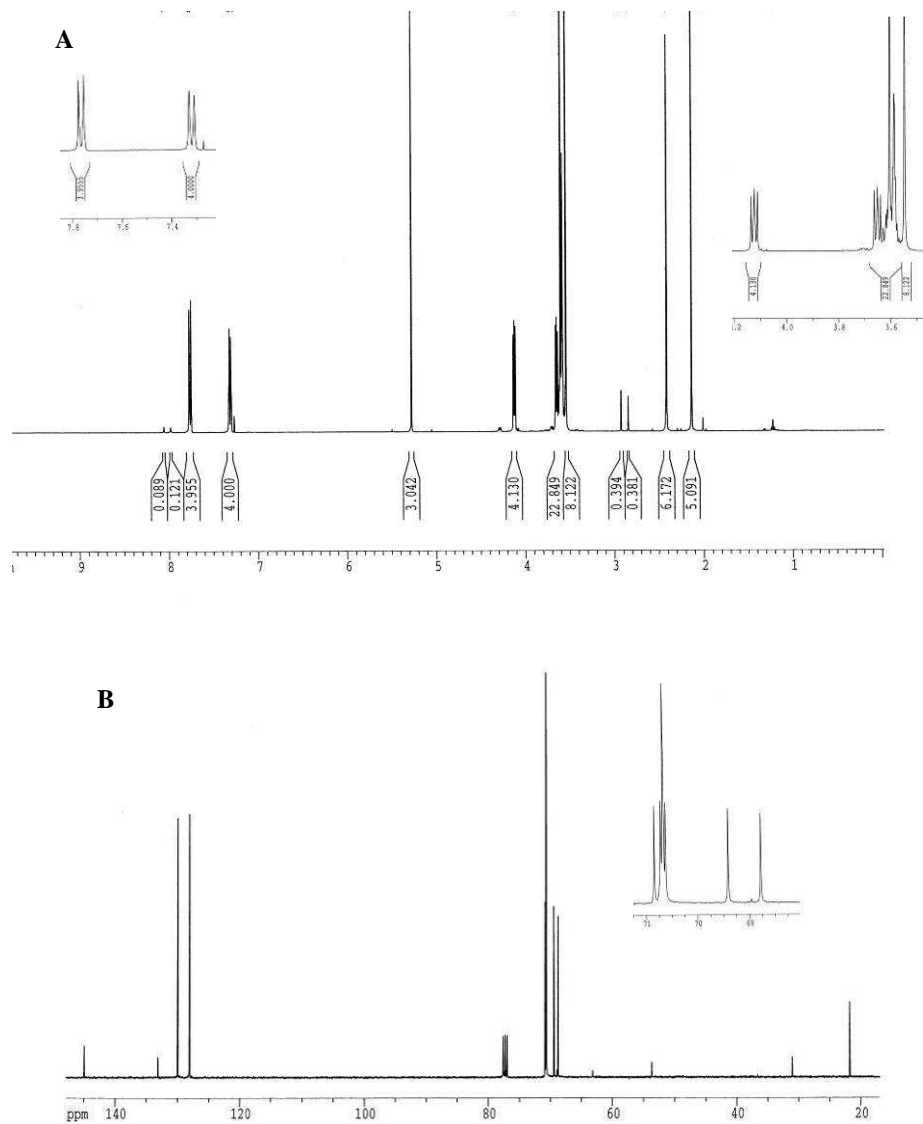


Figure 38 : Spectre RMN ^1H (A) et RMN ^{13}C (B) du $\text{TsO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8\text{Ts}$

Les produits **48**, **51** et **54**, comportant des fonctions azides ont ensuite été obtenus conformément à la littérature,¹⁴¹ par réaction de l'azoture de sodium dans le DMF, avec des rendements compris entre 66 % et 69 %. La disparition, sur le spectre RMN ^1H et RMN ^{13}C , des signaux caractéristiques du groupement tosyloxy laisse supposer que les produits formés sont bien ceux attendus.

La réduction de la fonction azide, a été effectuée par deux méthodes.

Le composé **54** a été réduit en utilisant du dihydrogène en présence de Pd/C. Une analyse par spectrométrie de masse n'a pas permis de conclure quant à la nature du composé obtenu, toujours en raison de la polydispersité du PEG de départ. En analyse RMN, la présence d'un singulet élargi à 1,95 ppm caractéristique d'un groupement amine montre que le produit **54** a bien été réduit. Le rendement de cette réaction est de 86 %. Cependant, la présence de charbon dans le catalyseur peut laisser craindre une adsorption de quantité produit non négligeable sur celui-ci, malgré les rinçages à l'éthanol à chaud effectués. Une seconde méthode, utilisant le sulfure d'hydrogène (H₂S) dans un mélange eau/pyridine a donc été utilisée pour la réduction des composés **48** et **51**.

Les structures des composés **49** et **52** résultants ont été confirmées par spectrométrie de masse et analyse RMN. En effet, malgré l'absence du signal relatif au groupement amine dans le cas du composé **49**, le signal relatif aux protons -CH₂- situé en α de ce même groupement est bien déplacé vers les champs forts et le signal relatif aux autres protons vers les champs faibles, par rapport aux dérivés azotures sur les spectres RMN ¹H. Les spectres RMN ¹³C ont également permis de confirmer la nature des composés **49** et **52**, car le déplacement chimique du signal relatif au carbone en α du groupement amine varie de 50 ppm à 40 ppm dans les deux cas. Les rendements d'obtention de ces produits sont supérieurs à 90 %

La réduction par le sulfure d'hydrogène s'est donc avérée être une méthode plus efficace et plus fiable que l'utilisation du palladium qui peut entraîner une adsorption du produit de la réaction sur le charbon contenu dans le catalyseur.

Les précurseurs obtenus à partir d'oligo- et de poly(éthylène glycol) ont ensuite été utilisés pour la synthèse des structures hybrides.

4.4. Synthèse des bola xylogluco-oligosaccharides

Deux méthodes peuvent être envisagées pour synthétiser les structures hybrides XGO-PEG-XGO : l'amination réductrice ou la cycloaddition. Dans un premier temps, l'amination réductrice a semblé la méthode la plus adaptée car elle ne nécessite pas de fonctionnalisation des XGOs qui pourrait amoindrir les quantités de ces oligosaccharides disponibles. Puis dans un deuxième temps les réactions de cycloaddition ont été testées.

4.4.1. Amination réductrice

L'amination réductrice permet d'obtenir des dérivés d'oligosaccharides sous forme d'amino-alditol.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Dans un premier temps, l'amine réagit avec le groupement carbonyle, présent sur la forme ouverte du saccharide réducteur. La formation d'une imine par condensation permet alors de déplacer l'équilibre entre les deux formes vers la forme ouverte. L'imine se protone ensuite, en milieu acide, en iminium, qui est ensuite réduit par le cyanoborohydrure de sodium, réducteur spécifique des imines. Ces étapes sont représentées d'une manière générale Schéma 15.

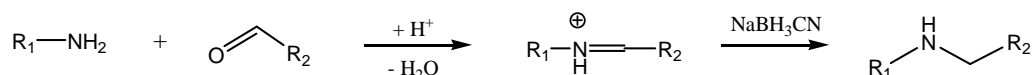


Schéma 15 : Réaction d'amination réductrice

Plusieurs essais d'amination réductrice ont été effectués (Tableau 13), avec différentes amines et différents oligosaccharides. Dans la littérature, les aminations réductrices sont effectuées en présence d'un excès d'amine. Cependant, dans le cas présent, les deux extrémités de l'OEG ou PEG doivent être fonctionnalisées ce qui exige l'utilisation d'un excès d'oligosaccharide.

Bien que la mise en œuvre de cette réaction ne présente pas de difficulté particulière d'après la littérature, dans le cas présent, elle n'a, à de très rares exceptions près, pas permis d'accéder aux produits attendus. Cependant, la réactivité des produits de réaction à l'orcinol ainsi qu'à l'iode, dans la totalité des essais, lors d'analyse par CCM, laisse supposer qu'ils comportent une partie saccharidique et une partie de type éthylène glycol. Les analyses ont été réalisées par spectrométrie de masse. Dans certains cas les milieux bruts réactionnels ont été directement analysés mais plusieurs méthodes de purification ont été également testées : la chromatographie sur gel de silice normale ou C18 ainsi que la chromatographie sur colonne d'exclusion.

Entrée	Oligosaccharide	H ₂ NPEG _n NH ₂	Réactifs	Conditions	Présence du produit attendu*	Autres produits présents *
1	XXG	n = 43	NaBH ₃ CN AcOH	80 °C, 1 h 40	Oui	2 massifs centrés sur 1900, 3700
2	XXXGXXXG	n = 43	NaBH ₃ CN AcOH	80 °C, 1 h 40	Non	2 massifs centrés sur 1900 et 3900
3	[XGO] ₂	n = 2	NaBH ₃ CN AcOH	80 °C, 3 h	Oui	[XGO] ₂ NHCH ₂ CH ₂ ⁺
4	[XGO] ₂	n = 2	NaBH ₃ CN AcOH	55 °C, 1 nuit	Non	[XGO] ₂ NHCH ₂ CH ₂ ⁺
5	[XGO] ₂	n = 2	i) TEOAcO ii) NaBH ₄	55 °C, 1 nuit T _A , 8 h	Présence d'une quantité de sels trop importante pour une analyse fiable	
6	GG	n = 2	NaBH ₃ CN AcOH	55 °C, 1 nuit	Non	GGNHCH ₂ CH ₂ ⁺
7	[XGO] ₂	n = 8	NaBH ₃ CN AcOH	55 °C, 1 nuit	Non	[XGO] ₂ NHCH ₂ CH ₂ ⁺
8	[XGO] ₃	n = 2	NaBH ₃ CN AcOH	55 °C, 1 nuit	Non	[XGO] ₂ NHCH ₂ CH ₂ ⁺

Tableau 13 : Récapitulatif des essais d'amination réductrice

* les produits sont analysés par spectrométrie de masse

Les essais utilisant la diamine dérivée du poly(éthylène glycol) ont permis d'identifier le produit attendu uniquement dans le cas du pentasaccharide XXG, obtenu lors de l'hydrolyse des XGs de tamarin (entrée 1), mais avec un rendement faible (18 %). L'analyse par spectrométrie de masse fait apparaître plusieurs massifs dans les deux cas (entrée 1 & 2). Il pourrait s'agir du produit résultant d'une monosubstitution mais la polydispersité du PEG et sa masse molaire élevée se sont avérées encore une fois un obstacle à l'analyse plus précise de ces produits.

Les di- et octa(éthylène glycol) présentent l'avantage d'être monodisperses, ce qui facilite l'analyse des spectres de masses. Trois essais ont été effectués pour le couplage du mélange [XGO]₂ avec les diamines **49** et **52**, obtenue à partir des di- et octa(éthylène glycol). A partir des conditions décrites dans la littérature (entrée 3, entrée 4 et entrée 7), seul l'essai réalisé à 80 °C (entrée 3) a permis de synthétiser le produit attendu. L'analyse par spectrométrie de masse a néanmoins montré, dans les deux cas, la présence d'un pic qui ne correspond pas au produit monosubstitué ni au produit doublement chargé mais qui pourrait correspondre à une fragmentation du produit souhaité à savoir : [XGO]₂NH(CH₂CH₂O)_{n/2}⁺. L'augmentation de la taille du XGOs n'a pas non plus abouti aux résultats attendus.

Afin de minimiser la protonation de l'amine qui pourrait la priver de sa réactivité, la réaction a été effectuée en deux temps (entrée 5), l'amination a été effectuée en présence de triéthylorthoacétate visant à piéger l'eau présente dans le milieu, puis le produit a été réduit en présence de cyanoborohydrure de sodium. La présence de quantités de sels importantes rend l'analyse du milieu complexe mais aucun pic n'a été détecté au-dessus de la valeur correspondant aux $[XGO]_2$ en spectrométrie de masse.

Le cellobiose, testé en guise de témoin positif (entrée 6), n'a pas donné plus de résultats et seul un pic de masse pouvant correspondre à $GGNHCH_2CH_2^-$ a été observé en mode négatif.

L'analyse RMN a été effectuée sur un essai (entrée 4) présentant une quantité de produit suffisante et l'absence de signal relatif au proton anomère a été constatée. Bien que l'analyse RMN soit complexifiée par l'importance des masses molaires des produits considérés, il semble donc que le produit attendu ait bien été formé. Le pic supplémentaire observé en spectrométrie de masse, qui correspond, dans les différents essais, au même sous-produit pourrait correspondre à un pic de fragmentation du produit attendu ou à un produit polychargé. Néanmoins, l'incertitude quant à la nature du produit formé et la difficulté de purification, liée à l'impossibilité d'utiliser un excès d'amine, rendent cette méthode peu fiable pour la construction de ces structures hybrides.

Une deuxième méthode envisageable pour obtenir ces structures est la méthode de « click-chemistry », cycloaddition catalysée par le cuivre.

4.4.2. « Click-chemistry »

La cycloaddition¹⁴⁵ d'un alcyne et d'un azide peut se faire par voie non catalytique mais la stabilité des réactifs nécessite une température de réaction élevée et des temps de réaction importants.¹⁴⁶ Afin d'améliorer les conditions de cette réaction impliquant la formation d'une liaison comportant un hétéroatome que Kolb *et al.*¹⁴⁷ ont utilisé un catalyseur rendant ces réactions beaucoup plus efficaces au point de les qualifier de « click-chemistry ».

Un premier essai de faisabilité de cette réaction a été mis en œuvre sur un mélange de dérivés alcynes de XGOs disponibles au laboratoire. Les XGOs présents dans ce mélange sont les motifs constitutifs des XGs de tamarin (XXXG, XXLG, XLXG et XLLG). L'azide utilisé lors de cette réaction est le dérivé poly(éthylène glycol) $N_3PEG_{43}N_3$ **54** car celui-ci est disponible en grande quantité.

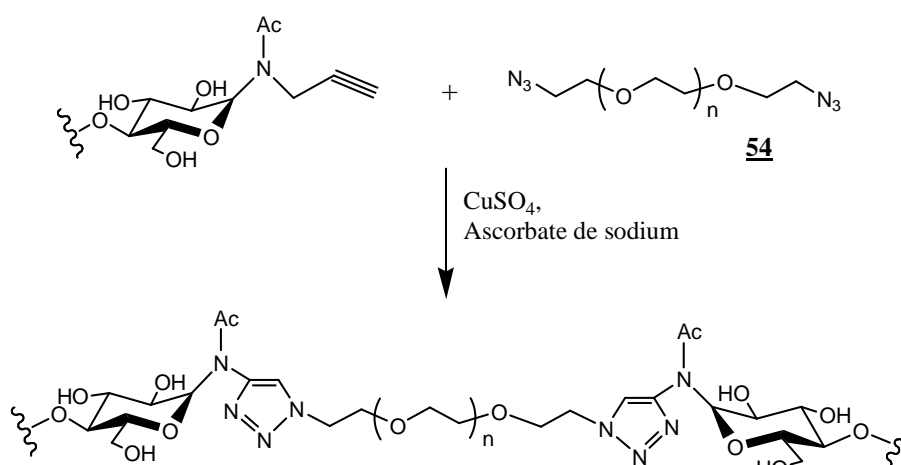


Schéma 16 : Réaction de cycloaddition utilisant un catalyseur au cuivre

La réaction de cycloaddition (Schéma 16) a été catalysée par le sulfate de cuivre en présence d'ascorbate de sodium afin de réduire le Cu^{II} en Cu^I , espèce catalytique. Sa mise en œuvre n'a pas nécessité de conditions particulières et après 1 h à 50 °C, une analyse par chromatographie sur couche mince montrant la disparition des dérivés xyloglucosaccharidiques, a permis d'évaluer que le produit attendu se formait de manière quasi-quantitative. Le produit a ensuite été purifié par chromatographie sur gel de silice. Malgré une analyse CCM encourageante, la spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier le produit attendu. En effet, le massif de pics présent sur le spectre ne correspond ni à l'ajout de deux motifs XGOs ni à l'ajout d'un seul motif sur le PEG et ne correspond pas non plus au produit de départ.

Cet essai préliminaire n'a pas permis d'identifier avec certitude le produit de la réaction. Il serait cependant intéressant de reproduire cette réaction avec un OEG moins long et monodisperse pour s'affranchir des problèmes d'analyse et en utilisant des XGOs de tailles plus importantes afin que les structures hybrides obtenues soient pertinentes pour l'étude des interactions. Pour cela, les XGOs ont dû être préalablement fonctionnalisés.

Formation de propargyl-xylogluco-oligosaccharides 57 et 58

Afin que les XGOs puissent être couplés par cycloaddition, il est nécessaire de les fonctionnaliser avec un groupement propargyle, suivant le schéma réactionnel ci-dessous (Schéma 17).

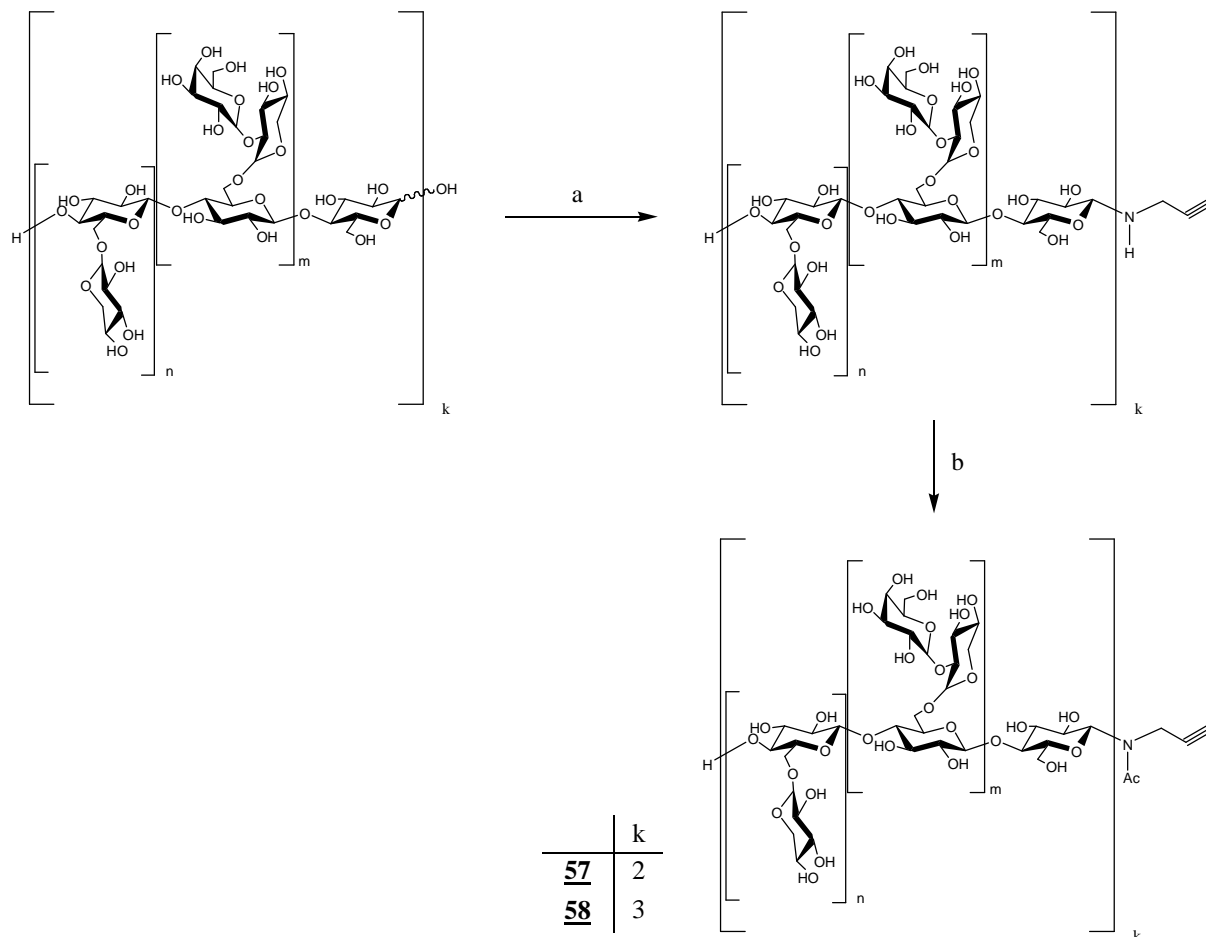


Schéma 17 : Fonctionnalisation de XGOs par une N-acétylpropargylamine

a) PrNH_2 , 40 °C ; b) Ac_2O , MeOH, T_A

Les lots $[\text{XGO}]_2$ et $[\text{XGO}]_3$ ont été utilisés pour cette réaction car les quantités disponibles étaient suffisantes et les longueurs de chaînes totalement définies.

Après les étapes d'insertion de la propargylamine et d'acétylation, la disparition complète de produit de départ en fin de réaction a été montrée par spectrométrie de masse. Cependant, l'acétylation de l'amine a entraîné des acétylations supplémentaires sur les hydroxyles saccharidiques, ceux-ci ont été hydrolysés en milieu basique. Les rendements de ces deux réactions sont analogues pour les deux lots de XGO, de l'ordre de 50 %. Ces faibles

rendements peuvent s'expliquer par la nécessité de purification par précipitation à l'issu de chacune des deux étapes, ce qui peut générer une perte de produit.

Cycloaddition (« click-chemistry »)

Les essais de cycloaddition ont été réalisés à partir des deux lots de propargylamines précédents : [XGO]₂NAcPr (**57**) et [XGO]₃NAcPr (**58**). Les faibles quantités de produits disponibles ont permis de faire uniquement des essais de faisabilité. Le dérivé diazoture utilisé est le composé **49** obtenu à partir du di(éthylène glycol).

Ces réactions sont réalisées dans un mélange *ter*-butanol/eau (1/1 v/v), en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium, dont le rôle réducteur a été évoqué précédemment. Le mélange **58** n'était que partiellement soluble dans le solvant utilisé alors que le mélange **57** a donné une solution limpide. Après 24h de réaction, un échantillon des milieux réactionnels a été analysé par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 14. Dans le cas du mélange **57** (entrée 1) le produit attendu est bien présent (m/z = 5490) mais la présence d'un pic de masse deux fois plus faible laisse penser qu'il reste du produit de départ ou du produit mono substitué. La difficulté d'analyse de ce milieu réactionnel en spectrométrie de masse et le fait que les échantillons soient constitués d'un mélange de produits ne permettent pas de statuer avec certitude sur l'une ou l'autre des hypothèses. Dans le cas du mélange **58** (entrée 2), un seul massif est détecté en spectrométrie de masse correspondant au produit de départ ou au produit monosubstitué. La réaction a alors été poursuivie après rajout de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium mais les résultats obtenus après 24 h de réaction supplémentaires sont identiques aux précédents.

Entrée	Propargylamine	Formation du bola-oligosaccharide	Pics en spectrométrie de masse après 24 h	Pics en spectrométrie de masse après 48 h
1	[XGO] ₂ NAcPr (57)	Oui	2 massifs (m/z = 2666 et 5490)	2 massifs (m/z = 2666 et 5490)
2	[XGO] ₃ NAcPr (58)	Non	1 massif (m/z = 4080)	1 massif (m/z = 4080)

Tableau 14 : Résultats des analyses par spectrométrie de masse des essais de formation de bola-oligosaccharides par « click-chemistry » à partir du di-azido-di(éthylène glycol) N₃(OCH₂CH₂)₂N₃ **49**

D'après ces résultats, les essais de « click-chemistry » permettent d'obtenir des bola-oligosaccharides dans le cas de composés solubles dans le milieu réactionnel. La structure hybride $[XGO]_2PEG_2[XGO]_2$ a ainsi pu être obtenue mais en raison des faibles quantités de produit disponible, cette structure a uniquement été caractérisée par spectrométrie de masse.

L'insolubilité du composé $[XGO]_3NACPr$ (**58**) dans le milieu utilisé est très probablement à l'origine de son absence de réactivité.

Contrairement aux réactions d'amination réductrice qui n'ont pas permis de mener au résultat attendu, la voie de synthèse de bola-oligosaccharides par cycloaddition a permis d'obtenir une structure hybride. Il est néanmoins nécessaire que la propargylamine formée à partir du substrat xylogluco-oligosaccharidique soit soluble dans le milieu réactionnel considéré, c'est la raison pour laquelle le composé **58** obtenu à partir du mélange $[XGO]_3$ n'a pas été couplé au composé **49** $N_3(OCH_2CH_2)_2N_3$. Il pourra alors être envisagé lors de travaux ultérieurs de modifier le milieu réactionnel afin de permettre la solubilisation de substrats xylogluco-oligosaccharidiques de masse molaire plus élevée et de pouvoir synthétiser ainsi des bola-oligosaccharides de structure variée en modifiant la taille des XGOs et/ou en utilisant les différents dérivés diazotures d'OEG et de PEG de longueur variable qui ont été préparés.

Bien que ces bola-oligosaccharides ne soient pas, à ce jour, disponibles pour l'étude des interactions XGs-cellulose, la synthèse des dérivés d'OEG et de PEG ainsi que les tests de faisabilité de cycloaddition pourront permettre d'utiliser ces structures pour des travaux ultérieurs

5. Bilan de la préparation des substrats xyloglucosidiques

L'obtention de XGOs de structure contrôlée a donc été réalisée par plusieurs approches, soit une approche d'extraction suivie, dans certains cas, d'hydrolyse partielle à partir de XGs naturels, soit une approche chimio-enzymatique

5.1. Substrats disponibles pour l'étude des interactions

Les différents substrats obtenus peuvent être classés en trois catégories : les XGs naturels, les XGOs partiellement hydrolysés et les XGOs obtenus par synthèse chimio-enzymatique.

- Les XGs naturels disponibles sont : les XGs de *Rubus* pariétaux (XG_{RP}), les XGs de *Rubus* extra-cellulaires (XG_{REC}) et leurs analogues désacétylés ($XG_{REC\ dés}$), les XGs de tamarin commerciaux (XG_{T700}) et les XGs de tamarin extraits de graines (XG_{T100}).
- Par hydrolyse partielle, quatre lots de XGOs ont été obtenus : $XGO_{1/2}$, $XGO_{4/3}$, $[XGO]_2$ et $[XGO]_3$
- Enfin par synthèse chimio-enzymatique des XGOs de structure totalement définie ont été obtenus : $(XXXG)_2$, $(XXLG)_2$, $(XXXG)_3$, $(XXLG)_3$, $Lac[XGO]_3$, $Lac(XXXG)_3$ et $LacXXXGG_4XXXG$

L'étude des interactions XGs- et XGOs-cellulose au moyen de ces différents substrats obtenus devrait permettre d'apporter des réponses aux interrogations qui subsistent sur l'influence de la structure des XGs sur les interactions XGs-cellulose au sein de la paroi primaire. L'intérêt de ces structures pour l'étude des interactions est représenté ci-dessous (Schéma 18)

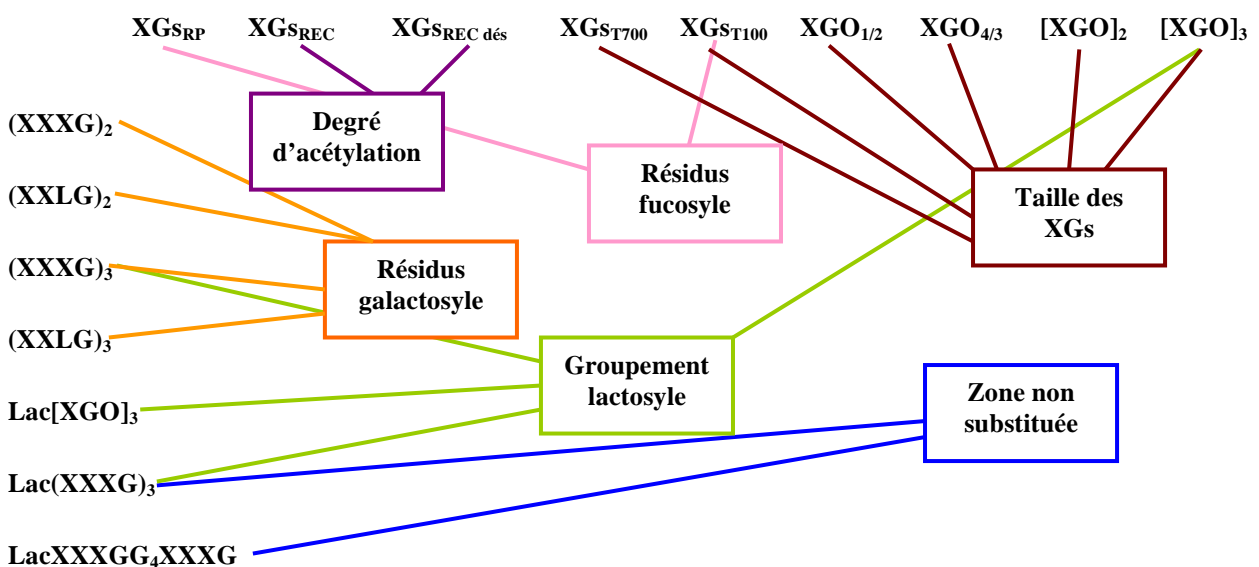


Schéma 18 : Quelles réponses sur les mécanismes d'interactions XGs-cellulose à partir de quels substrats ?

L'étude des interactions de ces différents composés avec la cellulose sera décrite au Chapitre 3.

5.2. Spécificité des substrats des glycosynthases

Les essais de synthèse par voie chimio-enzymatique ont permis d'apporter des informations sur la spécificité des glycosynthases.

En effet, l'oligosaccharide XXXG et son dérivé fluoré sont respectivement donneur et accepteur de la glycosynthase *HiCel7B* E197 au point de générer la formation de polymères. Par ailleurs, leurs homologues monogalactosylés, relatifs au motif constitutif des XGs de tamarin XXLG, sont également donneur et accepteur vis-à-vis de cette glycosynthase mais l'activité de ce mutant est moins importante dans ce cas car la formation d'aucun polymère n'a été observée. Enfin, le dérivé digalactosylé XLLG et son dérivé fluoré ne sont ni donneur ni accepteur vis-à-vis de cette glycosynthase. Par contre, il semble que ces derniers soient reconnus par le mutant *PttXET16A* E85A. Ceci illustre la sélectivité des différentes glycosynthases utilisées et pourrait permettre d'apporter des informations d'ordre morphologique sur les sites actifs des enzymes testées.

Malgré la reconnaissance des composés digalactosylés par la glycosynthase *PttXET16A* E85A, les produits de couplage n'ont été obtenus qu'en quantités très faibles. D'autres mutants obtenus à partir de cette même XET ont également été testés (publication sous presse) mais les résultats ne sont pas suffisamment probants pour envisager la production de (XLLG)_n par l'utilisation d'une de ces enzymes.

Chapitre 3 :

*Étude des interactions xyloglucanes-
cellulose*

1. Introduction

Dans le chapitre précédent la préparation de XGs et XGOs modèles a été décrite. L'affinité de ces substrats pour la cellulose a pu ainsi être étudiée. Plusieurs méthodes d'analyse des interactions sont envisageables. Cependant, les faibles quantités de substrats xylogluco-oligosaccharidiques disponibles, le caractère faiblement enthalpique des interactions et l'insolubilité de la cellulose rendent certaines méthodes difficilement applicables.

Dans un premier paragraphe, les différentes techniques utilisées pour l'étude des interactions vont être décrites et la conséquence de certaines contraintes expérimentales sur le choix des substrats cellulose sera exposée

2. Choix de techniques d'analyse

Compte tenu des contraintes évoquées en introduction, trois méthodes principales ont été retenues pour cette étude : la détermination des isothermes d'adsorption, qui permet de déterminer la quantité de ligand adsorbée sur un substrat donné, la Titration Calorimétrique Isotherme (ITC) qui donne une information enthalpique sur l'adsorption et la RMN du solide qui permet d'accéder à des données d'ordre structural sur les composants impliqués dans les interactions considérées. Ce paragraphe consiste en une présentation sommaire de la manière dont la RMN du solide, les isothermes d'adsorption et enfin l'ITC ont été abordées.

2.1. Intérêt de l'analyse de composites XGs-cellulose par RMN

Certaines études des interactions XGs-cellulose, à partir de composite XGs de tamarin-cellulose bactérienne par résonance magnétique nucléaire, ont été menées précédemment dans le cadre de la thèse de V. Silvestre.¹²³ Ainsi, en présence de XGs dans le milieu de culture d'*Acetobacter xylinum*, ces derniers peuvent s'intercaler entre les microfibrilles de cellulose au cours de la biosynthèse. Lors de ces travaux deux populations de XGs ont été mises en évidence grâce à l'utilisation de milieu de culture appauvri en ¹³C, au sein duquel la quantité de cet isotope est inférieure à l'abondance naturelle, qui induit une cellulose ne présentant pas

de signal en RMN ^{13}C . Cependant, les temps d'accumulation, nécessaires à l'observation des différentes conformations et mobilités des XGs intercalés, se sont avérés trop élevés pour permettre une analyse complète.

Dans ce travail, plusieurs voies ont été abordées afin de procéder à une analyse conformationnelle de composites XGs-cellulose. Dans un premier temps, pour améliorer le contraste isotopique par rapport aux travaux précédents, les XGs utilisés ont été marqués au ^{13}C et incorporés dans des milieux de culture d'*Acetobacter xylinum* appauvri en ^{13}C . Ceci permet, grâce à l'extinction des signaux de la cellulose d'observer les signaux relatifs aux XGs avec une efficacité accrue. Parallèlement, l'utilisation de cellulose marquée ^{13}C en présence de XGs naturels a permis de détecter d'éventuelles variations conformationnelles de la cellulose.

Ces analyses nécessitent l'utilisation de quantités importantes de XGs, ce qui limite le nombre d'essais réalisables. De plus, les conclusions apportées par la RMN sont d'ordre conformationnel et sont la conséquence de l'observation d'un état final mais ne permettent pas de déterminer les mécanismes impliqués. Enfin, les seuls XGs marqués au ^{13}C qui peuvent être produits au laboratoire sont ceux de *Rubus*, ce qui n'a pas permis d'étudier tous les paramètres envisagés. Il a donc été nécessaire de mettre au point d'autres méthodes d'analyse pouvant apporter des informations complémentaires sur les phénomènes mis en jeu lors de ces interactions et qui nécessiteront des quantités de substrats xyloglucosidiques plus faibles.

2.2. Isothermes d'adsorption

2.2.1. Description

L'analyse par détermination des isothermes d'adsorption est le moyen le plus simple d'évaluer la quantité de ligand adsorbée sur un substrat donné par la détermination de la concentration d'une solution de ce ligand avant et après incubation en présence du substrat. Ces isothermes d'adsorption représentent les variations de la quantité de ligand adsorbé, normalisée à la masse sèche de substrat, en fonction de sa concentration en solution à l'équilibre. Le déroulement de ce type d'expérience est représenté ci-dessous (Schéma 19).

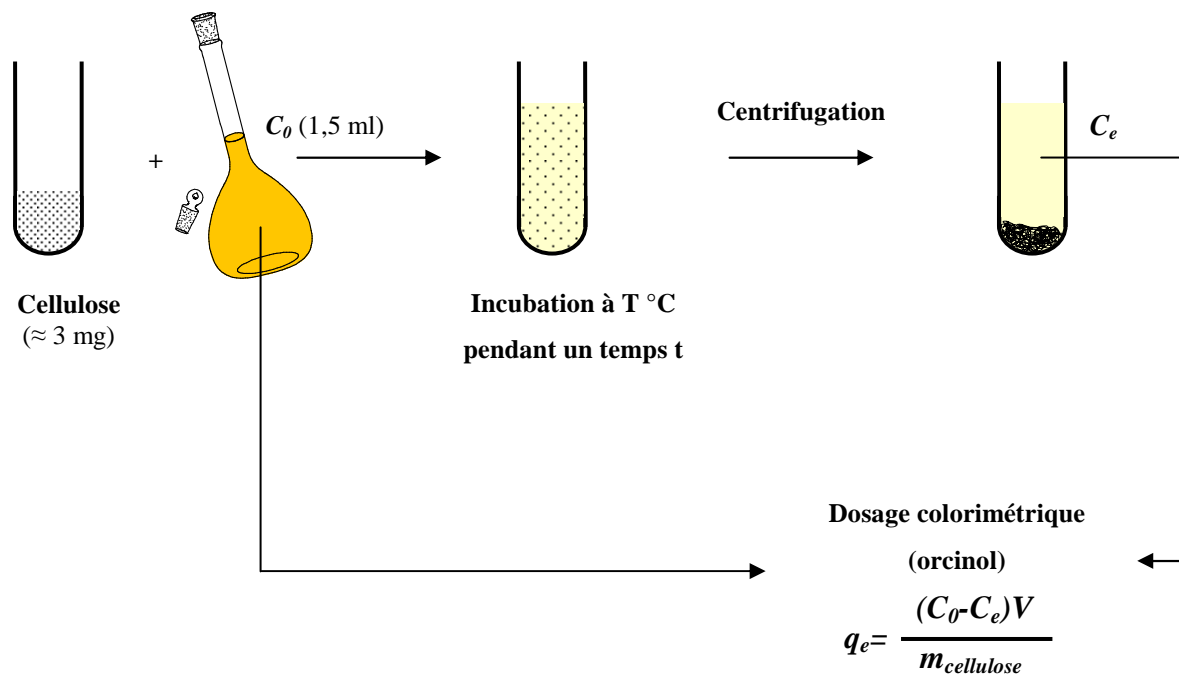


Schéma 19 : Schéma illustrant la technique de détermination d'un point d'une isotherme d'adsorption

Cette méthode est simple mais relativement longue car elle nécessite la détermination d'une dizaine de points par courbe avec des solutions initiales de concentrations variable. Les concentrations de XGs ou XGOs utilisées sont comprises entre 5 et 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ soit un rapport massique initial par rapport à la cellulose variant de 0,2 % à 70 %. Les quantités de produits xylogluco-oligosaccharidiques nécessaires ne sont pas très élevées en raison de la sensibilité du dosage colorimétrique à l'orcinoïl. Ceci a été un élément déterminant dans le choix de cette technique en raison des quantités limitées de XGOs disponibles.

2.2.2. Études préliminaires

Étude cinétique

Une étude cinétique a permis de déterminer le temps optimal d'incubation. La Figure 39 représente la cinétique d'adsorption de XGs de tamarin sur la BMCC et fait apparaître une durée d'incubation pour laquelle l'adsorption est maximale de 15 h. Des cinétiques d'adsorption de XGOs et des cinétiques de XGs à différentes températures ont également été effectuées, les courbes correspondantes ne sont pas représentées car le temps optimal était

également voisin de 15 h. La température d'adsorption ne semble avoir que peu d'influence sur la durée d'incubation nécessaire pour atteindre l'équilibre. Il est de toute façon indispensable, pour des raisons de reproductibilité et de comparabilité les essais, d'effectuer ces derniers dans des conditions rigoureusement identiques. La durée d'incubation de tous les essais d'isothermes d'adsorption a donc été fixée à 15 h.

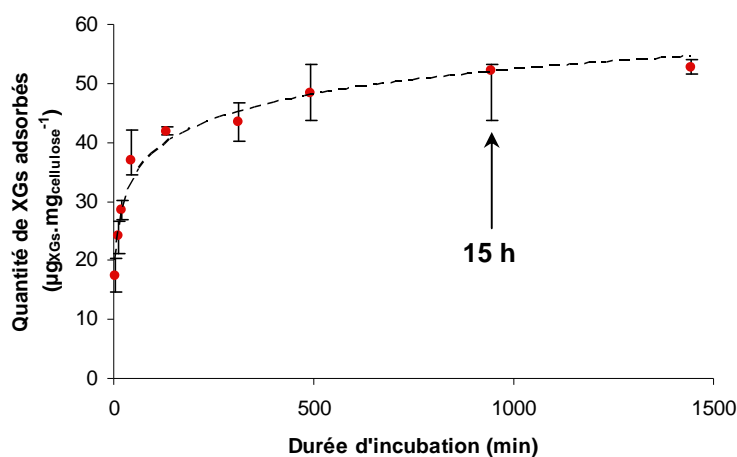


Figure 39 : Cinétique d'adsorption de XG_{T700} ($C_0 = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sur la BMCC à 40 °C

Les points représentés sont des moyennes sur 4 valeurs. Les barres d'erreur tiennent compte de l'ensemble des valeurs

Test d'adsorption non spécifique

Ce test d'adsorption non spécifique consiste à étudier le comportement d'un ligand ne possédant aucune affinité pour la BMCC et à déterminer s'il existe une adsorption parasite. Le pullulane, polymère constitué d'unités maltotriosyles liées par des liaisons α -1,6, ne possède aucune affinité pour la cellulose I, d'après Mishima *et al.*⁹⁵ et ne présente pas de propriétés agrégatives. Ce polysaccharide a donc été testé vis-à-vis du lot de BMCC utilisé. Aucune adsorption significative n'a été détectée ce qui montre qu'il n'y a pas d'adsorption non spécifique sur la BMCC.

2.2.3. Modèles de Langmuir, de Freundlich et de Scatchard

Afin de proposer une interprétation mécanistique des mesures d'adsorption et d'en déduire certaines grandeurs caractéristiques telles que la capacité maximale d'adsorption,

l'affinité d'adsorption ou encore l'indice d'hétérogénéité de la surface, certains modèles d'adsorption ont été utilisés.

Modèle de Langmuir

Le premier modèle considéré a été le modèle de Langmuir.¹⁴⁸ Les conditions d'application de ce modèle sont les suivantes :

- l'adsorption doit être celle d'un gaz ou plus généralement de molécules isolées indépendantes sur un solide
- il ne doit y avoir qu'un seul type de site d'interaction
- il ne doit pas y avoir d'interaction ligand/ligand mais uniquement substrat/ligand

Le modèle de Langmuir s'exprime alors sous la forme :

$$q_e = \frac{q_m b C_e}{1 + b C_e} \quad (1)$$

où q_e est la quantité de ligand adsorbée normalisée par rapport à la quantité de substrat, C_e la concentration de ligand libre à l'équilibre, q_m est la capacité d'adsorption maximale reliée au palier de l'isotherme et b l'affinité d'adsorption.

Ce modèle peut aussi s'exprimer sous une forme linéarisée :

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{b q_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad (2)$$

En outre, soit K_a la constante d'adsorption et K_d la constante de dissociation, l'affinité d'adsorption b peut alors s'exprimer de la façon suivante :

$$b = \frac{K_a}{K_d} \quad (3)$$

Modèle de Freundlich

Un second modèle, le modèle de Freundlich,¹⁴⁹ a ensuite été utilisé. Il s'exprime en loi de puissance selon l'équation 4 :

$$q_e = mC_e^{1/n} \quad (4)$$

où m est une grandeur qui décrit à la fois la capacité maximale d'adsorption q_m et l'affinité d'adsorption b et $1/n$ caractérise l'hétérogénéité de la surface et varie entre 0 si le système est hétérogène et 1 pour une surface homogène.

L'équation 4 peut également être linéarisée de la façon suivante :

$$\ln(q_e) = \ln(m) + \frac{1}{n} \ln(C_e) \quad (5)$$

Modèle de Scatchard

Enfin un troisième modèle, le modèle de Scatchard,¹⁵⁰ a également été utilisé, bien que sa pertinence soit contestée.¹⁵¹ Grâce au tracé de q_e/C_e en fonction de q_e ce modèle permet d'apprécier la coopérativité d'un système d'association. En effet, si la courbe obtenue est concave et ne présente donc pas de maximum, alors elle est généralement associée à un mécanisme d'adsorption présentant une hétérogénéité de sites et/ou un mécanisme anticoopératif où l'adsorption d'une molécule de ligand diminue la probabilité d'adsorption de la suivante. Au contraire, si la courbe présente une courbure convexe et un maximum, alors le mécanisme d'adsorption peut être considéré comme coopératif, où l'adsorption d'une molécule favorise l'adsorption de la suivante.

L'utilisation de ces trois modèles a donc permis de déduire des isothermes d'adsorption des données quantitatives. Le modèle de Langmuir a permis de déterminer l'adsorption maximale ainsi que l'affinité pour le substrat considéré. Une information sur l'hétérogénéité de la surface a pu être obtenue à partir du modèle de Freundlich grâce au

paramètre $1/n$. Enfin, le modèle de Scatchard a apporté des informations sur la coopérativité des mécanismes impliqués dans les interactions considérées.

Dans tous les cas, l'utilisation de ces modèles et les données qui en découlent doivent être interprétées avec une grande précaution en raison de leurs conditions d'utilisation qui, dans le cas présent, ne sont pas toujours remplies, en particulier le caractère indépendant des molécules adsorbées. Ces modèles ont été utilisés principalement à titre comparatif entre les différents substrats.

La détermination des isothermes d'adsorption est donc une technique efficace et qui ne nécessite que de faibles quantités de substrats pour l'évaluation de la capacité d'adsorption. De plus, l'utilisation de modèles d'adsorption permet, dans la limite de leur applicabilité, d'atteindre certaines grandeurs thermodynamiques liées aux mécanismes d'adsorption ainsi que de constater une éventuelle coopérativité. Néanmoins, il est difficile d'obtenir des informations enthalpiques, car d'une part la réversibilité du système n'a jusqu'à présent pas été démontrée avec certitude et d'autre part le caractère enthalpique est faible ce qui, en raison des imprécisions de mesure, rend cette méthode peu fiable pour la détermination de données enthalpiques. Par contre, ceci peut être approché directement par la titration calorimétrique isotherme.

2.3. Titration calorimétrique isotherme (ITC)

La titration calorimétrique, est une méthode thermodynamique largement utilisée pour l'étude des interactions entre deux espèces, le plus souvent en solution à température constante. Elle permet d'accéder directement aux grandeurs thermodynamiques du système considéré, telles que, la constante d'association (K_a), la stoechiométrie (n) du complexe ainsi que l'enthalpie standard de réaction (ΔH), l'enthalpie libre (ΔG), l'entropie (ΔS) et la capacité calorifique (ΔC_p) qui peut être déterminée en faisant varier la température.

Cette technique a de nombreuses applications comme l'étude des interactions protéine-protéine,^{152,153} protéine-ligand,¹⁵⁴ enzyme-inhibiteur^{155,156} ou d'association supramoléculaire de polymères.¹⁵⁷

2.3.1. Principe de la méthode

Une expérience de titration calorimétrique isotherme est réalisée en titrant une solution de « substrat » contenue dans une cellule, par un « ligand » injecté en plusieurs fois au cours du temps. Lorsque les deux espèces interagissent, il y a libération ou absorption d'énergie thermique. Celle-ci est mesurée grâce à la détermination de la puissance électrique ($J.s^{-1}$) à fournir pour maintenir la cellule de mesure et la cellule de référence, contenant le solvant seul, à la même température. Ainsi, chaque pic de puissance correspond à une chaleur absorbée ou dégagée lors de l'ajout du ligand sur le substrat.

Le dispositif expérimental de l'analyse ITC est représenté Figure 40. Les deux cellules sont maintenues dans une enceinte adiabatique et l'addition de ligand est effectuée au moyen d'une seringue de précision pilotée par ordinateur. Le contenu de la cellule de mesure est agité par un moteur électrique.

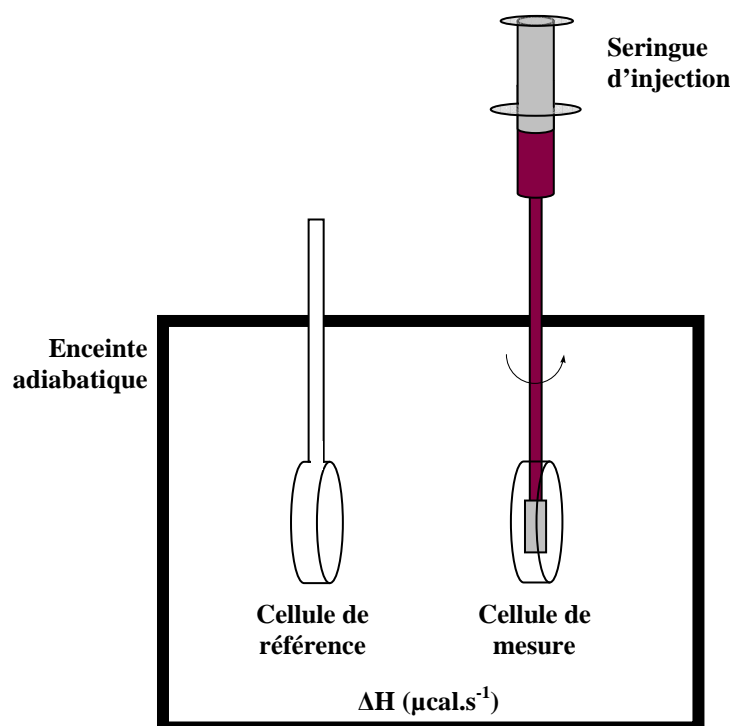


Figure 40: Dispositif expérimental de mesure ITC

Plusieurs paramètres peuvent être modifiés pour optimiser l'analyse : vitesse d'agitation, quantités injectées, vitesse d'injection, intervalle de temps entre deux injections....

2.3.2. Exploitation des résultats

Une série d'injections permet d'obtenir un graphique représentant la compensation de puissance nécessaire pour maintenir une température constante au cours du temps à l'intérieur de la cellule de mesure (Figure 41A). La hauteur de chaque pic observé sur ce tracé est proportionnelle à l'évolution de la température dans la cellule au cours de l'injection. L'intégration de ces pics permet de déterminer l'évolution de l'enthalpie de réaction du système (Figure 41B). Ainsi, un pic dirigé vers le bas est le signe d'un processus exothermique alors que dans le sens opposé, le pic observé est la conséquence d'un phénomène endothermique. La valeur de l'enthalpie de réaction est alors respectivement négative ou positive.

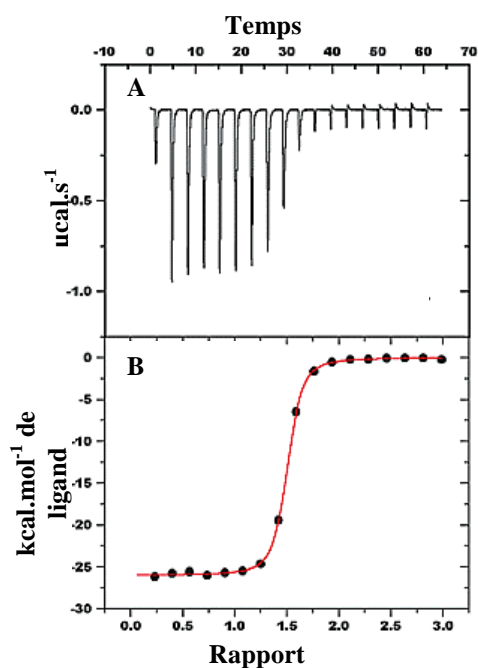
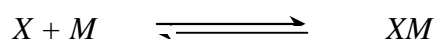


Figure 41 : Exemple de titrage ITC : le signal brut enregistré au cours de la mesure (A), donne, par intégration des pics par rapport au temps et normalisation à la concentration de ligand, une sigmoïde (B)

A partir de l'évolution de l'enthalpie en fonction de la quantité de ligand injectée, plusieurs valeurs thermodynamiques propres au système peuvent alors être déterminées.

Si l'on considère qu'il n'y a qu'un seul type de site, soit un équilibre de type :



et si, par ailleurs, K_a désigne la constante d'association, n le nombre de sites complexant, V_0 le volume de la cellule, M_0 et M_t les concentrations initiale et à l'instant t du substrat dans la cellule, X_0 et X_t les concentrations initiale et à un instant t du ligand dans la cellule et Θ la fraction de sites occupés par le ligand X alors :

$$K_a = \frac{\Theta}{(1-\Theta)X_0} \quad (6) \quad \text{et} \quad X_t = X_0 + n\Theta M_t \quad (7)$$

Ainsi, les équations (6) et (7) donnent l'équation quadratique suivante :

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \quad (8)$$

Or, la valeur de Q , chaleur totale dégagée est donnée par :

$$Q = n\Theta M_t \Delta H V_0 \quad (9)$$

Ainsi la solution de cette équation (8) injectée dans l'équation (9) permet d'obtenir l'expression :

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} \right)^2 - \left(\frac{4X_t}{nM_t} \right)} \right] \quad (10)$$

Soit Q_i la chaleur totale dégagée après la $i^{\text{ème}}$ injection liée aux paramètres ajustables K_a , n et ΔH° , la chaleur dégagée au cours de la $i^{\text{ème}}$ injection est donc :

$$\Delta Q_i = Q_i + \frac{\Delta V_i}{V_0} \left[\frac{Q_i + Q_{i-1}}{2} \right] - Q_{i-1} \quad (11)$$

où ΔV_i désigne le volume de ligand injecté au cours de l'injection i .

Plusieurs analyses ITC réalisées à des températures différentes peuvent permettre de déterminer la capacité calorifique d'adsorption, à partir de la loi de Kirschhoff, à pression et composition constante :

$$\Delta C_p = \frac{\Delta H_{T_2}^0 - \Delta H_{T_1}^0}{T_2 - T_1} \quad (12)$$

Ces différentes méthodes d'analyse des interactions XGs-cellulose décrites permettent donc, en théorie, d'accéder à des informations complémentaires et de rassembler ainsi des données thermodynamiques et structurales utiles pour la détermination de la nature et des mécanismes d'interaction.

3. Choix et analyse des substrats

Les contraintes expérimentales liées aux techniques utilisées requièrent l'adaptation des substrats en fonction de la technique utilisée. Un compromis a dû être fait entre la pertinence des substrats par rapport à la paroi végétale, les quantités de substrats disponibles et le comportement de certains substrats utilisés en termes d'agrégation ou d'enchevêtrement.

3.1. Substrats cellulosiques

De nombreuses études d'interactions polysaccharides-cellulose ont été réalisées par détermination des isothermes d'adsorption en utilisant la cellulose microcristalline de type Avicel.^{79,91} Or, cette dernière présente une importante hétérogénéité en raison de la présence d'agglomérats, qui peuvent nuire à la reproductibilité des essais d'adsorption. Par ailleurs, ce type de cellulose contient des substances saccharidiques résiduelles autres que la cellulose elle-même, ce qui, malgré la détermination de blanc, peut amener à augmenter les erreurs de mesure. Ces inconvénients n'ont pas été constatés dans le cas de la Cellulose Bactérienne MicroCristalline (BMCC), obtenue par hydrolyse de la cellulose bactérienne, qui a donc été choisie pour cette étude. L'érosion des zones amorphes les plus accessibles par hydrolyse acide conduit à l'individualisation de segments homogènes à partir des rubans initiaux de cellulose bactérienne. La masse molaire moyenne, déterminée par chromatographie

d'exclusion stérique en milieu LiCl DMAC¹⁵⁸ (Anne-Laurence Dupont, MHN, Paris), est de $73.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, soit un degré de polymérisation de 450 Cette valeur est du même ordre de grandeur que les masses molaires de BMCC reportées dans la littérature.^{159,160} Par rapport à la cellulose bactérienne, qui est plus contraignante à manipuler, les chaînes sont plus courtes et la surface spécifique plus importante. De plus, la tendance à l'agrégation ou à l'enchevêtrement est amoindrie après hydrolyse. Cette cellulose, dont la surface a été nettoyée de toutes les impuretés telles que les acides uroniques par exemple, offre un état de pureté inaccessible dans le cas de fibrilles issues de parois végétales comme la cellulose microcristalline commerciale de type Avicel. L'adsorption de XGs sur ce type de cellulose a été comparée à l'adsorption sur la cellulose de type Avicel couramment utilisée. La Figure 42 montre bien une adsorption très largement favorisée dans le cas de la BMCC.

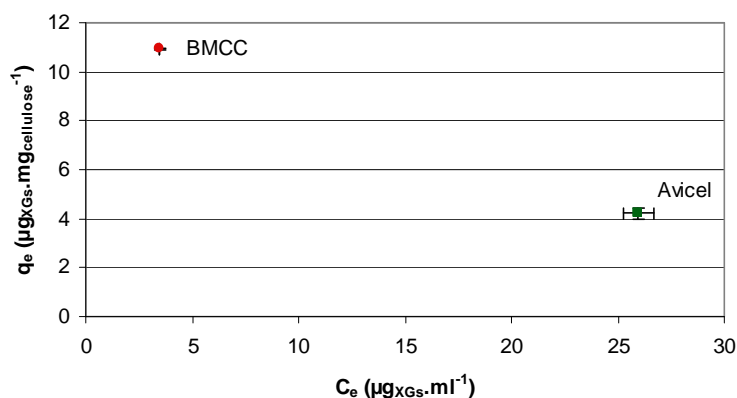


Figure 42 : Comparaison de l'adsorption à 40 °C de XGs de tamarin sur la BMCC et la cellulose de type Avicel

L'adsorption, plus grande dans le cas de la BMCC, permet donc d'atteindre une meilleure précision dans les résultats, tout en minimisant les quantités de XGOs et XGs utilisées. Par ailleurs, les composites XGs-cellulose étudiés en RMN dont les résultats seront présentés ultérieurement (§ 6) ont été réalisés à partir de culture de cellulose bactérienne, ce qui, dans un souci de cohérence, conforte le choix de la BMCC comme substrat cellulosique pour la détermination des isothermes d'adsorption.

Par contre, l'utilisation de la BMCC en Titration Calorimétrique Isotherme n'est pas envisageable. En effet, il est souhaitable, pour ce type d'analyse, que les deux espèces soient solubles ou au moins suffisamment bien dispersées dans le milieu considéré, d'une part pour

permettre une analyse exploitable et dans une moindre mesure pour pouvoir nettoyer la cellule de manière satisfaisante. Or, la BMCC forme dans l'eau une suspension qui floccule très facilement. A défaut, pour cette technique, des particules de cellulose comportant des charges à la surface, dénommées « whiskers », ont été utilisées. Ces particules de cellulose peuvent être obtenues par hydrolyse de la cellulose à l'acide chlorhydrique ou bien à l'acide sulfurique.^{161,162} La voie d'hydrolyse sulfurique de filtre Whatmann a été utilisée dans le cas présent. D'après des analyses en microscopie électronique, la morphologie de ces whiskers est similaire à celle de la BMCC (Figure 43).

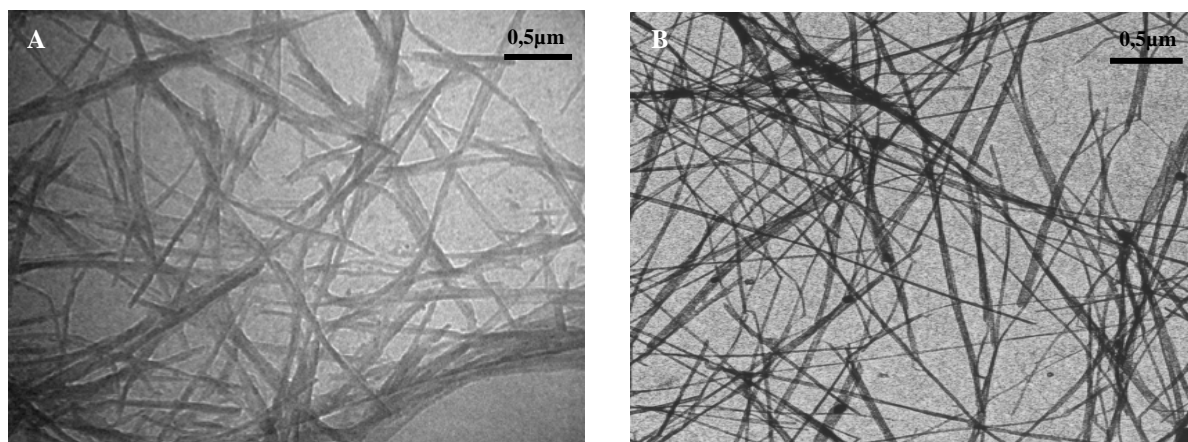


Figure 43: Microscopie électronique en transmission (coloration négative) des deux types de cellulose utilisés : la BMCC (A) Cédric Gaillard (INRA-Nantes) et les whiskers de cellulose (B) Laurent Heux (CERMAV-Grenoble)

La présence de charges à la surface des whiskers, permet d'obtenir une dispersion colloïdale dans l'eau pure grâce à la répulsion électrostatique interparticulaire. Un degré de substitution (d_s) de $8,3 \cdot 10^{-4}$ a été déterminé par dosage conductimétrique des whiskers (Chapitre 4, § 2.6). Bien que le caractère chargé des whiskers les différencie également des microfibrilles des parois, la très faible proportion de charges présentes permet de considérer le phénomène d'adsorption suffisamment représentatif. Des tests de variation de la densité de charge ont été néanmoins réalisés pour confirmer cette hypothèse et seront présentés ultérieurement (§ 5.2.2).

3.2. Substrats xyloglucosidiques

En raison de leur solubilité dans l'eau, l'utilisation des substrats xyloglucosidiques est soumise à moins de contraintes que les substrats.

Cependant, en ITC, l'association de XGs de tamarin natifs, qui ont une masse molaire moyenne élevée, et des whiskers de cellulose a donné lieu à la formation d'agrégats qui perturbent très fortement le signal et rendent impossible l'analyse des données. En conséquence, les substrats xyloglucosidiques de masses molaires inférieures ont été utilisés en ITC et en particulier les fractions obtenues par hydrolyse partielle et précipitation fractionnée (Chapitre 2, § 1.2.1) qui ont été préparées en quantités relativement importantes.

L'adaptation des substrats aux techniques utilisées a donc permis d'optimiser les conditions d'analyse des interactions. Cependant, afin de comparer les résultats issus des différentes méthodes utilisées, pour étudier les interactions cellulose-XGs, il a été nécessaire de vérifier que ces derniers n'étaient pas directement liés à une caractéristique propre du substrat. Ces vérifications seront décrites dans la suite de ce document.

4. Influence de la structure des substrats xyloglucosidiques sur la capacité d'interaction

Malgré les nombreuses études qui ont été menées pour tenter de déterminer l'influence de la structure des XGs sur les interactions XGs-cellulose, certaines conclusions sont contradictoires. Au cours de ce paragraphe, l'influence de plusieurs caractéristiques structurales, telles que la masse molaire moyenne ou le degré de substitution, sur la capacité d'interaction a été étudié.

4.1. Influence de la masse molaire

4.1.1. Isothermes d'adsorption de différents XGs et XGOs

L'influence de la taille des XGOs a été largement étudiée par différents auteurs comme il a été mentionné dans le Chapitre 1. Les conclusions sont contradictoires et l'objectif ici a été de confirmer ou d'infirmer l'existence d'une masse molaire optimale et de déterminer la structure minimale donnant lieu à des interactions.

Les isothermes d'adsorption ont été déterminées pour les fractions $[XGO]_2$ et $[XGO]_3$, issus de XGs de tamarin, ainsi que pour les deux lots de XGs natifs, XG_{T700} et XG_{T100} . La Figure 44 représente ces différentes isothermes.

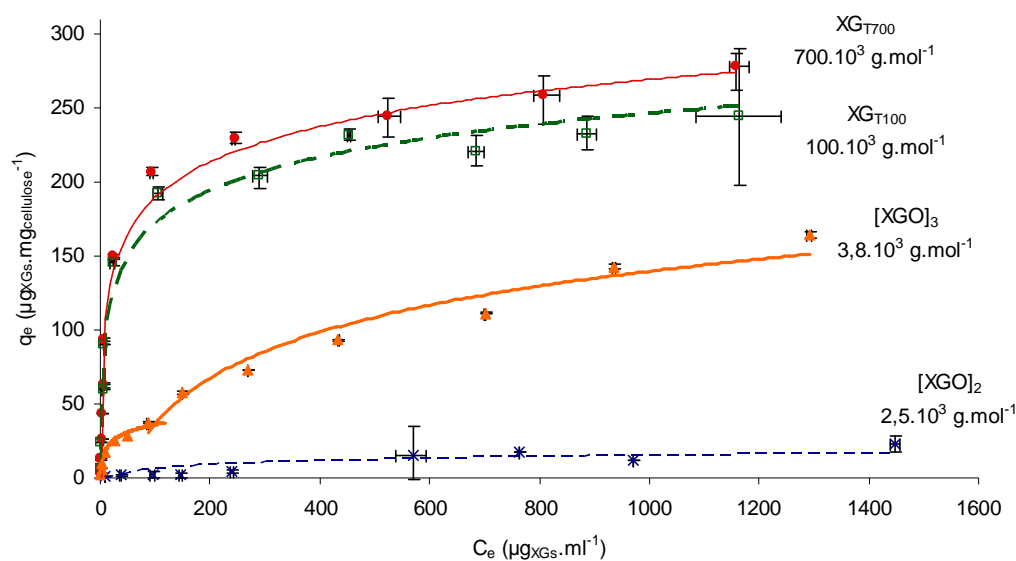


Figure 44 : Isothermes d'adsorption de XGOs et XGs de tamarin sur la BMCC à 40 °C

Dans les quatre cas, l'adsorption est croissante en fonction de l'augmentation de la quantité de substrat xyloglucosidique. La capacité d'adsorption maximale est nettement plus importante pour les $[XGO]_3$ que pour la fraction $[XGO]_2$, en effet celle-ci varie d'environ $15 \mu\text{g}_{\text{XGs}} \cdot \text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$ à $150 \mu\text{g}_{\text{XGs}} \cdot \text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$. Pour les deux autres lots utilisés, de masses molaires plus importantes, la capacité maximale d'adsorption est du même ordre de grandeur.

Alors que les deux lots de masses molaires importantes présentent une évolution régulière de la quantité de XGs adsorbée, l'isotherme obtenue à partir de [XGO]₃ montre un changement de comportement pour $C_e \approx 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

L'analyse de ces quatre isothermes a permis de confirmer l'hypothèse d'une augmentation de la capacité d'adsorption en fonction de la masse molaire. De plus, contrairement à l'hypothèse évoquée dans la littérature, il ne semble y avoir de masse optimale pour l'adsorption. En effet, les XG_{T700}, de masse molaire moyenne 7 fois plus élevée que ceux extraits au laboratoire (XG_{T100}), s'adsorbent en quantité légèrement plus importante. Or, d'après la littérature,⁹⁰ cette masse optimale se situerait entre $20 \cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $60 \cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ceci impliquerait alors que l'adsorption soit décroissante en fonction de la masse molaire pour des valeurs supérieures, ce qui n'a pas été observé ici.

Cette augmentation d'affinité n'est cependant pas proportionnelle à la masse molaire. En effet, les [XGO]₂ de masse molaire moyenne $2,5 \cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ n'ont pas présenté d'adsorption significative, alors que les [XGO]₃, de masse molaire moyenne $3,8 \cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ont une adsorption maximale de l'ordre de $150 \mu\text{g}_{\text{XGs}}\cdot\text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$. De plus, malgré une taille près de 200 fois plus importante, les XG_{T700} n'ont été adsorbés qu'en quantité deux fois plus importante.

Cette grande différence de comportement entre les [XGO]₂ et les [XGO]₃ a également été observée lors de la préparation de composites de cellulose bactérienne dans un milieu contenant des [XGO]₂ ou des [XGO]₃. En effet, ces derniers ont été observés au sein du composite par analyse d'oses neutres ($\%_{\text{Xyl}} = 0,3 \%$), alors que cette même analyse sur la cellulose obtenue de façon identique, en présence de [XGO]₂, n'a pas permis de détecter la présence de xylose en quantité significative.

Cette adsorption significative des [XGO]₃ montre que ces derniers constituent la structure minimale de reconnaissance pour les XGOs composés de motifs élémentaires. Il est alors envisageable que ces structures constituent les « trains » décrits par Vincken (Figure 45), lors de ces études d'adsorption de XGs de tamarin natifs sur la cellulose microcristalline de type Avicel.

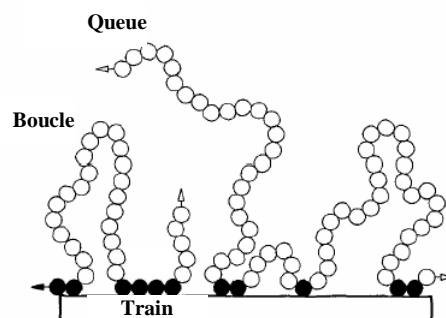


Figure 45 : Représentation des différents domaines des XGs de tamarin en interaction avec la cellulose ⁹⁰

L'absence d'adsorption des XGOs comportant deux motifs élémentaires est contradictoire avec la détermination par Hayashi *et al.*⁸⁹ de GXXXGol comme motif minimal susceptible d'interagir avec la cellulose, mais en accord avec les travaux de Vincken *et al.*⁹⁰ qui mentionnent que les XGOs constitués de trois motifs élémentaires sont ceux de masses molaires les plus faibles présentant une adsorption significative.

Enfin, la présence, sur l'isotherme obtenue à partir de la fraction [XGO]₃, d'un changement de comportement, à faible concentration à l'équilibre ($C_e \approx 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), pourrait être la conséquence de la présence de deux mécanismes d'interaction. Il a été nécessaire de vérifier cette hypothèse et l'utilisation des modèles précédemment décrits a été un moyen pertinent pour exploiter plus en détail les isothermes d'adsorption.

4.1.2. Exploitation des données à partir des modèles d'adsorption existants

Afin de quantifier plus précisément l'adsorption, les modèles présentés précédemment (§ 2-1-2) ont été utilisés. La Figure 46 représente les tracés relatifs au modèle de Langmuir, dans lesquels le quotient C_e/q_e est une fonction linéaire de C_e , obtenus à partir des courbes d'adsorption précédentes. Étant donné sa faible capacité d'adsorption la fraction [XGO]₂ n'a pas été prise en compte.

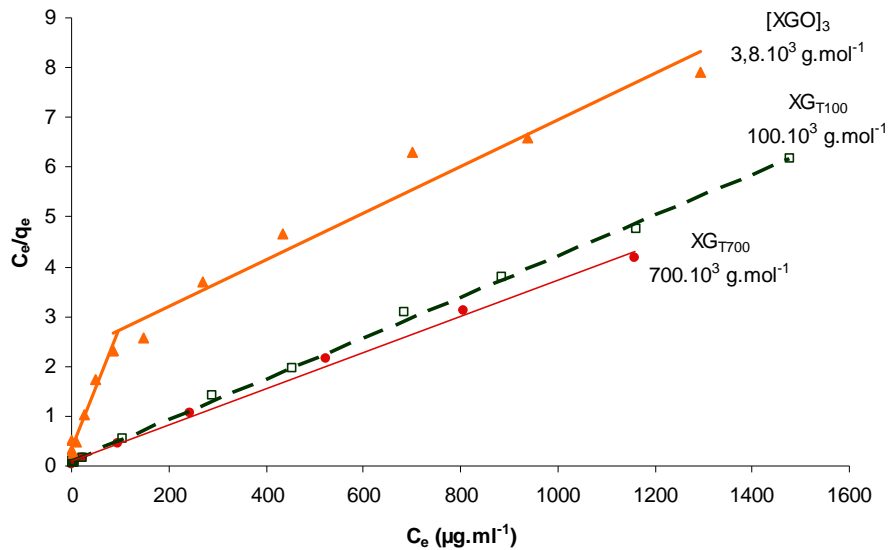


Figure 46 : Application du modèle de Langmuir aux isothermes d'adsorption des XGs de tamarin 100.10^3 g.mol^{-1} et 700.10^3 g.mol^{-1} et des $[XGO]_3$ sur la BMCC

Les courbes obtenues montrent clairement que les données relatives aux $[XGO]_3$ présentent une rupture de pente et doivent être approximées par deux droites alors que les données obtenues pour les XG_{T100} et XG_{T700} se positionnent sur une seule droite. Or, d'après le modèle de Langmuir la représentation de $C_e/q_e = f(C_e)$ est linéaire si l'adsorption a lieu sur un ensemble de sites homogènes, il est donc possible d'envisager que les $[XGO]_3$ s'adsorbent, sur la BMCC, via deux sites distincts. Ces tracés ont aussi permis de déterminer les grandeurs caractéristiques telles que la capacité maximale d'adsorption (q_m) ainsi que l'affinité d'interaction (b) contenues dans l'équation de Langmuir rappelée ci-dessous :

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{bq_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad (2)$$

Le Tableau 15 rassemble les valeurs des paramètres relatifs aux approximations linéaires (a_1 , a_2 et R^2), ainsi que les grandeurs qui en découlent (q_m et b).

XGs ou XGOs	a_1	a_2	R^2	$q_m = 1/a_1$	$b = 1/a_2q_m$
$[XGO]_3^{1*}$	0,0242	0,3369	0,9723	41,3	$7,2 \cdot 10^{-2}$
$[XGO]_3^{2**}$	0,0047	2,2724	0,9573	212,8	$2,07 \cdot 10^{-3}$
XG_{T100}	0,0041	0,1024	0,9985	243,9	$4,0 \cdot 10^{-2}$
XG_{T700}	0,0037	0,0838	0,9972	270,3	$4,4 \cdot 10^{-2}$

Tableau 15 : Coefficients directeurs (a_1), ordonnées à l'origine (a_2) et coefficients de corrélation (R^2) des approximations linéaires relatives à l'application du modèle de Langmuir

* premier site d'adsorption de $[XGO]_3$, $C_e \in [0 ; 100]$

** second site d'adsorption de $[XGO]_3$, $C_e \in [100 ; 1400]$

Bien que les conditions d'application du modèle de Langmuir ne soient pas totalement remplies, la comparaison des différentes grandeurs ainsi calculées permet d'apporter des précisions sur les modes d'interaction.

Tout d'abord, l'adsorption des $[XGO]_3$ sur la BMCC semble se faire sur deux types de sites différents, le premier présentant une faible capacité maximale d'adsorption et une constante d'affinité forte et le second présente une faible affinité mais une capacité maximale d'adsorption nettement plus importante. Pour les lots de XG_{T100} et XG_{T700} , la capacité maximale d'adsorption augmente avec la masse molaire et l'affinité d'adsorption est similaire. Il semble que, contrairement aux XGOs de taille plus faible, les XGs natifs interagissent via un seul type de site apparent. L'absence d'un des deux types de site dans le cas des XGs natifs, de masses molaires plus importantes, peut être due soit au fait que les XGs natifs, en raison de leur longueur de chaîne, ne fassent apparaître qu'une moyenne des différents sites disponibles, soit au fait qu'étant plus longs, les XGs natifs ne peuvent pas accéder à certains sites. Il est alors possible d'envisager deux sites d'interaction présents sur la BMCC, un site facilement accessible par les XGOs et de forte affinité qui pourrait se situer au niveau des rainures de la BMCC présentes le long des différents éléments constitutifs ou en bout d'unité et un second à la surface de la cellulose (Annexe 10). En effet, l'affinité représente le rapport entre les constantes d'association et de dissociation. Une constante d'affinité plus forte signifie donc une difficulté plus grande pour les chaînes xyloglucosidiques à se dissocier de la cellulose, ceci est cohérent avec la localisation des interactions de forte affinité dans des espaces exigus. L'accessibilité réduite des rainures pourrait également expliquer l'absence de ce type de site lors de l'étude de l'adsorption des XGs natifs, trop long pour pénétrer dans ces espaces. Les sites d'interaction présents à la

surface du substrat cellulosique sont, au contraire, accessibles pour tous les substrats xyloglucosidiques. Ceci est cohérent avec l'ordre de grandeur de la capacité maximale d'adsorption pour ce site de surface qui est identique dans les trois cas et comprise entre 210 et 270 $\mu\text{g}_{\text{XGs}} \cdot \text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$.

Il est alors possible de représenter l'adsorption des XGOs et des XGs sur la BMCC de la façon suivante (Figure 47) :

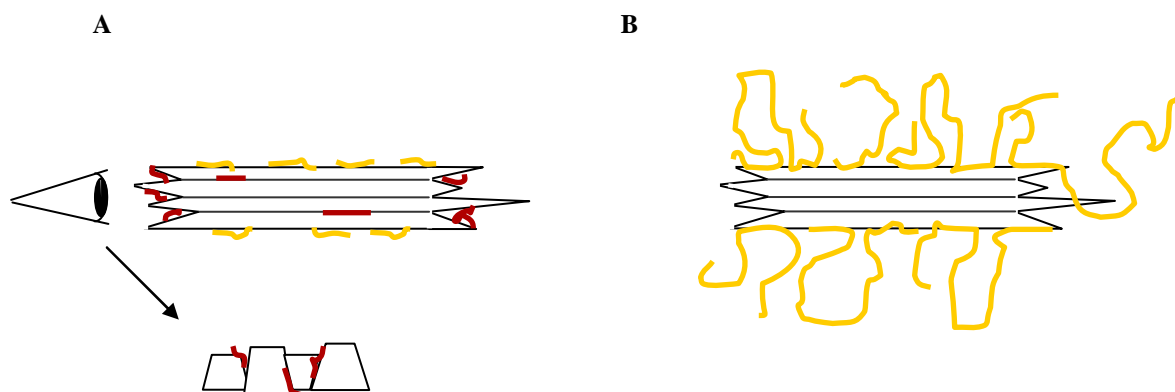


Figure 47 : Représentation des deux sites d'interaction de la BMCC vis à vis des $[\text{XGO}]_3$ (A) et des XGs de tamarin (B)

En complément du modèle de Langmuir, l'application du modèle de Freundlich a permis de confirmer la présence de deux sites d'adsorption des $[\text{XGO}]_3$ sur la BMCC. En effet, le tracé de l'isotherme à l'échelle logarithmique fait apparaître deux droites (Figure 48).

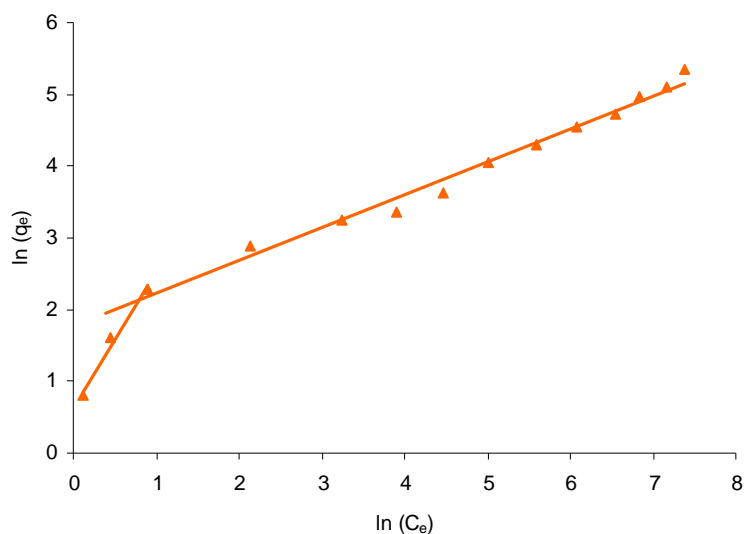


Figure 48 : Application du modèle de Freundlich à l'adsorption de $[\text{XGO}]_3$ sur la BMCC

Les données relatives aux approximations linéaires (a_1 , a_2 et R^2), ainsi que les grandeurs qui en découlent (m et n) sont rassemblées dans le Tableau 16.

	a_1	a_2	R^2	$1/n = a_1$	$m = \exp(a_2)$
$[XGO]_3^{1*}$	1,9312	0,6298	0,9837	1,9	1,9
$[XGO]_3^{2**}$	0,4596	1,7626	0,9843	0,5	5,8
XG_{T700}	0,4700	2,8546	0,8798	0,5	17,4

Tableau 16 : Données caractéristiques de l'adsorption des XG_{T700} et $[XGO]_3$ sur la BMCC déterminées à partir du modèle de Freundlich

Les valeurs du coefficient m déterminées par ce modèle confirment bien que le pouvoir adsorbant du site 2 de la BMCC est nettement plus important que pour le site 1 envers les $[XGO]_3$. Il semble donc que le modèle de Freundlich confirme les conclusions déduites du modèle de Langmuir. Les valeurs du paramètre $1/n$ ne sont quant à elle pas significatives car, malgré leur différence, aucune n'est proche de 0, signe d'homogénéité de la surface ou de l'unité, caractérisant l'hétérogénéité de celle-ci. Les valeurs relatives aux XG_{T700} et XG_{T100} sont similaires. Seuls les coefficients issus des données obtenues à partir des XG_{T700} sont mentionnés dans le Tableau 16. La valeur du paramètre $1/n$ est identique à celle déterminée pour le site 2 des $[XGO]_3$ ce qui confirme que ces deux adsorptions ont lieu probablement sur le même site de la cellulose. La valeur de m est quant à elle plus élevée pour les XG_{T700} en raison de leur meilleure affinité qui a été démontrée précédemment (§ 4.1.1).

Le modèle de Scatchard, appliqué aux données relatives aux XG_{T700} et aux $[XGO]_3$ partiellement hydrolysés, a également permis de mettre en évidence une différence de comportement de ces deux substrats. Le tracé de $q_e/C_e = f(q_e)$ est représenté pour les XG_{T700} ainsi que pour les $[XGO]_3$ sur la Figure 49.

Dans le cas des XG_{T700} , identique à celui des XG_{T100} (non représenté), la représentation de q_e/C_e en fonction de q_e a fait apparaître un maximum, ce qui est indicatif d'un mécanisme d'interaction coopératif. Par ailleurs, l'application de ce même modèle à l'adsorption de $[XGO]_3$ ne présente pas d'extremum et l'allure de la courbe est concave, ce qui, d'après ce modèle, est caractéristique d'un mécanisme anticoopératif où l'adsorption d'une molécule de XGs prévaut sur la suivante.

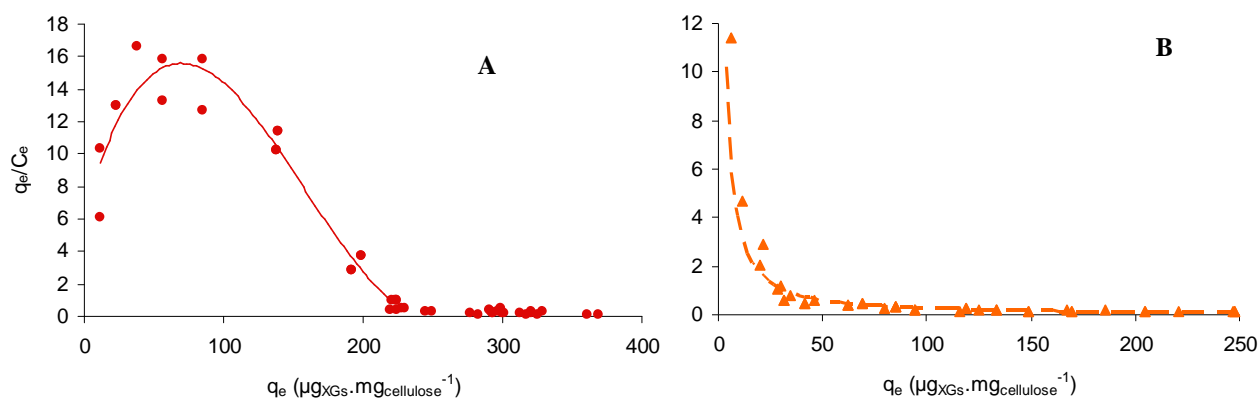


Figure 49 : Application du modèle de Scatchard aux isothermes d'adsorption de XG_{T700} , $M_w = 700.10^3$ g.mol⁻¹ (A) et de $[XGO]_3$, $M_w = 3,8.10^3$ g.mol⁻¹ (B) sur la BMCC

L'adsorption des XGs de tailles variables a donc permis de vérifier que la capacité d'adsorption est croissante en fonction de la masse molaire des XGs et XGOs étudiés. De plus, les XGOs comportant douze résidus glucosyle sont les structures minimales capables d'interagir avec la cellulose. Par ailleurs, l'application des modèles de Langmuir et de Freundlich a mis en évidence la présence d'une adsorption hétérogène des XGOs via deux types de site. Le modèle de Scatchard a quant à lui permis de conclure à la coopérativité de l'adsorption de XG_{T700} et à l'anticoopérativité des $[XGO]_3$ de masse molaire moyenne nettement plus faible.

4.2. Influence du degré de substitution

4.2.1. XGs de structure

Les XGs de structure utilisés sont les XGs de *Rubus* dont l'extraction a été décrite précédemment (Chapite 2, §2.1). Ces XGs de structure présentent la particularité d'être fucosylés contrairement aux XGs de réserve, dont les XGs de tamarin. Deux lots ont été étudiés, les XGs de *Rubus* Extra-Cellulaires (XG_{REC}) et les XGs de *Rubus* Pariétaux (XG_{RP}). Les isothermes d'adsorption correspondantes sont représentées Figure 50 et comparées à celle obtenue pour les XG_{T100} de masse molaire moyenne équivalente aux XG_{RP} .

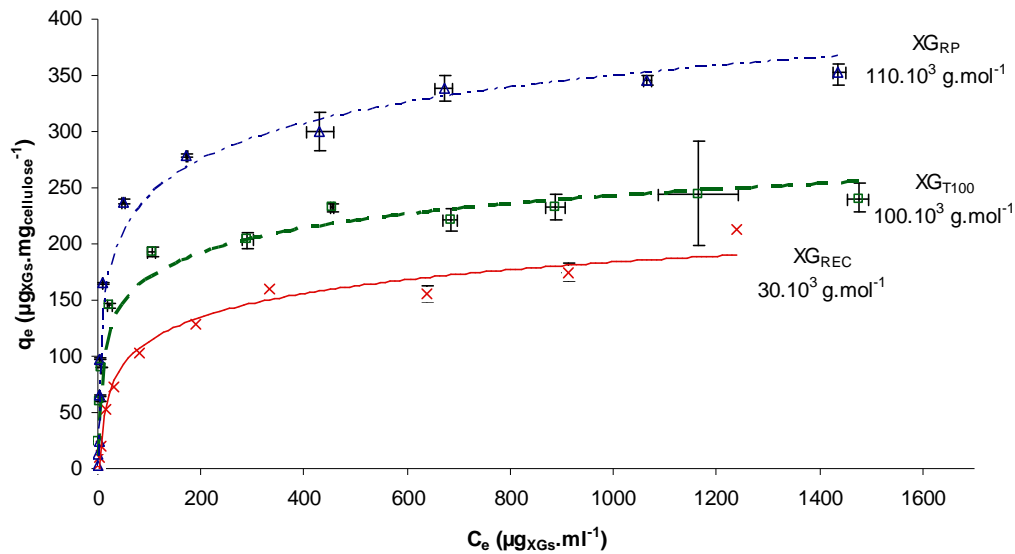


Figure 50 : Isothermes d'adsorption de XGs de *Rubus* Extra-Cellulaires (XG_{REC}) et de *Rubus* Pariétaux (XG_{RP}) sur la BMCC à 40 °C comparées à celle des XG_{T100}

Les isothermes obtenues dans les trois cas présentent une allure générale comparable mais des niveaux de capacité d'adsorption maximale différents. Ainsi, les XG_{RP} possèdent une capacité d'adsorption maximale de $350 \mu\text{g}_{\text{XGs}} \cdot \text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$ supérieure aux XG_{T100} ($250 \mu\text{g}_{\text{XGs}} \cdot \text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$). Les XG_{REC} , de masse molaire moyenne plus faible, présentent quant à eux l'adsorption maximale la plus faible, de l'ordre de $150 \mu\text{g}_{\text{XGs}} \cdot \text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$.

La comparaison des isothermes relatives aux XG_{REC} de masse molaire $30 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ et aux XG_{RP} de masse molaire quatre fois plus importante, illustre l'amélioration de la capacité d'adsorption en fonction de la masse molaire et de l'absence de masse molaire optimale.

Par ailleurs, la capacité d'adsorption des XG_{RP} est de $350 \mu\text{g}_{\text{XGs}} \cdot \text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$, alors que les XG_{T100} , de masse molaire moyenne similaire, n'interagissent avec la BMCC qu'à hauteur de $250 \mu\text{g}_{\text{XGs}} \cdot \text{mg}_{\text{cellulose}}^{-1}$. La différence de capacité d'adsorption n'est donc pas liée, dans ce cas, à la taille des molécules mais très probablement à la différence de composition des chaînes latérales ou à leur répartition. Le Tableau 17 rassemble les proportions d'oses neutres ainsi que les masses molaires moyennes et les indices de polydispersité de ces XGs déterminés lors du chapitre précédent (Chapitre 2, § 1.1 et 1.2).

	Oses Neutres				Chromatographie d'exclusion stérique	
	Glc	Xyl	Gal	Fuc	M _w (g.mol ⁻¹)	I _p
XG _{T100}	1,1	1,0	0,4	-	100.10 ³	1,7
XG _{REC}	1,4	1,0	0,4	0,2	30.10 ³	1,5
XG _{RP}	1,3	1,0	0,4	0,3	110.10 ³	4,1

Tableau 17 : Récapitulatif des caractéristiques des XGs de tamarin extraits de graines, des XG_{REC} et des XG_{RP}

L'analyse de la composition en oses neutres a montré que les chaînes latérales sont légèrement moins nombreuses sur les XG_{RP} que sur les XG_{T100}. Ceci laisse supposer que l'augmentation du nombre de résidus glucosyle non substitués est favorable aux interactions, mais la faible différence observée ne peut pas justifier d'une telle variation de la capacité d'adsorption. La composition et la répartition des chaînes latérales sont quant à elles des facteurs certainement plus influents. La présence de résidus fucosyle au niveau des chaînes latérales des XGs de *Rubus* apparaît comme la différence la plus importante entre ces derniers et les XG_{T100}. Cependant, une variation de répartition de ces ramifications peut également être la cause de la variation de capacité d'adsorption observée. La proportion de résidus galactosyle est identique dans le cas des XG_{T100} et XG_{RP}, cependant les XG_{RP} possèdent des résidus fucosyle et donc un tiers de chaînes latérales trisaccharidiques. Ainsi, l'augmentation de la longueur des chaînes latérales pourrait favoriser l'adsorption des XGs par modification de leur conformation comme mentionné dans la littérature.¹⁰⁰

4.2.2. Influence des résidus galactosyle

En raison de l'insolubilité dans l'eau des XGs de tamarin de masses molaires importantes dégalactosylés, l'étude de l'influence des résidus galactosyle sur l'adsorption des XGs sur la cellulose n'a pu se faire que sur des oligosaccharides.

Par ailleurs, la synthèse chimio-enzymatique a permis de disposer de XGOs présentant un taux de substitution et une position des résidus galactosyle bien définis. Les isothermes d'adsorption des composés (XXXG)₃ (**21**) et (XXLG)₃ (**22**) sur la BMCC sont représentées sur la Figure 51.

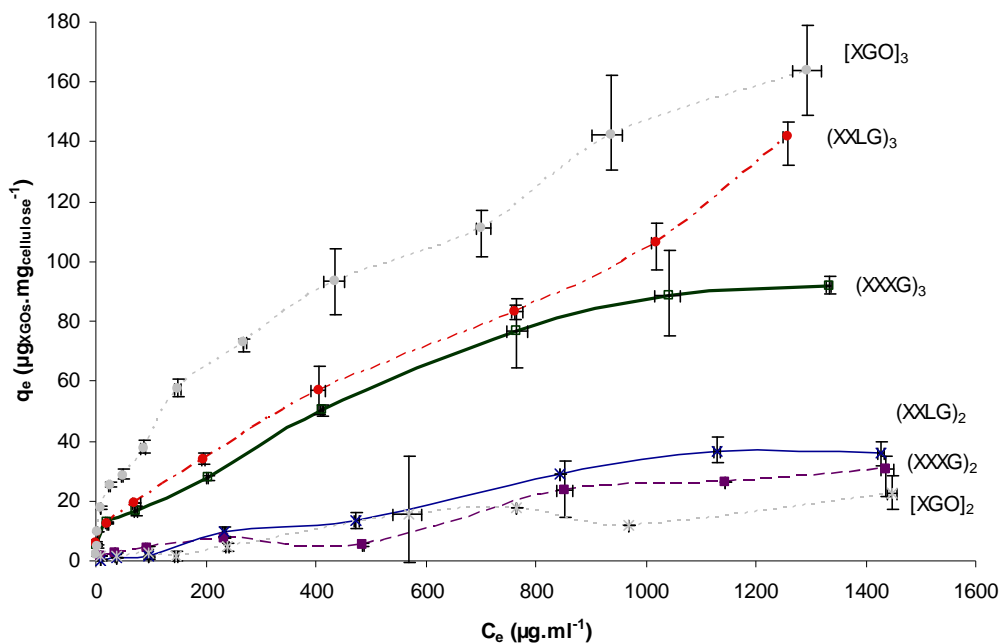


Figure 51 : Isothermes d'adsorption des composés présentant un degré de galactosylation variable sur la BMCC à 40 °C

Les données représentées sont des moyennes de deux à quatre valeurs, suivant les isothermes considérées, dont rendent compte les barres d'erreur. L'approximation logarithmique n'a pas été représentée en raison de l'écart de ce modèle par rapport aux données expérimentales.

Comme attendu, l'adsorption augmente avec la masse molaire. Les capacités d'adsorption des XGOs obtenus par voie chimio-enzymatique sont du même ordre de grandeur que leur homologue obtenus par hydrolyses enzymatique : [XGO]₂ et [XGO]₃.

Les isothermes relatives aux molécules de chaîne principale octasaccharidique ne sont pas très régulières en raison de la faible capacité d'adsorption de ces composés qui induit des erreurs de mesure conséquentes.

Par comparaison des isothermes obtenues à partir de (XXXG)₂ (**19**) et (XXLG)₂ (**20**) d'une part, et (XXXG)₃ (**21**) et (XXLG)₃ (**22**) d'autre part, il ne semble pas y avoir de variation de la capacité d'adsorption en présence de résidus galactosyle. En effet, bien que les isothermes relatives aux produits galactosylés soient dans les deux cas légèrement au-dessus de leurs homologues ne présentant pas de chaîne latérale disaccharidique, cet écart est de l'ordre de grandeur des barres d'erreur ce qui signifie que les résidus galactosyle n'ont pas d'influence sur la capacité d'adsorption. La légère amélioration de l'adsorption pour le mélange [XGO]₃, comportant des XGOs de degré de substitution en résidus galactosyle

supérieur, pourrait être interprétée comme une légère influence favorable de ces résidus sur l'adsorption. Cependant, cette faible variation est probablement due à l'hétérogénéité de cette fraction d'autant plus que la faiblesse de l'adsorption génère des incertitudes de mesure importantes.

Ainsi, contrairement aux essais réalisés *in vivo*,¹⁶³ la présence de résidus galactosyle n'a pas été déterminée comme essentielle, dans le cas de l'adsorption de XGOs comportant douze résidus glucosyle sur la BMCC. Cette différence peut être la conséquence de la faible substitution en résidus galactosyle mais les composés (XLLG)_n n'ont pas pu être obtenus par voie chimio-enzymatique. Cette conclusion peut également refléter l'indépendance de l'adsorption par rapport au taux de galactosylation. Dans ce cas, les observations *in vivo*⁸⁸ seraient la conséquence d'un phénomène concomitant à la diminution du nombre de chaînes disaccharidiques.

4.2.3. Présence d'une zone non substituée : quelle conséquence sur la capacité d'adsorption ?

La synthèse du composé **44** présentant une zone non substituée a été abordée au cours du chapitre précédent (Chapitre 2, § 2.3). Il y est mentionné que le groupement lactosyle présent à l'extrémité non réductrice de ce composé n'avait pas été hydrolysé afin de disposer de suffisamment de produit pour l'étude des interactions. La comparaison des capacités d'adsorption du composé **44** et du Lac(XXXG)₃ (**46**) a été effectuée afin de contrôler l'éventuelle influence du groupement lactosyle. La Figure 52 représente les isothermes d'adsorption obtenues avec les composés : (XXXG)₃ (**21**), Lac(XXXG)₃ (**46**) et Lac XXXGG₄XXXG (**44**) sur la BMCC.

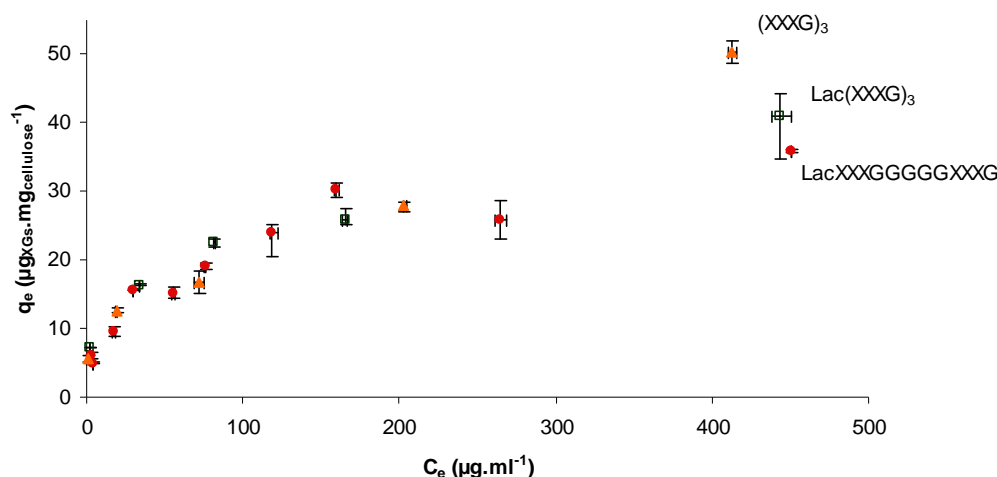


Figure 52 : Isothermes d'adsorption des composés LacXXXGGGGGXXXG, Lac(XXXG)₃ et (XXXG)₃ sur la BMCC à 40 °C

D'après ces isothermes, le groupement lactosyle n'a pas d'influence sur la capacité d'interaction. En effet, les quantités de $(\text{XXXG})_3$ (**21**) et $\text{Lac}(\text{XXXG})_3$ (**46**) adsorbées sont identiques, en particulier pour des concentrations à l'équilibre inférieures à $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ où les barres d'erreurs sont les plus faibles.

La présence d'une zone non substituée n'a pas amélioré la quantité de XGOs adsorbés. En effet, les isothermes d'adsorption relatives aux produits $\text{LacXXXGG}_4\text{XXXG}$ et $\text{Lac}(\text{XXXG})_3$ sont identiques. Lors de la comparaison de la capacité d'adsorption des XG_{RP} par rapport aux XG_{T100} (§ 4.2.1), la présence d'une quantité de résidus glucosyle non substitués plus importante dans le cas des XG_{RP} avait été évoquée pour expliquer en partie la meilleure capacité d'adsorption de ces derniers. Il semble que cette hypothèse ne soit plus si pertinente. Néanmoins, la longueur de la zone non substituée de 4 résidus glucosyle, ne suffit peut-être pas à générer une variation d'adsorption significative, pouvant être visible sur les isothermes d'adsorption. L'augmentation de la longueur de la zone non substituée et la synthèse par voie chimio-enzymatique de XGOs contenant une succession de 8 résidus glucosyle pourrait être envisagée mais la solubilité dans l'eau de tels composés sera vraisemblablement assez faible.

4.3. Influence des groupements acétate

Peu de références sont présentes dans la littérature concernant le taux d'acétate. Pour les XGs de *Rubus*, le taux de sulfate est estimé à 5 % molaire, du même ordre de grandeur que pour les XGs de menthe¹⁶⁴ mais nettement plus faible que dans ceux d'érable.¹⁶⁵ L'influence des groupements acétate sur l'adsorption a été étudiée par comparaison de la capacité d'adsorption des XG_{REC} avec leurs homologues désacétylés XG_{REC dés}. Les isothermes correspondantes sont représentées Figure 53.

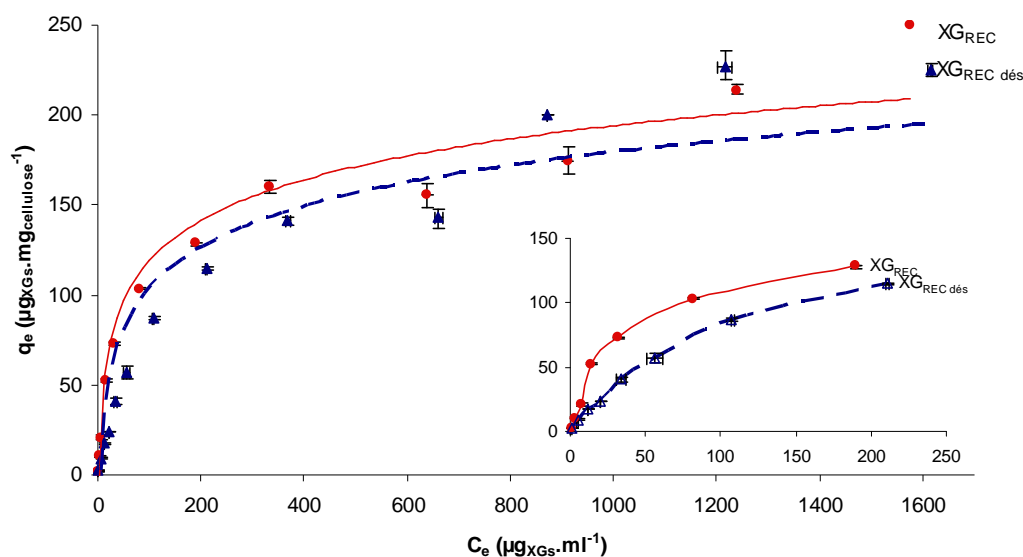


Figure 53 : Isothermes d'adsorption des XG_{REC} et XG_{REC dés} sur la BMCC à 40 °C, l'agrandissement des isothermes pour $C_e \in [0 ; 250]$ est représenté en bas à droite

La forme globale des isothermes ne semble pas modifiée par la désacétylation. Cependant, à faible concentration à l'équilibre, domaine où les barres d'erreur sont minimales, l'adsorption des XG_{REC} acétylés semble supérieure à celle des XG_{REC dés}. Néanmoins, il est indispensable d'avoir à l'esprit que lors de la désacétylation des modifications structurales annexes se sont produites comme, la diminution de la masse molaire moyenne ainsi que l'augmentation de la proportion de résidus glucosyle non substitués. Il apparaît alors difficile d'évaluer la réelle influence des groupements acétate sur la capacité d'interaction, d'autant plus qu'indépendamment du degré d'acétylation, les deux autres modifications structurales induites par la désacétylation ont des effets contraires sur la capacité d'adsorption.

Si l'acétylation a une influence, il est probable qu'elle soit faible et favorable pour des valeurs de C_e inférieures à $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Il aurait été nécessaire de disposer de XG_{REC} désacétylés de structure identique à celle des XG_{REC} initiaux. Une désacétylation plus douce et un contrôle rigoureux de l'absence de groupements acétate serait à envisager.

4.4. Effet de la structure des XGs : conclusion

La comparaison de l'adsorption des différents XGs et XGOs sur la BMCC a donc permis de dégager plusieurs tendances quant à l'influence des différents paramètres sur la capacité d'interaction. Si l'influence de l'acétylation n'a pas pu être déterminée avec certitude, l'étude de l'impact des autres paramètres structuraux a donné lieu à des résultats sans ambiguïté.

Tout d'abord, l'adsorption augmente en fonction de la masse molaire et une succession de trois motifs élémentaires est nécessaire pour observer des interactions. Le nombre de sites d'adsorption impliqués dans les interactions dépend de la nature du substrat xyloglucosidique. Les XGOs interagissent très probablement via deux sites distincts contre un seul pour les XGs.

De plus, la diminution du nombre des chaînes latérales et/ou leur caractère trisaccharidiques, favorisent les interactions. Par ailleurs, la présence d'une zone non substituée comportant 4 résidus glucosyle ne modifie pas la capacité d'adsorption. Ainsi, soit les XG_{RP} possèdent des zones non substituées comportant plus de 4 résidus glucosyle, soit c'est le caractère trisaccharidique des chaînes latérales qui engendre une amélioration de la capacité d'adsorption.

Afin de compléter l'analyse des interactions XGs-cellulose, une étude enthalpique a été réalisée pour tenter de déterminer les mécanismes impliqués dans la formation du réseau XGs-cellulose.

5. Étude enthalpique des interactions

Peu de travaux ont été effectués sur le caractère enthalpique des interactions XGs-cellulose. Dans la littérature, le phénomène d'adsorption de XG de tamarin sur de la cellulose

microcristalline de type Avicel est décrit comme étant un phénomène peu enthalpique et exothermique.¹¹⁴

Une étude des variations de la capacité d'adsorption en fonction de la température et une analyse par Titration Calorimétrique Isotherme ont été effectuées afin de préciser les phénomènes enthalpiques mis en jeu.

5.1. Influence de la température sur la capacité d'adsorption

Dans un premier temps, l'aspect enthalpique des interactions a été exploré par détermination des isothermes d'adsorption des XG_{T700} sur la BMCC à différentes températures. Quatre températures ont été testées : 4 °C, 25 °C, 40 °C et 60 °C (Figure 54).

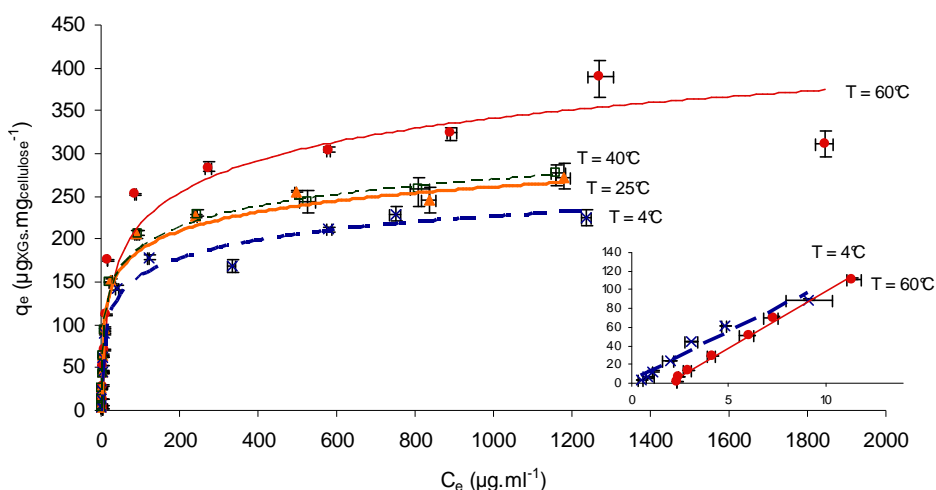


Figure 54 : Isothermes d'adsorption de XG_{T700} sur la BMCC à 60 °C, 40 °C, 25 °C et 4 °C. Les courbes à 4 et 60 °C ont été agrandies pour $C_e \in [0 ; 15]$ et représentées en bas à droite

A 25 °C et à 40 °C les quantités adsorbées sont très proches et la différence est de l'ordre de grandeur des barres d'erreur. Cette faible variation de la capacité d'adsorption avec la température confirme le caractère peu enthalpique des interactions.

Les isothermes obtenues à 4 °C et à 60 °C ont cependant permis d'observer sans ambiguïté que plus la température augmente, plus l'adsorption des XGs de tamarin sur la BMCC est favorisée, ce qui signifie que l'ensemble des phénomènes mis en jeu est globalement endothermique. En effet, d'après la relation de van 't Hoff (13), à pression constante, l'adsorption est défavorisée par augmentation de la température si l'ensemble des

phénomènes impliqués est globalement exothermique et inversement dans le cas de processus globalement endothermique. Tout se passe donc comme si l'équilibre cherchait à s'opposer à la variation de T selon le principe de Le Châtelier.

$$\frac{d(\ln K)}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (13)$$

Ceci va à l'encontre des résultats précédemment publiés.¹¹⁴ Cependant, la cellulose utilisée lors de ces essais est la cellulose microcristalline de type Avicel.

A faibles concentrations à l'équilibre ($C_e < 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), la quantité de XGs adsorbée à 4 °C est plus importante qu'à 60 °C. Il est donc envisageable que deux sites d'adsorption soient présents, un pour lequel l'adsorption serait exothermique et impliqué à faible concentration à l'équilibre et un second endothermique mis en jeu à plus forte concentration. L'existence de ces deux phénomènes doit néanmoins être confirmée. L'analyse ITC semble un moyen pertinent pour approfondir cette analyse enthalpique.

5.2. Analyse par titration calorimétrique isotherme (ITC)

Comme mentionné précédemment, les essais ITC ont été réalisés en utilisant des XGOs de tamarin et non les XGs natifs, car ceux-ci induisent la formation d'agglomérats perturbant fortement le signal ITC. Par ailleurs, toujours afin d'éviter les perturbations du signal ITC, les whiskers de cellulose ont été préférés à la BMCC car ils produisent des suspensions stables dans l'eau. Afin de comparer les résultats obtenus par détermination des isothermes d'adsorption, effectuées sur la BMCC, avec les analyses ITC utilisant des whiskers de cellulose, il est nécessaire de réaliser une étude comparative entre ces deux substrats.

5.2.1. Tests préliminaires

Tout d'abord, une étude comparative des capacités d'adsorption des XG_{T700} sur la BMCC et sur les whiskers de cellulose a été réalisée à partir des isothermes d'adsorption. Les whiskers forment une suspension colloïdale dans l'eau ce qui ne permet pas de les centrifuger,

comme le prévoit le mode opératoire (§ 2.2.1). Il a donc été nécessaire, une fois l'incubation terminée d'ajouter une proportion suffisante d'une solution de NaCl permettant l'écrantage des charges et la précipitation des whiskers. La comparaison de l'isotherme ainsi obtenue et de celle effectuée avec la BMCC (Figure 55) a permis de conclure que l'adsorption, rapportée à la masse sèche de substrat cellulosique, est identique sur ces deux types de cellulose.

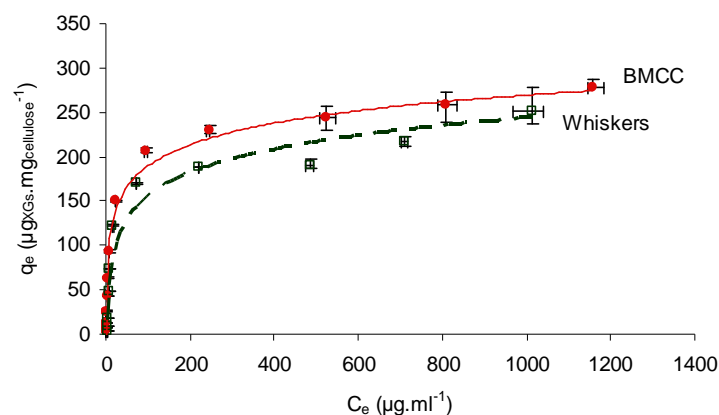


Figure 55 : Comparaison de l'adsorption des XGs de tamarin sur la BMCC et sur les whiskers de cellulose précipités après incubation par une solution de NaCl

L'ajout de sel, lors de la précipitation de whiskers, est susceptible d'avoir des conséquences sur les interactions XGs-cellulose. Afin de s'assurer qu'une quantité importante de NaCl ne modifie pas la quantité de XGs adsorbés, une isotherme d'adsorption de XGs sur de la BMCC a également été établie avec ajout de NaCl. La Figure 56 comporte le tracé de ces isothermes.

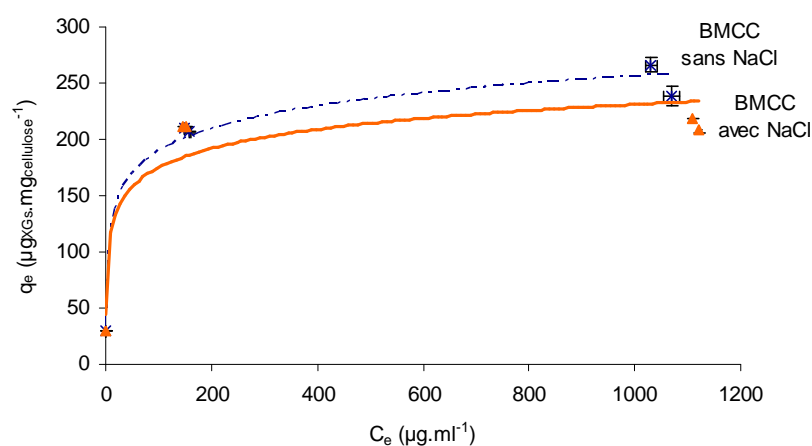


Figure 56 : Isothermes d'adsorption des XGs de tamarin sur la BMCC avec et sans ajout de NaCl

Ces essais montrent que l'adsorption ne varie pas en présence d'une quantité importante de NaCl. Ceci a ensuite permis de conclure avec certitude que la capacité d'adsorption des XGs de tamarin sur la BMCC et sur les whiskers de cellulose est identique. Les résultats issus de la détermination des isothermes d'adsorption pourront donc être comparés aux résultats ITC qui vont être exposés ci-après.

5.2.2. Analyse ITC : confirmation de la présence des deux phénomènes

Les XGOs utilisés ont été les $XGO_{1/2}$ en raison de leur disponibilité en grande quantité.

Un premier essai utilisant de forte concentration en $XGO_{1/2}$ (75 mg.ml^{-1}), représenté Figure 57, fait apparaître deux phénomènes, un exo- et l'autre endothermique. Le premier phénomène observé est exothermique, alors que le processus endothermique intervient pour des proportions plus importantes en $XGO_{1/2}$ il est cependant possible que ces deux phénomènes se superposent.

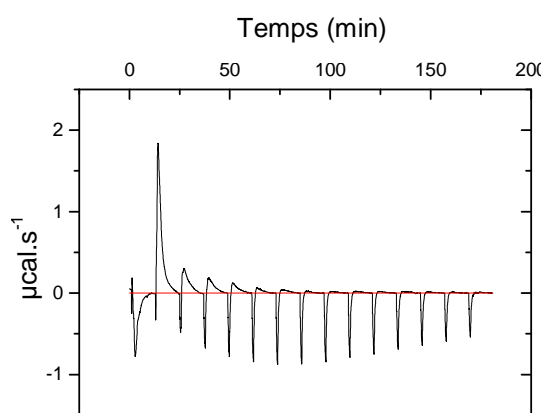


Figure 57 : Thermogramme de titration calorimétrique isotherme de whiskers de cellulose (53 mg.ml^{-1}) par $XGO_{1/2}$ (75 mg.ml^{-1})

Aux faibles proportions de $XGO_{1/2}$, les phénomènes impliqués dans les interactions sont globalement exothermiques alors qu'ils sont endothermiques à des proportions plus élevées. Ceci est en accord avec les conclusions des analyses des isothermes d'adsorption, où la présence de deux phénomènes, l'un exothermique à faibles C_e et un second endothermique pour des proportions plus élevées, a été observée.

La saturation précoce des sites d'adsorption lors de cet essai ITC effectué avec des injections de solution trop concentrée en XGOs ne permet pas de déduire de ces données une courbe enthalpique satisfaisante. Les concentrations utilisées ont donc été diminuées. Dans un premier temps, seule la concentration des XGOs a été diminuée (Figure 58A) mais, en raison des faibles quantités de whiskers disponibles, la concentration de la suspension du substrat cellulosique a dû aussi être abaissée (Figure 58B).

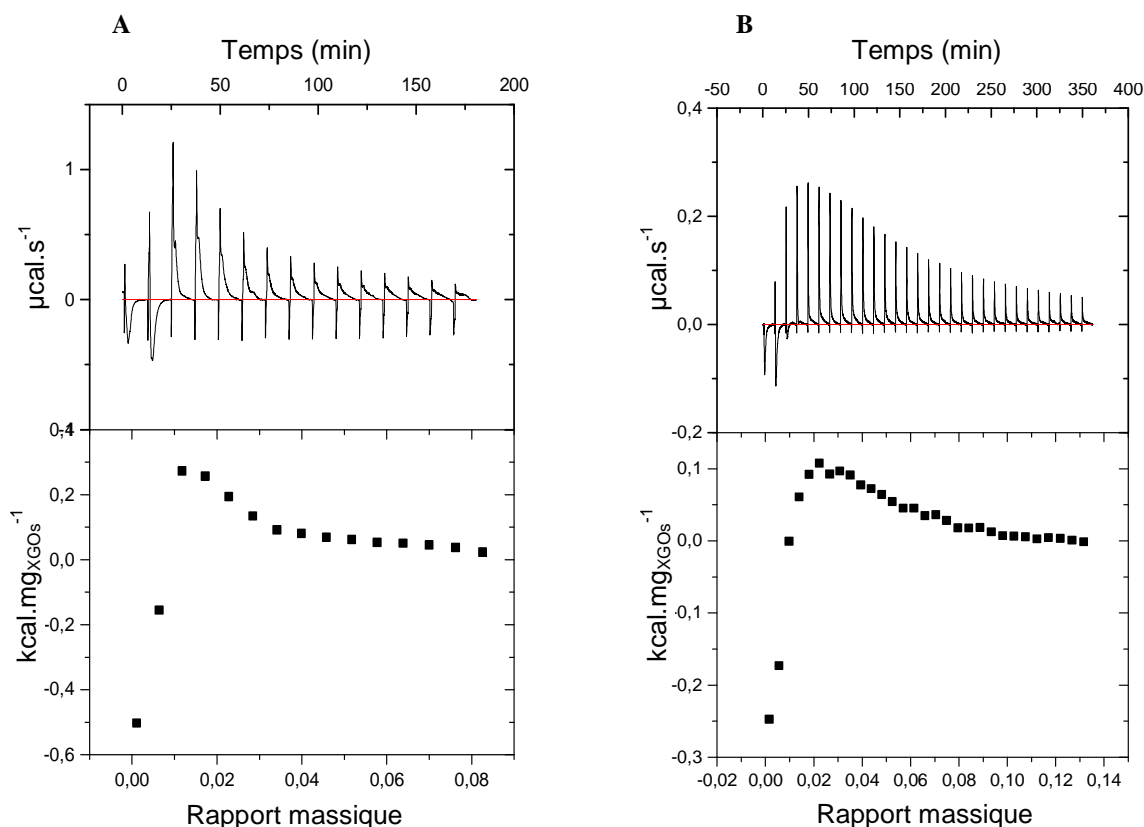


Figure 58 : Résultats d'ITC des whiskers (53 mg.ml^{-1}) par des $\text{XGO}_{1/2}$ (19 mg.ml^{-1}) (A) et des whiskers (17 mg.ml^{-1}) par des $\text{XGO}_{1/2}$ (10 mg.ml^{-1}) (B)

Sur ces thermogrammes, les deux phénomènes endothermique et exothermique ont également été identifiés, ce qui se traduit, sur l'évolution enthalpique, par la présence d'un maximum. Ce maximum varie de 0,3 à 0,12 $\text{kcal.mg}_{\text{XGOs}}^{-1}$ lorsque la concentration des XGOs utilisée diminue de 19 à 10 mg.ml^{-1} . L'utilisation d'une concentration plus faible en $\text{XGO}_{1/2}$ a permis de retarder la saturation qui ne se produit plus à la 6^{ème} injection mais à la 10^{ème} (Figure 58A) voire à la 20^{ème} injection (Figure 58B). De même, la diminution simultanée des quantités des XGOs et de whiskers de cellulose a aussi donné lieu à une évolution enthalpique

satisfaisante mais a, comme attendu, été accompagnée d'une baisse de la valeur du maximum de la courbe enthalpique (Figure 58B).

Ces résultats confirment la présence de deux phénomènes déjà mis en évidence lors de la détermination des isothermes à différentes températures. Le phénomène exothermique se produit majoritairement en début de titration, alors que le phénomène endothermique a lieu à plus fortes proportions en substrat xyloglucosidique, comme dans le cas des isothermes d'adsorption.

Afin d'écartier l'hypothèse qu'un des phénomènes puisse, dans le cas des analyses ITC, être lié à la charge du substrat cellulosique utilisé, les whiskers de cellulose ont été désulfatés à différentes températures (20 °C, 40 °C, 60 °C et 80 °C). Le taux de charge n'a pu être déterminé par dosage des groupements sulfates en raison des trop faibles quantités d'échantillons disponibles. Néanmoins, une évaluation visuelle de la variation d'opacité des suspensions permet de confirmer la désulfatation de manière qualitative. En effet, l'opacité des échantillons, augmentent avec la température de désulfatation, en raison de la diminution de la quantité de charges donc de la diminution des répulsions électrostatiques provoquant une augmentation de la capacité de floculation.

Les courbes de variation de l'enthalpie obtenues par titration de ces différents lots de whiskers désulfatés par une solution de XGO_{s4/3} sont représentées sur la Figure 59.

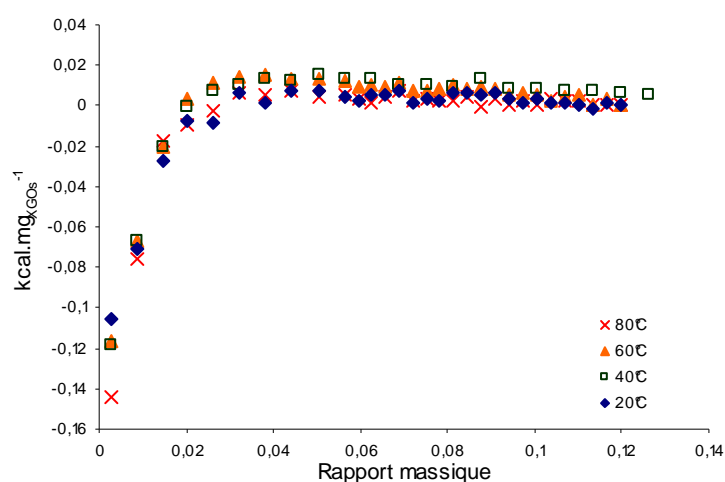


Figure 59 : Variation enthalpique de la titration de whiskers désulfatés à 20 °C, 40 °C, 60 °C et 80 °C (12 mg.ml⁻¹) par une solution de XGO_{s4/3} (10 mg.ml⁻¹)

Ces courbes sont toutes superposées, ce qui permet d'écarter toute hypothèse de phénomène lié à la présence de charges, ceci s'explique par la faible quantité de charge présente à la surface des whiskers avant désulfatation ($d_s = 8,3 \cdot 10^{-4}$).

Par ailleurs, le phénomène endothermique, se produisant pour des proportions en substrat xyloglucosidique plus importantes, est enthalpiquement défavorable pour des raisons qui seront examinées au paragraphe suivant. Ainsi, afin de vérifier que ce processus est bien relatif aux interactions, une concentration très importante de XGO_{1/2} a été testée (Figure 60).

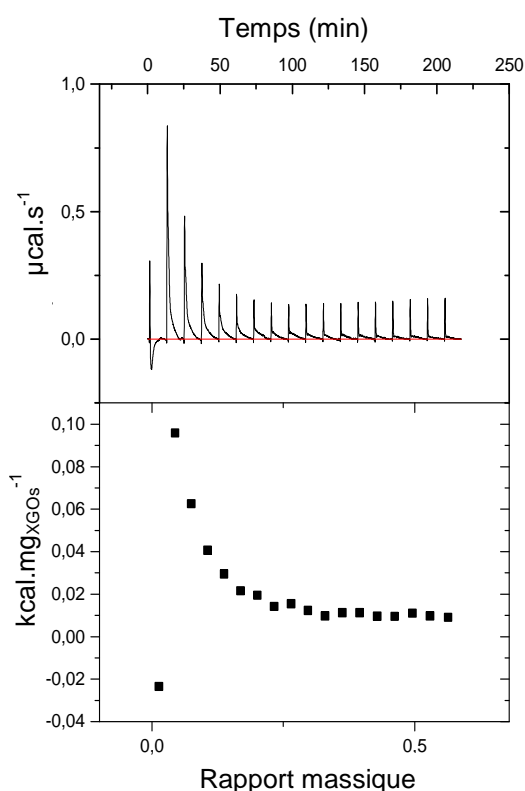


Figure 60 : ITC d'une suspension de whiskers de cellulose (17 mg.ml^{-1}) par une solution de XGOs_{1/2} (75 mg.ml^{-1})

Lors des essais précédents, les rapports des concentrations initiales $[\text{XGO}]_0/[\text{cellulose}]_0$ variaient entre 0,3 (Figure 58A) et 1,4 (Figure 57). Dans le cas présenté ci-dessus (Figure 60), ce rapport atteint 4,0 et il est alors évident que le phénomène endothermique est fonction de la concentration de la solution de XGOs. En effet, la saturation est atteinte plus rapidement dans le cas présent mais l'enthalpie maximale du système n'est pas modifiée. Ceci permet de confirmer que le phénomène endothermique, observé

précédemment, est lui aussi lié aux interactions XGs-cellulose. Les deux phénomènes observés sont donc très probablement relatifs aux interactions XGs-cellulose.

Jusqu'alors, seul le phénomène exothermique avait été évoqué en particulier par de Lima *et al.*¹¹⁴ Un tel processus est enthalpiquement favorable car d'après la relation de Gibbs-Helmholtz, à température et pression constante, l'évolution spontanée d'un système est régie par la fonction d'état (8) :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

où G est l'enthalpie libre, H l'enthalpie et S l'entropie de la réaction.

Ainsi, pour qu'un phénomène ait lieu, il est nécessaire et suffisant que la variation d'enthalpie libre, c'est-à-dire $\Delta H - T\Delta S$, soit négative, une valeur négative de ΔH est donc favorable.

Le second phénomène, endothermique, devrait être alors gouverné par la variation d'entropie. Ainsi, si le terme ΔH est positif alors il est nécessaire pour que le phénomène ait lieu que le terme ΔS soit positif et que le système se désorganise au cours du processus endothermique. Le gain d'entropie ne peut pas être attribué à la chaîne xyloglucosidique, qui, suite à l'adhésion sur la surface de la cellulose, voit plutôt son entropie diminuer par rapport à son état initial de dispersion dans le solvant où les fluctuations de conformation de la pelote sont nettement favorisées. Par contre, cette augmentation d'entropie peut s'expliquer par une modification de la structuration du solvant, comme c'est le cas dans les interactions hydrophobes, mais également par une modification de la conformation des chaînes de surface des cristaux cellulosiques. Ceci pourra être confirmé par analyse RMN.

5.3. Enthalpie d'interaction : identification des phénomènes observés

La détermination des isothermes d'adsorption à partir de XG_{T700} a permis de montrer que la capacité d'adsorption est identique sur les whiskers et la BMCC. De plus, quelque soit

la technique ou les substrats xyloglucosidiques utilisés, deux phénomènes ont été observés. Néanmoins, l'ITC a été effectuée en utilisant des XGOs et non pas des XGs de forte masse molaire. En conséquence, il est possible que les mécanismes observés en ITC, en utilisant des whiskers de cellulose et les XGO_{1/2} et ceux identifiés grâce à la détermination des isothermes d'adsorption à partir de XG_{T700} sur la BMCC, ne soient pas nécessairement de même nature. Une comparaison plus approfondie de ces deux méthodes a donc été effectuée afin de préciser les mécanismes de ces processus d'interaction.

Le phénomène exothermique observé dans les deux cas avec XGs en isothermes d'adsorption et avec les XGOs, en isothermes d'adsorption et en ITC, est très probablement lié au même processus d'interaction pour les deux substrats xyloglucosidiques à savoir leur adsorption à la surface de la cellulose.

Les phénomènes endothermiques ne sont, quant à eux, certainement pas liés au même processus dans les deux cas. En effet, les isothermes d'adsorption à différentes températures utilisant les XG_{T700} ont montré que le mécanisme endothermique est nettement plus important que le processus exothermique. Dans le cas des XGOs observé en ITC, le phénomène endothermique est quant à lui plus faible que le mécanisme exothermique. La plus faible contribution endothermique pour les XGOs comparativement au XGs a été confirmée par la détermination des isothermes d'adsorption sur des XGOs à deux températures différentes (Figure 61) qui a montré une dépendance en température notablement plus faible que pour le substrat de masse molaire moyenne plus élevée présenté précédemment (§ 5.1 ; Figure 54).

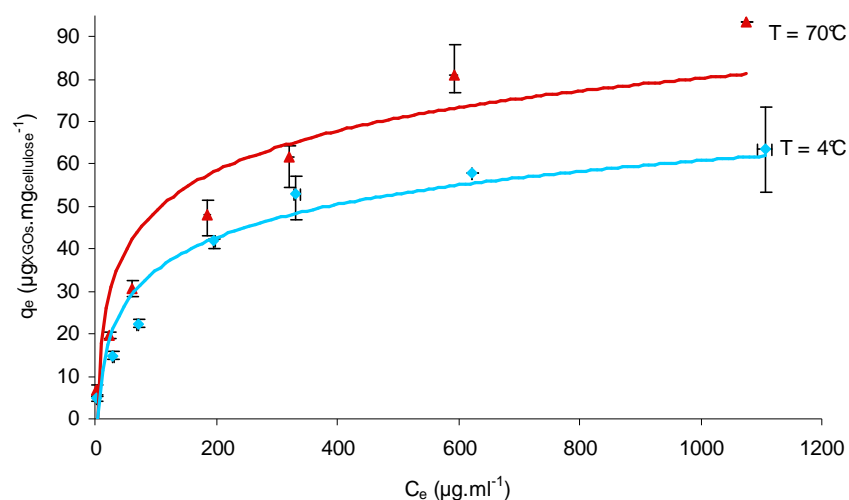


Figure 61 : Isothermes d'adsorption de [XGO]₃ sur la BMCC à 4 °C et 70 °C

Il est donc probable que les phénomènes endothermiques identifiés dans ces deux cas ne soient pas les mêmes suivant qu'il s'agit de XGs de forte masse molaire moyenne ou des XGOs.

Dans le cas des XGOs et comme mentionné précédemment (§ 4.1.2) le phénomène exothermique serait lié à l'adsorption des XGOs à la surface de la cellulose alors que le phénomène endothermique serait relatif à l'adsorption de XGOs dans les rainures du substrat cellulosique.

Pour les XGs la nature du phénomène exothermique est vraisemblablement similaire au processus décrit pour les XGOs. Cependant, concernant le processus endothermique, la taille importante de ce substrat ne lui permet pas de pénétrer dans d'éventuelles rainures. Or, certaines études récentes sur l'adsorption de polymères non-ioniques tels que les poly(vinyle alcool) (PVA) et les poly(éthylène glycol) (PEG) sur une surface de verre de porosité contrôlée¹⁶⁶ font état d'un processus endothermique d'association entre différentes chaînes de polymères. De plus, la détermination approximative de la proportion de XGs par rapport à la surface de cellulose disponible dans le cas de l'adsorption de XGs sur la BMCC à 40 °C laisse supposer qu'une quantité trois fois plus importante de XGs par rapport à la surface disponible a été retenue. Tout cela semble corroborer l'hypothèse d'une association de chaînes de XGs entre elles. Concernant les XGOs, il est peu probable que ces derniers s'auto-associent en raison de leurs faibles masses molaires moyennes et, si tel était le cas, la contribution enthalpique de ce processus, serait négligeable.

Les deux phénomènes endothermiques observés ne sont donc pas liés à des processus similaires. Une représentation de l'adsorption de XGOs et de XGs a donc été envisagée (Figure 62).

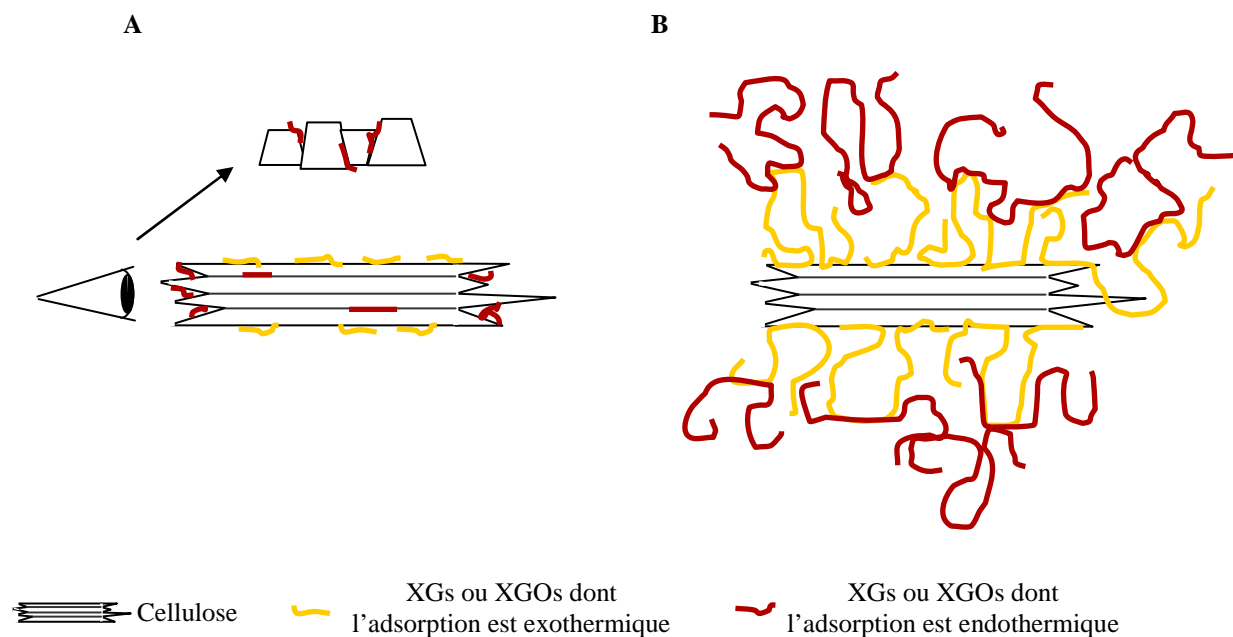


Figure 62 : Représentation schématique de l'adsorption de XGOs (A) et de XGs (B) sur la cellulose

Le caractère endothermique des deux processus évoqués nécessite une forte contribution entropique, bien que celle-ci ait été négligée dans les travaux de modélisation moléculaire.¹⁰² L'augmentation de l'entropie est indispensable à la réalisation du processus, comme évoqué précédemment (§ 5.2.2). Dans le cas des XGOs (Figure 62A), le gain d'entropie est probablement la conséquence d'interactions hydrophobes des XGOs pénétrant dans les rainures de la cellulose qui libèrent des molécules de solvant augmentant ainsi leur désordre donc l'entropie. Dans le cas des XGs (Figure 62B), un réarrangement tridimensionnel des chaînes de XGs présentes à la surface pourrait s'ajouter à l'augmentation d'entropie du solvant.

Le processus exothermique est quant à lui probablement gouverné par des interactions de type électrostatique, se produisant à la surface de la cellulose.

Après la mise au point délicate des conditions expérimentales en raison de la nature des substrats, ces études enthalpiques ont permis d'apporter plusieurs informations précises sur les interactions XGs-cellulose. Le caractère peu enthalpique des interactions XGs-cellulose, qui rend ces analyses relativement complexes, a été confirmé et trois processus d'interaction ont été identifiés : l'adsorption à la surface de la cellulose, l'adsorption dans les rainures de ce substrat et l'auto-association des chaînes de XGs.

6. Étude des interactions par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN du solide est une technique bien adaptée à l'étude des interactions car elle apporte des informations relatives aux conformations ainsi qu'à la mobilité des espèces impliquées. Ces études en RMN du solide ont été réalisées à l'INRA de Nantes sur des composites XGs-Cellulose Bactérienne (CB) de contraste isotopique variable. Dans la suite de ce paragraphe, lorsque les composés utilisés sont enrichis en ^{13}C , la mention « ^{13}C » apparaît à la suite du composé. De même, la mention « ^{12}C » indique un composé appauvri en ^{13}C , c'est-à-dire comportant une proportion de cet isotope inférieure à l'abondance naturelle. Lorsque rien n'est mentionné, le composé utilisé est d'abondance naturelle en ^{13}C .

Suite aux premiers essais réalisés, à partir d'un composite $\text{XG}_{\text{T700}}\text{-CB }^{12}\text{C}$, deux populations de xylose ont été observées,¹²³ une population susceptible de correspondre aux XGs en interaction directe avec la cellulose et une deuxième population probablement représentative des portions de XGs non liées à la cellulose (boucles, queues, ponts). Ces observations ont pu être faites grâce à l'appauvrissement de la cellulose en ^{13}C , qui a permis d'éteindre les signaux correspondants en RMN et d'analyser avec plus de précision les signaux relatifs aux XGs. Les spectres des composites $\text{XG}_{\text{T700}}\text{-CB}$ et $\text{XG}_{\text{T700}}\text{-CB }^{12}\text{C}$ sont présentés en Annexe 11. Cependant, la faible proportion de ^{13}C dans les XGs d'abondance naturelle implique des temps d'accumulation extrêmement longs pour obtenir un spectre RMN et ne permet donc pas d'envisager une analyse des différences de mobilité des résidus saccharidiques.

Afin de surmonter cette difficulté, de nouveaux essais ont été réalisés en utilisant des XGs marqués 10 % ^{13}C produits à partir de *Rubus fruticosus*, puis engagés dans une culture de cellulose ^{12}C , pour former un composite $\text{XG}_{\text{REC}}^{13}\text{C-CB }^{12}\text{C}$. Les spectres de RMN du solide des $\text{XG}_{\text{REC}}^{13}\text{C}$ et du composite $\text{XG}_{\text{REC}}^{13}\text{C-CB }^{12}\text{C}$ sont présentés en Annexe 12. Les analyses effectuées à partir de ce composite ont permis de montrer la présence d'une seule population de XG_{REC} . Ainsi, alors que les XG_{T700} ont fait apparaître deux populations, qui ont été assimilées aux « trains » et aux « boucles » formés par les XGs, les XG_{REC} n'ont montré qu'un seul type de population. Ceci peut être la conséquence de la longueur moindre des XG_{REC} , qui ne seraient alors pas suffisamment longs pour former des boucles. Afin de confirmer cette différence entre les XG_{REC} et XG_{T700} précédemment étudiés, une analyse de

mobilité a été effectuée. L'objectif était de déterminer l'existence ou non de résidus glycosyles de mobilité différente, les moins mobiles pouvant être localisés au niveau de la surface de la cellulose et directement en interaction avec celle-ci et les plus mobiles constituant les boucles ou les queues évoquées par Vincken (Figure 45).

Ces analyses de différence de mobilité, réalisées en excitation directe en faisant varier le délai de répétition, sont présentées en Annexe 13. Elles ont tout d'abord montré que les ramifications des XGs présentes au sein du composite, et en particulier le résidu fucosyle, ont une mobilité plus importante que le squelette glucanique. Cette observation permet de confirmer la flexibilité des chaînes latérales et de localiser avec certitude les interactions entre les résidus glucosyle des XGs et ceux de la cellulose. Cependant, aucune différence de mobilité n'a été observée au sein des résidus glucosyle des XG_{REC}. La présence de deux populations observées sur les spectres RMN du solide ¹³C des composites XG_{T700}-CB ¹²C observée lors des travaux précédents, n'a donc pas pu être confirmée. Il n'est cependant pas possible de statuer sur l'absence de boucles dans le cas de XG_{REC} car celles-ci pourraient être minoritaires et n'avoir que des conséquences minimales, difficilement observables, sur les analyses de mobilité. Il est néanmoins probable que la taille des XG_{REC} soit favorable à un régime d'adsorption de type « tuiles », intermédiaire entre les « trains » et les « boucles ».

Enfin, l'utilisation de composites XG_{REC}-CB ¹³C a permis d'observer exclusivement les signaux de la cellulose en présence de XGs et de les comparer à ceux de la cellulose seule. La présence de ¹³C en abondance naturelle au sein des XGs du composite est quasiment masquée par le ¹³C de la cellulose en raison des faibles quantités de XGs incorporées. Ainsi, la comparaison de ces deux échantillons n'a montré que de très faibles différences de conformation des C-6 exposés à la surface de la cellulose. Il n'y a donc quasiment pas de réarrangement au niveau de celle-ci pour favoriser l'interaction avec les XGs.

7. Étude des interactions XGs-cellulose : bilan

Dans un premier temps et grâce à la diversité des substrats xyloglucosidiques disponibles, plusieurs résultats ont pu être obtenus à partir des isothermes d'adsorption. Tout d'abord, l'augmentation de la masse molaire a une influence favorable sur la quantité adsorbée et une longueur minimale de douze résidus glucosyle est requise pour générer des

interactions. Cette longueur correspond probablement à celle de zones adsorbées de type « trains ». De plus, bien que le caractère intrinsèque du résidu fucosyle ne semble pas avoir d'influence, la présence de chaînes latérales trisaccharidiques ainsi que, dans une moindre mesure, la répartition des ramifications de XG_{RP} , améliorent fortement la capacité d'adsorption. Puisque le degré de galactosylation n'a pas d'influence sur l'affinité des XGOs pour la cellulose, seule la présence de chaînes latérales trisaccharidiques permet aux XGs d'adopter une conformation favorable aux interactions, en accord avec des travaux antérieurs.¹⁰⁰

Deux types de sites distincts ont été observés lors de l'adsorption de XGOs sur la BMCC grâce à l'utilisation de différents modèles d'adsorption, et en particulier le modèle de Langmuir. Par ailleurs, l'application du modèle de Scatchard a montré que le mécanisme d'adsorption de XGs serait coopératif, contrairement à celui de l'adsorption de XGOs. Le schéma ci-dessous (Schéma 20) rassemble les conclusions concernant l'influence des différentes caractéristiques structurales des XGOs et XGs par rapport aux objectifs fixés (Chapitre 2, § 5.1, Schéma 18).

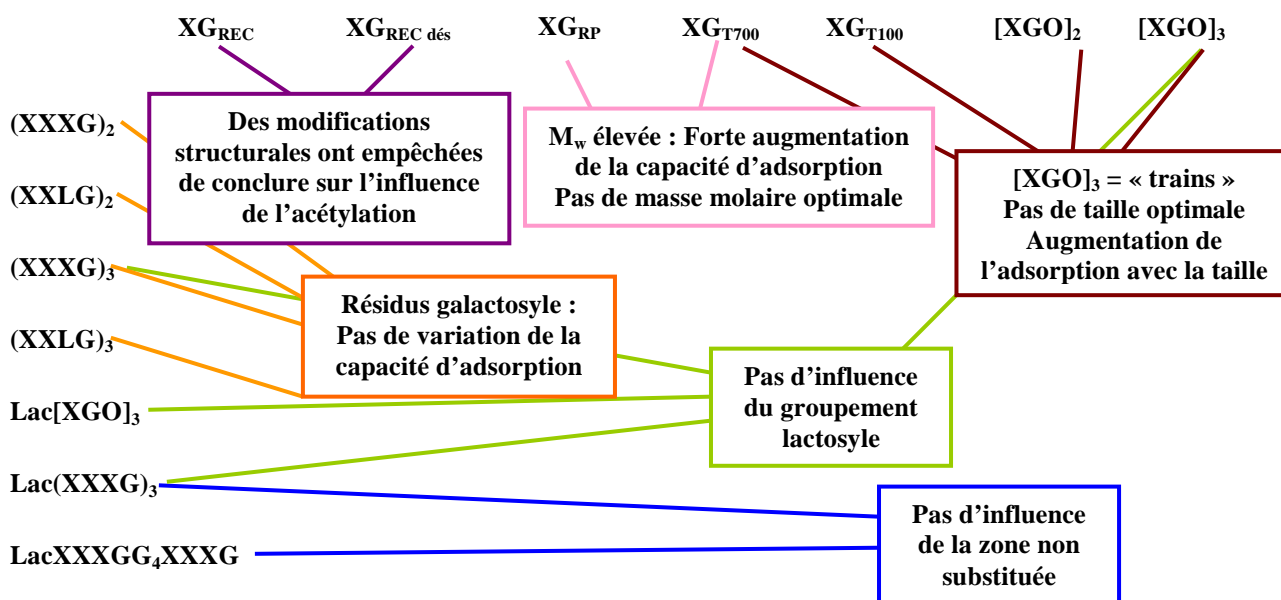


Schéma 20 : Récapitulatif de l'influence des différents paramètres structuraux des XGOs et XGs déterminée grâce à l'utilisation de substrats présentant des caractéristiques diverses et bien définies.

L'analyse enthalpique a été effectuée à partir de deux types d'expérimentation : la détermination d'isothermes d'adsorption à différentes températures et la titration calorimétrique isotherme. Tout d'abord, le caractère faiblement enthalpique de ces interactions a été confirmé, ce qui signifie que celles-ci sont peu sensibles aux variations de température. Ceci paraît relativement cohérent avec ce qui se produit au sein de la plante. En effet, le réseau XG-cellulose est garant du maintien de la structure de la plante, or il semble plus que nécessaire que celui-ci ne soit pas déstructuré lors de variation de température comme, par exemple, lors des cycles jour-nuit.

Par ailleurs, ces analyses enthalpiques ont également mis en évidence trois processus intervenant lors de l'adsorption de substrats xyloglucosidiques sur la cellulose : l'adsorption de XGOs et de XGs à la surface, qui est un processus exothermique alors que l'adsorption de XGOs dans les rainures de la cellulose tout comme l'auto-association de chaînes de XGs sur des chaînes déjà adsorbées, ont été déterminés comme étant des phénomènes endothermiques. Ces phénomènes endothermiques n'avaient jusqu'à présent pas été observés. La capacité d'interaction sur ces sites est donc accrue par augmentation de la température pouvant conduire à un renforcement du réseau.

Enfin, des variations de contraste isotopique ont permis d'analyser des composites XGs-cellulose en RMN du solide. Ces analyses RMN ont montré une différence de comportement entre les XG_{T700} , étudiés lors de travaux antérieurs, qui sont présents sous deux formes au sein du composite, et les XG_{REC} pour lesquels une seule population est présente. Cette différence de comportement est liée à la taille restreinte des XG_{REC} qui ne permet sans doute plus la formation de boucles. De plus, la structure de la cellulose au sein du composite n'a pas varié, ce qui signifierait que le gain entropique nécessaire à la réalisation des processus endothermiques est plutôt un gain entropique sur le solvant.

Chapitre 4 :
Partie Expérimentale

1. Solvants, enzymes et substrats commerciaux

1.1. Solvants

Le dichlorométhane est distillé sur pentoxyde de phosphore, au moyen d'une fontaine à solvants et la pyridine sur hydroxyde de potassium, après avoir été maintenue une nuit sur celui-ci.

Une fois distillés, les solvants sont conservés sur tamis moléculaire ou hydroxyde de potassium.

L'eau utilisée dans les modes opératoires décrit § 2.2 et § 2.3 est dé-ionisée. Pour les modes opératoires décrits § 3, l'eau est déionisée ou distillée.

1.2. Enzymes

Le mélange de cellulases 3042 A de *Trichoderma reesei* est un don de la société Genencor International (New-York, Etats-Unis)

La cellulase Cel7B de *Trichoderma reesei* (5 U.mg⁻¹) est commercialisée par la société Fluka (Buchs SG, Suisse)

La cellulase Cel5A (61 U.mg⁻¹) ainsi que la β-D-galactosidase d'*Aspergillus niger* (112 U.mg⁻¹) et la β-D-galactosidase (lactase) de *Kluyveromyces fragilis* (100 U.ml⁻¹, 3,6 U.mg⁻¹) ont été offertes par la société Megazyme (Bray, Irlande)

L'enzyme mutée Cel7B E197A de *Humicola insolens* a été fournie par les Drs Martin Schüleïn et Jesper Vind (Novozyme, Danemark)

L'enzyme mutée XET16A E85A de *Populus tremula x tremuloides* a été produite dans l'équipe du Prof T. Teeri (Département de Biotechnologie, KTH, Stockholm, Suède)

1.3. Substrats cellulosique et xyloglucosidique commerciaux

Cellulose microcristalline Avicel

La cellulose microcristalline Avicel utilisée est la PH-101 commercialisée par Fluka (Buchs SG, Suisse).

XGs de tamarin commerciaux

Les XGs commercialisés par Dainippon Pharmaceutical (Osaka, Japon) sont extraits de graines de *Tamarindus indica*. Les catégories utilisées au cours de ces travaux sont la catégorie 3A selon la nomenclature de Dainippon, elle représente les XGs insolubles dans l'eau froide mais solubles à chaud, typiquement 15 min à 75 °C, et la catégorie 3S solubles à froid mais générant une solution de forte viscosité.

2. Caractérisations physicochimiques

2.1. Méthodes générales

Les pouvoirs rotatoires sont mesurés, à 25 °C sur un polarimètre Perkin Elmer 341.

Les spectres de masse basse résolution ont été effectués au CERMAV sur un appareil quadripolaire NERMAG R 10-10C version 2000 en masse, pour les méthodes d'ionisation de type bombardement par des atomes rapides (FAB) et par désorption chimique (DCI), sur un spectromètre Waters Micromass ZQ pour la méthode d'ionisation de type électrospray (ES) et sur un appareil Bruker Autoflex pour la technique MALDI.

Les mesures de masses exactes par spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées sur un spectromètre ZQ 4000 (technique électrospray) par le service d'analyse chimique du Laboratoire des Glucides d'Amiens (UMR 6219).

2.2. Chromatographies

Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'avancement des réactions est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice (Merk 60 F₂₅₄) en utilisant des systèmes d'éluants appropriés. Les CCM sont révélées par différents révélateurs en fonction des produits présents :

- par irradiation sous lumière UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) pour les produits comportant des groupements aromatiques
- par trempage dans un révélateur acide (acide sulfurique/méthanol/eau ; 5/45/45) et/ou révélateur orcinol (1 g orcinol solubilisé dans un mélange éthanol/eau/acide sulfurique ; 72,5/22,5/3) puis chauffage à 300 °C pour les composés saccharidiques
- par mise en contact avec des vapeurs d'iode pour les produits contenant les groupements éthylène glycol
- par trempage dans un révélateur à la ninhydrine (0,25 g de ninhydrine dans 100 ml d'acétone) puis chauffage à 300 °C pour les composés aminés.

Colonne chromatographique

Les séparations par chromatographie sur silice normale sont réalisées à la pression atmosphérique (colonne ouverte) ou sous pression d'air comprimé (colonne rapide) sur colonne de gel de silice (Merk Geduran SI 60; 40-63 μm) avec l'éluant indiqué aux endroits appropriés.

Les séparations par chromatographie sur gel de silice C18 sont réalisées en utilisant des cartouches de silice pré-préparées (SepPak[®], 1g) préalablement conditionnées dans l'eau. Les gammes d'éluants utilisées sont mentionnées aux endroits appropriés.

2.3. RMN

Appareillage et calibration

Les spectres RMN en milieu liquide ont été réalisés sur des appareils Bruker AC300 (sonde dual ^1H - ^{13}C) et Avance 400 (sonde à détection directe QNP 5mm). Les manipulations ont été effectuées à 298 K sur le spectromètre Varian Avance 400 et à 303 K sur l'appareil Bruker AC300.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) en utilisant comme référence les solvants mentionnés lors de l'analyse du spectre. Pour les composés libres, les échantillons sont analysés après échange proton-deutérium par lyophilisation dans l'eau lourde à 99,9 %. La mesure est effectuée dans l'eau lourde. La référence utilisée est alors le pic de HOD pour les spectres protons (étalonné à $\delta = 4,79$ ppm). Les produits protégés et/ou solubles dans le chloroforme sont analysés en utilisant le chloroforme deutérié comme solvant. La référence utilisée est alors le signal du CHCl_3 pour les spectres proton (étalonné à $\delta = 7,24$ ppm) ou la raie centrale du triplet correspondant au signal de CDCl_3 pour les spectres carbones (étalonné à $\delta = 77,2$ ppm).

Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz).

Les expériences bidimensionnelles homo- et hétéronucléaires sont calibrées par analogie avec les spectres monodimensionnels correspondants.

Expériences utilisées

Cinq principales expériences ont été utilisées pour la caractérisation des produits :

- RMN ^1H : permet d'obtenir les valeurs des déplacements chimiques, des couplages et des valeurs d'intégration relatives aux protons de la molécule étudiée.
- RMN ^{13}C : comme pour l'expérience précédente, il s'agit là d'avoir des informations sur les déplacements chimiques des signaux relatifs aux carbones de la molécule étudiée.
- DEPT-135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) permet de différencier les carbones quaternaires et les carbones secondaires des carbones liés à un nombre impair de protons (tertiaires et primaires).

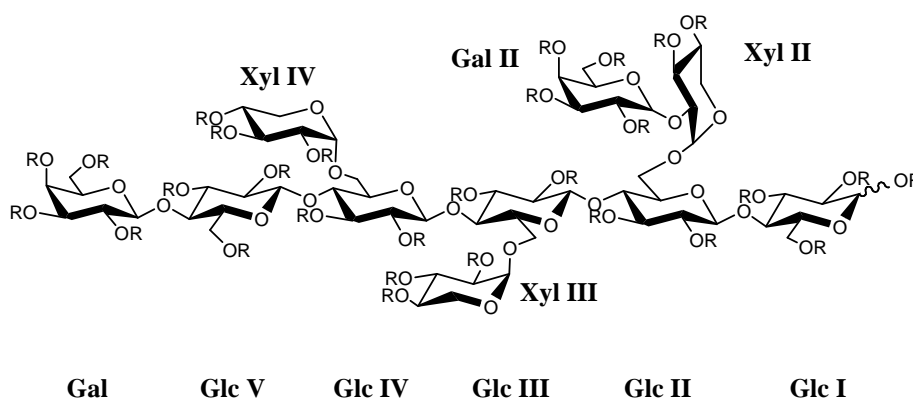
- COSY (COrelated Spectrometry) : met en évidence les noyaux de même nature (protons dans le cas présent) possédant entre eux un couplage.
- HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) : permet de visualiser deux noyaux de nature différente possédant entre eux un couplage fort. Les visualisations des corrélations $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, réalisées dans le cas présent permet d'associer chaque proton au carbone auquel est lié.

Notations

La notation utilisée pour spécifier la multiplicité des signaux est la suivante : s (singulet), se (singulet élargi), d (doublet), dd (doublet dédoublé), ddd (doublet de doublet dédoublé), t (triplet), q (quadruplet) et m (massif ou multiplet).

Les protons et les carbones aromatiques sont respectivement notés $\text{H}_{\text{arom.}}$ et $\text{C}_{\text{arom.}}$.

Pour les XGOs, l'attribution des signaux RMN est faite en utilisant les abréviations des différents saccharides. Par ailleurs, les résidus glucosyle sont numérotés par ordre croissant de l'extrémité réductrice à l'extrémité non réductrice. Enfin, les résidus portés par les chaînes latérales portent le même numéro que le résidu glucosyle qu'ils substituent.



2.4. Dosage des oses neutres

Les proportions de sucres neutres sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) des acétates d'alditols correspondants.

Les acétates d'alditols sont obtenus par hydrolyse de 1 mg d'échantillon par une solution d'acide sulfurique (13 N, 180 μ l) pendant 1 h 30 à 30 °C. La solution est ensuite diluée jusqu'à une concentration d'acide sulfurique de 1 M par une solution aqueuse contenant environ 0,5 mg de myo-inositol pesé exactement, qui servira d'étalon interne. Le mélange est alors maintenu à 100 °C pendant 6 h. Après neutralisation par une pâte de carbonate de baryum dans l'eau, le milieu est filtré afin d'éliminer l'excès de carbonate de baryum ainsi que le sulfate de baryum formé. Puis le pH du filtrat est ajusté à pH = 9 au moyen d'une solution d'ammoniaque 4 %. Les monosaccharides sont alors réduits pendant une nuit à température ambiante en présence de borohydrure de sodium (10 mg). Après neutralisation par une solution d'acide acétique 50 % le milieu est évaporé à sec, puis coévaporé 3 fois au méthanol chlorhydrique (MeOH/HCl ; 100/1). Le résidu sec est acétylé par un mélange pyridine/anhydride acétique (1/1 ; 1,2 ml) 1 h à reflux ou une nuit à température ambiante. L'excès d'anhydride acétique est ensuite hydrolysé à froid avant d'évaporer à sec puis de coévaporer à sec 3 fois à l'eau distillée.

Les oses, sous la forme de leurs acétates d'alditols correspondants ainsi formés sont analysés par CPG 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 à ionisation de flamme (FID) couplé à un intégrateur Hewlett-Packard 3395. Le gaz vecteur utilisé est de l'azote U. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- température d'injection : 260 °C
- température de colonne : 3 min à 195 °C ; 195 °C à 225°C par incréments de 2,5 °C.min⁻¹ ; 3 min à 225°C
- température de détection : 280 °C
- débit d'azote (N₂) : 4 ml.min⁻¹

Les acétates d'alditols sont identifiés par comparaison des temps de rétention à ceux d'un témoin contenant les oses : rhamnose, fucose, xylose, arabinose, mannose, galactose et glucose et le myo-inositol préalablement réduits et acétylés.

2.5. Détermination des masses molaires moyennes par SEC

Les analyses de masses molaires moyennes par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sont effectuées à 30 °C sur un appareil Waters constitué de trois détecteurs en ligne, un détecteur viscosimétrique, un réfractomètre différentiel et un détecteur à diffusion de lumière

MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering) DSP-F (Wyatt Technology-USA). Les colonnes Shodex B802/B803, pour les masses molaires inférieures à 1.10^6 g.mol⁻¹ et B805/B806 pour les masses molaires comprises entre 6.10^6 et 1.10^7 g.mol⁻¹ sont montées en série. L'éluant utilisé est une solution de nitrate de sodium (NaNO₃ ; 0,1 M) contenant de l'azoture de sodium (2 %), le débit de l'éluant a été fixé à 0,5 ml.min⁻¹.

2.6. Dosage de charges des whiskers

La détermination du taux de charge des whiskers se fait par dosage conductimétrique par une solution de soude. La suspension de whiskers, de concentration massique connue, est diluée dans un volume d'eau suffisant pour immerger l'électrode. Ainsi, à 2 ml de suspension (17,5 mg.ml⁻¹) sont ajoutés 20 ml d'eau distillée. Puis le dosage est effectué par une solution de NaOH de concentration 2.10^{-4} M à l'aide d'un conductimètre de type CDM 210 et d'une électrode CDM 614T. La suspension est agitée tout au long du dosage. La Figure 63 représente la courbe de dosage obtenue dans le cas des whiskers de cellulose de papier Whatman.

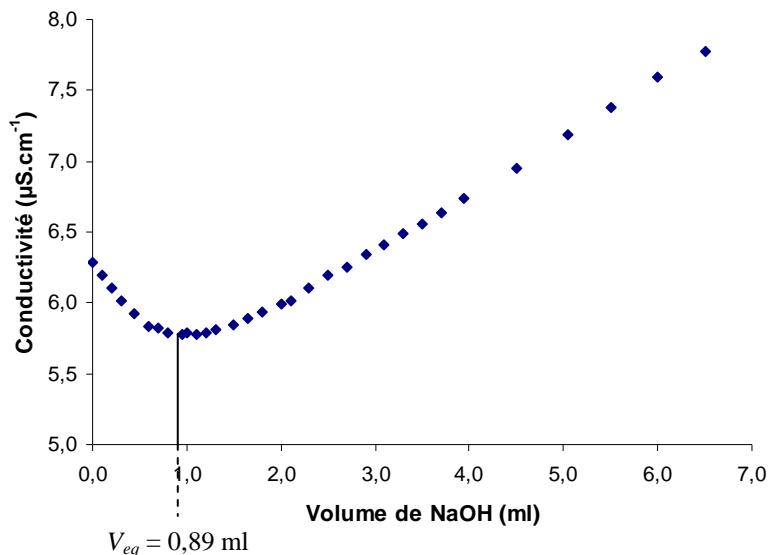


Figure 63 : Courbe de dosage conductimétrique d'une suspension de whiskers de papier coton Whatman (1,6 mg.ml⁻¹ ; 22 ml) par une solution de NaOH (2.10^{-4} M)

A l'équivalence, la relation suivante (14) est vérifiée :

$$V_{eq} \times C_{soude} = n_{cellulose} \times d_s \quad (14)$$

où V_{eq} est le volume équivalent de la soude, C_{soude} sa concentration, $n_{cellulose}$ le nombre de moles de résidus de glucose et d_s le degré de substitution, c'est-à-dire le nombre d'atomes de soufre par unité glucose. Or $n_{cellulose}$ est donné par la relation :

$$n_{cellulose} = \frac{m_{cellulose}}{M_{moy}} \quad (15)$$

où $m_{cellulose}$ est la masse sèche de nanocristaux que l'on dose et M_{moy} , la masse molaire moyenne d'un résidu de glucose au sein du type de cellulose considéré. M_{moy} vérifie l'équation (16) :

$$M_{moy} = (1 - d_s) \times 162 + 242 d_s \quad (16)$$

où 162 g.mol^{-1} et 242 g.mol^{-1} sont respectivement les masses molaires d'une unité glucose seule et d'une unité sulfatée. Les équations (14) et (15) permettent de déduire l'expression de d_s :

$$d_s = \frac{V_{eq} \times C_{soude} \times M_{moy}}{m_{cellulose}} \quad (17)$$

Le système de deux équations à deux inconnues (d_s et M_{moy}) formé par les équations (16) et (17) peut alors être résolu. La masse molaire moyenne est ainsi calculée d'après la relation suivante :

$$M_{moy} = \frac{162}{1 - \frac{80 \times V_{eq} \times C_{soude}}{m_{cellulose}}} \quad (18)$$

Puis le degré de substitution (d_s) est calculé grâce à l'équation (17). Enfin, le taux de soufre, τ_s , est donné par la relation suivante :

$$\tau_s = \frac{32 \times d_s}{M_{moy}} \quad (19)$$

où 32 g.mol^{-1} est la masse molaire du soufre.

3. Préparation des substrats celluloseux et extraction des XGs naturels

3.1. Cellulose

3.1.1. Cellulose bactérienne (CB)

Conditions de culture

La cellulose bactérienne est produite à partir de la souche bactérienne *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 53524). Cette souche a été choisie pour sa résistance à l'agitation, garantissant une meilleure homogénéité du milieu et son absence de caractère acidifiant car elle ne produit pas d'acide gluconique. Elle est conservée à -80 °C dans un mélange de 0,5 ml d'une culture active de bactéries et 0,5 ml d'une solution stérile de glycérol à 50 %.

Le milieu de culture décrit par Hestrin et Schramm²⁵ dont la composition est reportée en Annexe 5 est utilisé. Il estensemencé à partir d'une aliquote d'une pré-culture de *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 53524) dans un milieu identique prélevée dès l'apparition de la biosynthèse de la cellulose. La cellulose est ensuite récupérée après 5 à 7 jours de culture à 20 °C.

Broyage en milieu humide

Ces échantillons de cellulose sont alors broyés au « waring blender » par 4 à 6 broyages de quelques secondes, en présence de glace, permettant d'améliorer le broyage et d'éviter l'échauffement.

Plasmolyse et lyse des cellules

Le mélange broyé obtenu est centrifugé puis redispersé dans une solution de saccharose à 25 %. Afin de provoquer la plasmolyse des cellules bactériennes, la suspension est conservée environ 15 min avec une faible agitation afin de favoriser l'imbibition interne. Bien que les *endo*-glucanases soient toujours actives, leur l'activité est limitée par la pression osmotique. Après centrifugation, le culot est récupéré et redispersé rapidement dans un volume suffisant d'eau. Plusieurs cycles de lavages/centrifugation (4 °C, 10 min, 20.10³ g) sont alors nécessaires.

Le culot est repris dans du tampon Tris-HCl (30 mM ; pH = 8) contenant de l'EDTA (10 mM) et du SodiumDodécylSulfate (SDS ; 1 %).

La protéinase K, préalablement dispersée dans un faible volume de solution d'EDTA utilisée précédemment est alors ajoutée (0,01 mg.mg_{protéine}⁻¹). Le milieu est alors maintenu à 37 °C pendant 3 h minimum. La réaction enzymatique est stoppée par refroidissement rapide de la solution dans un bain d'eau glacée.

Traitement à la soude

Après lavage et centrifugation, la cellulose est dispersée dans une solution de soude (0,1 M) puis chauffée à 90 °C pendant 30 min. La phase solide est alors lavée à l'eau et centrifugée jusqu'à neutralisation du surnageant, puis dialysée en présence d'azoture de sodium. La cellulose bactérienne (CB) ainsi obtenue est conservée humide à 4 °C.

3.1.2. Cellulose bactérienne micro-cristalline (BMCC)

Hydrolyse de la cellulose bactérienne (CB)

La BMCC est préparée à partir de CB par hydrolyse à l'acide chlorhydrique.¹⁶⁷ Le culot de CB humide obtenu après traitement à la soude (environ 3 % de matière sèche) est dispersé dans une solution de HCl (2,5 M, 100 ml). Le mélange est porté à reflux ($T_{\text{bain}} = 100$

°C) pendant 1 h. Puis après centrifugation (4 °C, 10 min, 20 000 g), et retrait du surnageant, l'hydrolyse est poursuivie pendant 30 min à reflux dans les mêmes conditions que précédemment avec renouvellement du HCl. Les opérations de centrifugation et de renouvellement de HCl sont réitérées une seconde fois. Suite à ces trois phases d'hydrolyse, le milieu est lavé et centrifugé (4 °C, 10 min, 20 000 g), plusieurs fois à l'eau jusqu'à neutralisation du surnageant, puis le rinçage est complété par dialyse en présence d'azote de sodium.

Blanchiment par traitement à la potasse

La BMCC ainsi obtenue présente parfois une légère coloration grise. Après dialyse, les microfibrilles sont dispersées dans une solution de KOH (5 % dans l'eau) et le milieu est maintenu une nuit sous faible agitation. La phase solide est ensuite rincée à l'eau distillée par centrifugation puis dispersée dans une solution de chlorite de sodium (17 g.l⁻¹) dans un tampon acétate (0,2 M ; pH = 4,5). La suspension est alors maintenue à 80 °C pendant 6 h en changeant la solution toutes les 2 h. La phase solide est rincée à l'eau distillée puis dialysée en présence d'azote de sodium. La BMCC est alors centrifugée et conservée humide à 4 °C.

3.1.3. Whiskers

Les feuilles de papier Whatman grade 20 Chr sont découpées finement. Une pulpe est obtenue par broyage dans l'eau distillée au « waring blender ». La phase solide est filtrée et essorée. La pulpe essorée est dispersée (1 à 2 %) dans une solution d'acide sulfurique 65 % (w/w) préalablement refroidi en maintenant le flacon dans un bain de glace fondante. Le mélange est traité à nouveau au « waring blender » pendant 15 min, l'auto-échauffement est évalué à 60 °C environ. La suspension est passée à l'homogénéiseur haute pression (Manton-Gaulin, 15MR-8TBA), 15 passages à 500 bars sont réalisés tout en évitant d'atteindre des températures supérieures à 90 °C. La suspension de microcristaux obtenue est dialysée contre de l'eau distillée

3.1.4. Whiskers désulfatés

La suspension de whiskers de papier (17 mg.ml^{-1} ; 4,5 ml) est introduite dans un tube en verre muni de bouchon comportant un joint en téflon. Puis après l'addition d'acide trifluoroacétique (10 M ; 0,5 ml), le milieu est maintenu pendant 2 h 30 à 20 °C, 40 °C, 60 °C ou 80 °C en fonction des échantillons. Les différents échantillons sont ensuite refroidis dans un bain de glace avant d'être dialysés contre de l'eau (seuil de coupure = $6-8.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$).

3.2. Préparation de XGs et XGOs par extraction et/ou hydrolyse

3.2.1. XGs de tamarin extraits de graines

D'autres XGs ont été extraits de graines de tamarin selon la méthode de Kooiman.¹⁶⁸ Après avoir ôté le tégument des graines, celles-ci sont finement broyées, puis le milieu est extrait à l'éthanol (80 %), à reflux pendant 6 h. Après centrifugation (2.10^3 g , 30 min, 10 °C) le culot est repris dans l'eau, et est extrait 1 h à 100 °C. Le mélange est alors à nouveau centrifugé et traité à l'eau comme précédemment. Après trois extractions successives, les surnageants sont réunis et le précipité généré par addition d'éthanol (3 fois le volume du mélange) est récupéré, dialysé et lyophilisé. Les XGs ainsi récupérés sont ultrafiltrés sur membrane Amicon de seuil de coupure $10.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Le rétentat est la fraction ultérieurement utilisée.

3.2.2. XGs de *Rubus fruticosus*

Culture de cellules

Les cultures des cellules de *Rubus fruticosus* (ronce) sont été effectuées par Marie-France Marais (CERMAV). Les cellules issues de cals sont mises en culture en milieu de Heller liquide et supplémenté avec de la vitamine B1 (1 mg.ml^{-1}) et du glucose (0,11 M). La culture est maintenue par repiquage des cellules toutes les trois semaines. Une aliquote de

suspension (20 ml) est ensuite transférée dans 80 ml de milieu fraîchement préparé dans des erlenmeyers de 250 ml. Les cellules sont maintenues en culture pendant 24 jours après inoculation. Les cellules sont séparées du milieu de culture par filtration sur verre fritté n° 2 et lavées à l'eau.

XGs de Rubus pariétaux (XG_{RP})

L'extraction des pectines à partir des parois des cellules végétales se fait en plusieurs étapes. Dans un premier temps le matériel pariétal (environ 5 g sec) est mis en suspension dans une solution d'EDTA (2 % Na₂EDTA ; 500 ml ; pH = 5) pendant 2 h à 70 °C sous agitation douce. Puis les parois cellulaires sont filtrées sur verre fritté n° 2. Le résidu de filtration est ensuite soumis à deux extractions successives à l'oxalate d'ammonium (0,5 % ; 500 ml ; pH = 6,5) pendant 2 h à 80 °C. Le matériel résiduel est filtré. Enfin l'élimination finale des pectines consiste en un traitement au borohydrure de sodium (1 % NaBH₄, 500 ml) à 20 °C pendant 15 h sous azote. Après filtration, le résidu est mis en suspension dans une solution d'hydroxyde de sodium (2,5 N ; 500 ml) et maintenu sous faible agitation pendant 6 h à 20 °C sous azote, le mélange est filtré puis le résidu de filtration est soumis à une nouvelle extraction dans les mêmes conditions pendant 16 h. Les filtrats sont ensuite rassemblés, dialysés et lyophilisés. Les XGs sont ensuite purifiés et ultrafiltrés sur membrane Amicon (10.10³ g.mol⁻¹)

XGs de Rubus extra-cellulaires (XG_{REC})

La culture des cellules de *Rubus fruticosus* est filtrée sur verre fritté n° 2. Le filtrat ainsi récupéré est centrifugé (3.10³ g, 25 min, 10 °C) une première fois, puis, après un cycle congélation/décongélation, le milieu est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant est alors ultrafiltré sur membrane MinitanTM (seuil de coupure = 10.10³ g.mol⁻¹). Les polysaccharides acides présents dans le rétentat (M > 10.10³ g.mol⁻¹) sont alors précipités au moyen d'une solution de sulfate de cuivre (CuSO₄ 7 %, 20 ml.150 ml_{solution}⁻¹) pendant 4 h à 4°C. Après élimination de ces polysaccharides par centrifugation (3 000 g, 25 min, 10 °C), le surnageant est précipité à l'éthanol 96 % (éthanol/solution ; 3/1). Le résidu solide est récupéré par centrifugation (3.10³ g, 25 min, 10 °C), puis les ions présents sont éliminés par dialyse et

le mélange xyloglucanes-arabinogalactanes est lyophilisé. Ce mélange est ensuite solubilisé dans le tampon phosphate (10 mM, pH = 7) puis les deux composés sont séparés par fractionnement sur résine échangeuse d'anions (DEAE Sephadex A50, 5 g.100 mg_{soluté}⁻¹) préalablement réhydratée et lavée au tampon phosphate. Après 1 h de mise en contact de la résine et du soluté, les XGs solubles sont récupérés par filtration du mélange sur verre fritté. La fraction est alors lyophilisée puis ultrafiltrée sur membrane Amicon (seuil de coupure = 10.10³ g.mol⁻¹). Le rétentat contenant les XGs de masse supérieure à 10.10³ g.mol⁻¹ est alors lyophilisé.

XGs de Rubus extra-cellulaires enrichis en ¹³C (XG_{REC13C})

Pour la préparation des XG_{REC13C}, le glucose utilisé lors de la culture des cellules végétales est du glucose marqué au ¹³C (10 %). Excepté cette différence, le mode opératoire utilisé est identique à celui décrit pour l'obtention des XG_{REC} décrit au paragraphe précédent.

3.2.3. Désacétylation des XG_{REC}

Les XG_{REC} (300 mg) sont désacétylés par addition d'une solution de soude (0,1 M ; 50 ml). Le mélange est maintenu 2 h sous agitation en vérifiant la valeur du pH (pH ≈ 10). Le milieu est ensuite neutralisé par l'acide acétique (50 %) et ultrafiltré (seuil de coupure = 10.10³ g.mol⁻¹) avant d'être lyophilisé.

3.2.4. Hydrolyse partielle de XGs

Hydrolyse partielle et séparation par précipitation

Ces fractions de XGs de tamarin partiellement hydrolysées sont obtenues, après hydrolyse, par précipitation dans un mélange eau/méthanol de différentes proportions.

Ainsi, les XGs de tamarin de catégorie 3S sont solubilisés (2 g.l⁻¹) dans une solution de tampon acétate (0,1 M ; pH = 4,5) par chauffage 30 min à 50 °C sous agitation puis une nuit à température ambiante toujours sous agitation. Après retrait des insolubles par centrifugation

($20 \cdot 10^3$ g ; 10 min ; 25 °C) le surnageant est récupéré et hydrolysé par l'*endo*-glucanase Cel5A ($5 \mu\text{l} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$; $61 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$). L'attaque enzymatique est poursuivie 10 min à 30 °C et stoppée ensuite par immersion dans un bain d'eau bouillante pendant 10 min. La solution est ensuite refroidie puis les XGOs formés sont séparés en fonction de leur masse molaire par précipitation fractionnée à 4 °C en utilisant le méthanol.

Vol. H ₂ O	Vol. MeOH	% MeOH (v/v)	M _w (g.mol ⁻¹)
2	1	0,33	-
4	3	0,43	$2 \cdot 10^3$
1	1	0,50	-
1	2	0,66	$1 \cdot 10^3$
1	3	0,75	-
1	5	0,83	-

Les deux fractions utilisées dans ces travaux sont les fractions XGO_{1/2} et XGO_{4/3} précipitées avec des mélanges de proportions respectives : eau/méthanol ; 1/2 et 4/3. Les masses molaires moyennes mentionnées dans le tableau ci-dessus ont été déterminées par spectrométrie de masse (§ 3.1.1) et par chromatographie d'exclusion stérique (§ 3.1.4).

Hydrolyse partielle et séparation par chromatographie sur gel de silice

Les XGs de tamarin de catégorie 3A (1,5 g) sont dissous dans l'eau (150 ml) sous agitation à 35 °C pendant une nuit puis 15 min à 60 °C. La solution ainsi obtenue est introduite dans une cellule d'ultrafiltration munie d'une membrane en polyéthersulfone de seuil de coupure $10 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹. La cellulase de *Trichoderma reesei* ($5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; 5.2 mg) est alors ajoutée au milieu. L'hydrolyse est ainsi effectuée de manière concomitante à l'ultrafiltration pendant deux jours. Le filtrat ainsi récupéré et concentré puis séché en présence de silice. Ce mélange est déposé sur une colonne de silice. Une élution par le gradient (eau/acétonitrile ; 20/80, puis 25/75 et 30/70) permet d'isoler trois fractions : [XGO]₁ (474 mg) ; [XGO]₂ (407 mg) et [XGO]₃ (170 mg).

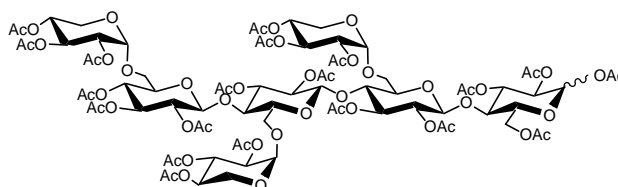
Les trois fractions [XGO]₁, [XGO]₂, [XGO]₃, sont analysées en spectrométrie de masse. Ces analyses confirment que les fractions [XGO]₁, [XGO]₂ et [XGO]₃, sont

constituées exclusivement de XGOs comportant respectivement 4, 8 et 12 résidus glucosyle sur leur chaîne principale.

4. Synthèses et Caractérisations

La nomenclature utilisée a été adaptée de celle publiée en anglais : "International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (1997) Nomenclature of Carbohydrates, *J. Carbohydr. Chem.*, 16, 1191-1280.

[(2,3,4-Tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tétra-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranose (1)



Mode opératoire A

Les xyloglucanes (Dainippon, catégorie 3A) de graines de tamarin (7,5 g) sont mis en suspension dans l'eau (1 l). Le milieu est maintenu sous agitation 2 h à 60 °C. Une fois les XGs solubilisés et après retour à 37 °C, la cellulase 3042A (Genencor) est ajoutée (563 μ l) ainsi que l'azotate de sodium (100 mg). Le milieu est incubé 20 h à 37 °C, porté à ébullition 20 min dans un bain d'huile préalablement chauffé à 120 °C, puis ramené à température ambiante. La β -D-galactosidase d'*Aspergillus niger* (350 μ l ; 20,1 mg) est alors introduite dans le milieu. Après 24 h sous agitation à 60 °C, l'enzyme est dénaturée en portant à ébullition pendant 20 min, le milieu qui est ensuite lyophilisé.

Le résidu (6,4 g) est solubilisé dans la pyridine (200 ml) puis l'anhydride acétique (100 ml) ainsi qu'une quantité catalytique de DMAP sont ajoutés à 0 °C. Après une nuit, sous

agitation à température ambiante, à l'abri de la lumière, le milieu réactionnel est précipité dans une quantité importante d'eau glacée. Le précipité est filtré sur Celite[®], solubilisé dans du dichlorométhane puis séché sur sulfate de sodium anhydre. Après concentration le milieu est coévaporé plusieurs fois au toluène. La purification est réalisée par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 3/2 puis 2/1). Le produit **1**¹⁶⁹ est obtenu avec un rendement massique de 40 %.

Le produit **1** est également obtenu comme produit secondaire lors de la synthèse d'autres composés.

Mode opératoire B

Le produit **1** est obtenu avec un rendement massique de 5 % lors de l'obtention du produit **2** utilisant la β -D-galactosidase d'*Aspergillus niger*.

Mode opératoire C

Le produit **1** est obtenu avec un rendement massique de 10 % lors de l'obtention du produit **2** utilisant la préparation enzymatique 3042B.

Mode opératoire D

Le produit **1** est obtenu avec un rendement massique de 7 % lors de l'obtention du produit **3**.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1925 [M+Na]^+$

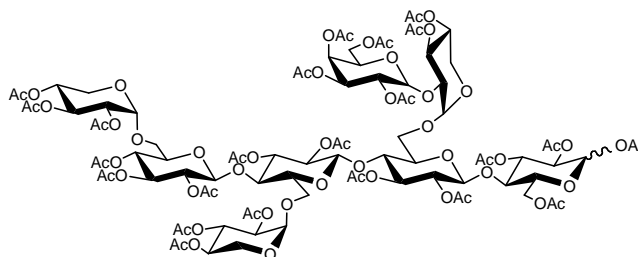
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 6.17 (d, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, 0.2H, H-1^{Glc Ia}), 5.64 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 0.8H, H-1^{Glc Ib}), 5.40-5.33 (m, 3H, H-3^{Glc Ia, Xyl II, III, IV}) ; 5.20-5.00 (m, 7H, H-1^{Xyl II, III, H-3^{Glc Ib, II, III, IV}, H-4^{Glc IV}}) ; 5.00-4.76 (m, 10H, H-1^{Glc IV, Xyl IV}, H-2^{Glc I, IV, Xyl II, III, IV}, H-4^{Xyl II, III, IV}) ; 4.68-4.64 (m, 3H, H-1^{Glc III}, H-2^{Glc II, III}) ; 4.49 (d, $J = 7.9$ Hz, 0.2H, H-1^{Glc II}) ; 4.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 0.8H, H-1^{Glc II}) ; 4.36 (dd, $J_{5,6a} = 1.8$ Hz et $J_{6a,6b} = 10.8$ Hz, 1H, H-6a^{Glc I}) ; 4.11-3.89 (m, 8H, H-4^{Glc II, III}, H-5a^{Xyl II, III}, H-5^{Glc Ia, IV}, H-6a^{Glc II, III}, H-6b^{Glc I}) ; 3.82-3.63

(m, 11H, H-4^{Glc I}, H-5^{Glc I β , Glc III, Xyl IV}, H-5b^{Xyl II, III}, H-6^{Glc IV}, H-6b^{Glc II, III}); 3.32 (m, 1H, H-5^{Glc II}); 2.10-19.4 (m, 60H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.5-168.8 (CH₃CO) ; 100.8, 100.7, 100.6, 100.4 (C-1^{Glc II, III, IV}) ; 97.3, 97.2 (C-1^{Xyl II, III}) ; 96.1 (C-1^{Xyl IV}) ; 91.4 (C-1^{Glc I β}) ; 88.5 (C-1^{Glc I α}) ; 76.4, 75.4, 75.3, 74.9, 74.8, 73.5, 73.5 (2C), 72.9, 72.7, 72.2, 72.0, 72.0, 71.8, 71.0, 70.9, 70.8, 70.6, 69.6, 69.4 (3C), 69.3, 69.2 (2C) (C-2^{Glc I, II, III, IV et Xyl II, III, IV}, C-3^{Glc I, II, III, IV et Xyl II, III, IV}, C-4^{Glc I, II, III, IV et Xyl II, III, IV}, C-5^{Glc I, II, III, IV}) ; 67.5 (C-6^{Glc IV}) ; 65.7 (C-6^{Glc III}) ; 65.3 (C-6^{Glc II}) ; 62.1 (C-6^{Glc I β}) ; 61.8 (C-6^{Glc I α}) ; 59.3, 59.1, 58.9 (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.0-20.7 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H et RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

[(2,3,4-Tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tétra-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranose (2**)**



Mode opératoire A

Après solubilisation dans l'eau (1 l) des xyloglucanes (Dainippon, catégorie 3A) de graines de tamarin (10,2 g) sous agitation à 60 °C pendant 2 h, la cellulase 3042A (Genencor) est ajoutée (2,7 ml) ainsi que l'azoture de sodium. Le milieu est incubé pendant une nuit à 37 °C, porté à ébullition 20 min dans un bain d'huile préalablement chauffé à 120 °C, puis ramené à température ambiante. Après acidification à pH = 4-5 par l'acide acétique (50 %

dans l'eau), la β -D-galactosidase d'*Aspergillus niger* (10 μ l ; 0,4 mg) est introduite dans le milieu. Après 48 h à 25 °C sous agitation, de la galactosidase est à nouveau ajoutée (18 μ l ; 0,6 mg) et le milieu est maintenu à nouveau 48 h sous agitation à température ambiante avant d'être porté à ébullition pour dénaturer l'enzyme puis lyophilisé.

Le mélange lyophilisé est solubilisé dans la pyridine (300 ml). L'anhydride acétique (150 ml) est ajouté avec précaution à 0 °C ainsi d'une quantité catalytique de DMAP. Le milieu est maintenu une nuit à température ambiante sous agitation et à l'abri de la lumière. Le produit est ensuite précipité dans de l'eau glacée (2 l), puis est filtré sur Celite® à l'aide d'un büchner. Après solubilisation dans le dichlorométhane, le milieu est lavé avec à l'eau puis séché sur sulfate de sodium anhydre et concentré. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 2/1), le produit **2** est obtenu avec un rendement massique de 45 %.

Mode opératoire B

L'hydrolyse des xyloglucanes de graines de tamarin (501 mg) en solution (250 ml) utilisant la cellulase 3042 A (1,8 ml) est identique à celle réalisée dans le mode opératoire A. Après désactivation de la cellulase par ébullition, la préparation enzymatique 3042B (Genencor) est ajoutée (250 μ l) dans le milieu qui est incubé une nuit à 25 °C sous agitation. L'enzyme est désactivée en portant le milieu réactionnel à ébullition pendant 10 min, puis celui-ci est centrifugé et lyophilisé.

L'acétylation, dans la pyridine (17 ml) utilisant l'anhydride acétique (10 ml) et une quantité catalytique de DMAP, est opérée de façon similaire à celle décrite dans le mode opératoire A. Le produit **2** est obtenu, après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 1/3), avec un rendement massique de 48 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2214 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₉₁H₁₂₂O₆₁Na

$m/z = 2213,6287$; $m/z_{\text{théor.}} = 2213,6342$

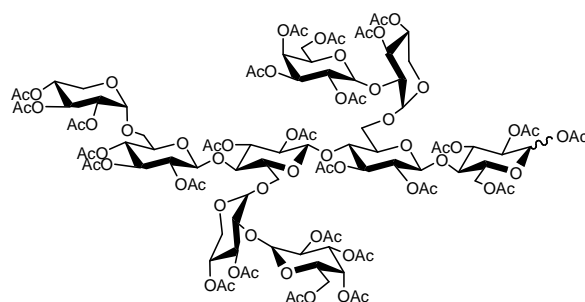
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 6.19 (d, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, 0.4H, H-1^{Glc Ia}) ; 5.65 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 0.6H, H-1^{Glc Ib}) ; 5.44-5.30 (m, 4H, H-3^{Glc Ia, IV, Xyl II, III, IV}) ; 5.23-4.82 (m, 15H, H-1^{Xyl II, III, IV}, H-2^{Glc I, II, Gal II}, H-3^{Glc Ib, II, III, Gal II}, H-4^{Glc IV, Xyl II, III, IV, Gal II}) ; 4.80-4.63 (m, 6H, H-1

Glc III, IV, H-2^{Glc III, IV, Xyl III, IV}); 4.59-4.46 (m, 3H, H-1^{Glc II, Gal II, H-6a^{Glc I}}); 4.15-4.12 (m, 2H, H-6^{Gal II}); 4.12-3.61 (m, 21H, H-2^{Xyl II}, H-4^{Glc I, II, III}, H-5^{Glc I, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, H-6^{Glc II, III, IV, H-6b^{Glc I}}); 3.44 (m, 1H, H-5^{Glc II}); 2.08-1.95 (m, 69H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7-169.5 (CH₃CO) ; 101.7, 101.6 (2s, C-1^{Glc II}) ; 100.8, 100.7, 100.6, 100.5 (4s, C-1^{Glc III, IV, Gal II}) ; 98.4, 98.3, 97.5 (3s, C-1^{Xyl II, III}) ; 96.1 (C-1^{Xyl IV}) ; 91.7 (C-1^{Glc Iβ}) ; 89.2 (C-1^{Glc Iα}) ; 75.9, 75.8, 75.7, 75.6, 75.3, 75.0, 74.4, 74.2, 73.9, 73.8, 73.4, 73.3, 72.7, 72.5, 72.4, 72.1, 72.0, 71.9, 71.5, 71.1, 70.9, 70.8, 70.7, 70.5, 69.7, 69.6, 69.4, 69.3, 69.2 (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II}) ; C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II} ; C-4^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II} ; C-5^{Glc I, II, III, IV, Gal II}) ; 68.4, 68.3, 67.6, 67.1, 65.6, 65.5 (C-6^{Glc II, III, IV}) ; 61.4 (C-6^{Gal II}) ; 61.9 (C-6^{Glc Iα}) ; 61.6 (C-6^{Glc Iβ}) ; 59.3 (2C), 59.0 (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.2-20.6 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H et RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

[(2,3,4-Tri-O-acétyl-α-D-xylopyranosyl)-(1→6)]-(2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-(1→2)-(3,4-di-O-acétyl-α-D-xylopyranosyl)-(1→6)]-(2,3-di-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-[(2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-(1→2)-(3,4-di-O-acétyl-α-D-xylopyranosyl)-(1→6)]-(2,3-di-O-acétyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-1,2,3,6-tétra-O-acétyl-α,β-D-glucopyranose (3)



Les xyloglucanes de graines de tamarin (7,5 g) sont solubilisés dans l'eau (1 l) sous agitation 2 h à 60 °C. Après retour à 37 °C la cellulase 3042A (Genencor) est ajoutée (1,35 ml) ainsi que l'azoture de sodium (100 mg). Le milieu est incubé 4 h à 37 °C, puis lyophilisé.

Le résidu est solubilisé dans la pyridine (220 ml), l'anhydride acétique (110 ml) ainsi qu'une quantité catalytique de DMAP sont ajoutés à 0 °C. Après une nuit, sous agitation à température ambiante, à l'abri de la lumière, le milieu réactionnel est précipité dans une quantité importante d'eau glacée. Le précipité est filtré sur Celite[®], solubilisé dans du dichlorométhane puis séché sur sulfate de sodium anhydre. Après concentration le milieu est coévaporé plusieurs fois au toluène. La purification est réalisée par chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 2/1). Le produit **3**¹⁶⁹ est obtenu avec un rendement massique de 37 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2502 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₁₀₃H₁₃₈O₆₉Na

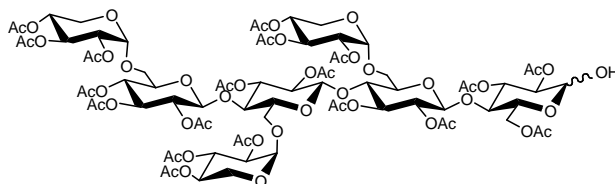
$m/z = 2501,7173$; $m/z_{\text{théor.}} = 2501,7187$

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 6.20 (d, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, 0.4H, H-1^{Glc Ia}) ; 5.64 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 0.6H, H-1^{Glc Ib}) ; 5.44-5.31 (m, 6H, H-3^{Glc Ia, IV, Xyl II, III, IV}, H-4^{Gal II, III}) ; 5.24-5.09 (m, 6H, H-2^{Gal II, III}, H-3^{Glc Ib, II, III}, H-4^{Glc IV}) ; 5.01-4.88 (m, 11H, H-1^{Xyl II, III, IV}, H-2^{Glc I, II, III}, H-3^{Gal II, III}, H-4^{Xyl II, III, IV}) ; 4.80-4.75 (m, 3H, H-1^{Glc IV}, H-2^{Glc Glc IV, Xyl IV}) 4.68-4.51(m, 5H, H-1^{Glc II, III, Gal II, III}, H-6a^{Glc I}) ; 4.15-4.06 (m, 5H, H-6^{Gal II, III}, H-6b^{Glc I}) ; 3.96-3.46 (m, 22H, H-2^{Xyl II, III}, H-4^{Glc I, II, III}, H-5^{Glc I, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, H-6^{Glc II, III, IV}) ; 3.43 (m, 1H, H-5^{Glc II}) ; 2.14-1.95 (m, 78H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7-169.0 (CH₃CO) ; 101.6, 101.5 (C-1^{Gal II, III}) ; 101.0, 100.7, 100.6 (C-1^{Glc II, III, IV}) ; 98.8, 98.7, 98.6 (C-1^{Xyl II, III}) ; 96.5 (C-1^{Xyl IV}) ; 91.8 (C-1^{Glc Ib}) ; 89.2 (C-1^{Glc Ia}) ; 77.4, 76.0, 75.9, 75.4, 75.3, 74.6, 73.9, 73.8, 73.2, 73.1, 72.7, 72.5, 72.4, 72.2 (2C), 71.8 (2C), 71.4, 71.3 (2C), 70.9, 70.8, 70.7, 69.7, 69.6, 69.4 (2C), 69.1 (2C), 68.3 (2C), 67.8, 67.1 (2C), 66.5, 64.5 (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-4^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-5^{Glc I, II, III, IV, Gal II, III}, C-6^{Glc II, III, IV}) ; 61.7 (C-6^{Glc Ia}) ; 61.5 (C-6^{Glc Ib}) ; 61.4, 61.3 (C-6^{Gal II, III}) ; 59.4 (2C), 58.9 (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.1-20.7 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H et RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

[(2,3,4-Tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranose (4**)¹²⁸**



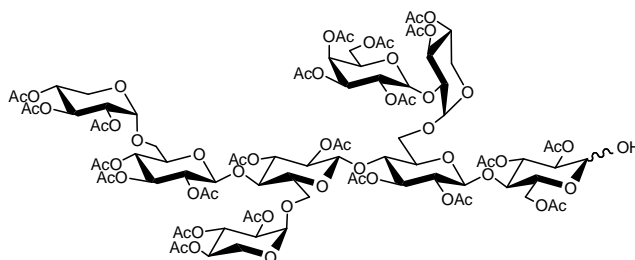
Le produit **1** (3,6 g ; 1,89 mmol) est solubilisé dans le DMF (60 ml). Le milieu est porté à 50 °C avant d'ajouter l'acétate d'hydrazine (284 mg ; 3,08 mmol ; 1,6 éq.), il est ensuite maintenu 1 h sous agitation à 50 °C. Après dilution dans l'acétate d'éthyle, le mélange est lavé avec une solution saturée de chlorure de sodium (3 x 100 ml), puis séché sur sulfate de sodium anhydre, concentré et coévaporé au toluène. Suite à une chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 2/3), l'hémiacétal **4**¹²⁸ est obtenu avec un rendement de 60 %

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2460 [M+Na]^+$

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 5.59-5.26 (m, 5H, H-1^{Glc I}, H-3^{Glc I, Xyl II, III, IV}) ; 5.19-5.10 (m, 2H, H-3^{Glc III, IV}) ; 5.08-5.02 (m, 5H, H-1^{Glc I β , Xyl II, III}, H-3^{Glc II}, H-4^{Glc IV, Xyl III}) ; 4.99 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-1^{Xyl IV}) ; 4.94 (dd, $J = 5.3$ Hz et $J = 9.8$ Hz, 1H, H-4^{Xyl II ou IV}) ; 4.97 (dd, $J = 5.7$ et $J = 10.1$, 1H, H-4^{Xyl II ou IV}) ; 4.89, 4.85 (2d, $J = 10.1$ Hz et $J = 10.2$ Hz, 1H, H-2^{Glc I}) ; 4.83-4.61 (m, 9H, H-1^{Glc II, III, IV}, H-2^{Glc II, III, IV, Xyl II, III, IV}) ; 4.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 0.3H, H-1^{Glc II}) ; 4.40 (dd, $J_{5,6a} = 1.7$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, 1H, H-6a^{Glc I}) ; 4.27 (m, 0.7H, H-5^{Glc I α}) ; 4.13 (dd, $J_{5,6b} = 3.8$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.1$ Hz, 1H, H-6b^{Glc III}) ; 4.01-3.87 (m, 7H, H-4^{Glc II, III}, H-5^{Glc IV}, H-5a^{Xyl II, III}, H-6a^{Glc II, IV}) ; 3.85-3.72 (m, 5H, H-4^{Glc I}, H-5^{Glc I β , Glc II}, H-5a^{Xyl IV}, H-5b^{Xyl III}, H6b^{Glc III}) ; 3.69-3.58 (m, 5H, H-5^{Glc I β} , H-5b^{Xyl II, IV}, H-6b^{Glc II, IV}) ; 3.47 (m, 1H, H-5^{Glc II}) ; 2.10-19.4 (m, 57H, CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

[(2,3,4-Tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranose (5**)**



Le produit **5** est obtenu à partir du produit peracétylé **2** suivant le mode opératoire d'obtention du produit **4**. Une chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/cyclohexane ; 4/5), permet d'obtenir l'hémiacétal **5** avec un rendement de 99 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2172 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₈₉H₁₂₀O₆₀Na

$m/z = 2171,6187$; $m/z_{\text{théor.}} = 2171,6237$

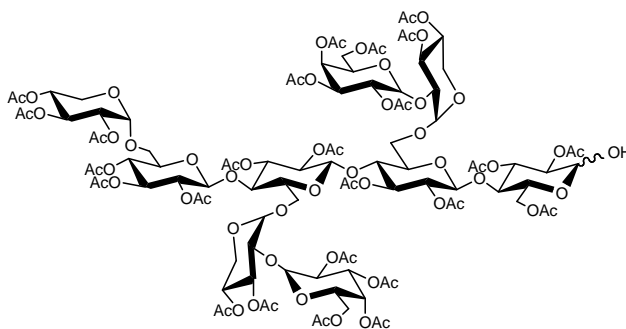
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 5.57-5.28 (m, 5H, H-1^{Glc I}, H-3^{Glc IV, Xyl II, III, IV}) ; 5.40 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3^{Glc I}) ; 5.37-5.28 (m, 4H, H-3^{Glc IV, Xyl II, III, IV}) ; 5.20-4.87 (m, 13H, H-1^{Xyl II, III, IV}, H-2^{Glc I, II, Gal II}, H-3^{Glc II, III}, H-4^{Glc IV, Xyl II, III, IV, Gal II}) ; 4.84-4.66 (m, 8H, H-1^{Glc III, IV, Gal II}, H-2^{Glc III, IV, Xyl III, IV}, H-3^{Gal II}) ; 4.56 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-1^{Glc II}) ; 4.52 (dd, $J_{5,6a} = 1.9$ Hz et $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, 1H, H-6a^{Glc I}) ; 4.23-4.05 (m, 5H, H-5^{Glc I}, H-6^{Gal II}, H-6a^{Glc III}, H-6b^{Glc I}) ; 4.02-3.74 (m, 13H, H-2^{Xyl II}, H-4^{Glc I, II, III}, H-5^{Glc IV, Xyl III, Gal II}, H-5a^{Xyl II}, H-6^{Glc II}, H-6a^{Glc IV}, H-6b^{Glc III}) ; 3.70-3.60 (m, 5H, H-5^{Glc III, Xyl IV}, H-5b^{Xyl II}, H-6b^{Glc IV}) ; 3.48 (m, 1H, H-5^{Glc II}) ; 2.09-1.95 (m, 66H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7-168.8 (CH₃CO) ; 101.8 (2C) (C-1^{Glc II, Gal II}) ; 100.7 (2C) (C-1^{Glc III, IV}), 99.7 (C-1^{Glc I}) ; 98.4, 97.5, 96.1 (C-1^{Xyl II, III, IV}) ; 76.4, 76.3, 75.6, 75.4, 75.0, 74.5, 73.9, 73.5, 72.6, 72.2 (2C), 72.1, 71.9 (2C), 71.5, 70.9 (2C), 70.5, 69.6, 69.5 (3C), 69.3 (3C), 68.5, 68.3, 67.6, 67.2, 65.8, 65.7, 64.1 (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, C-3^{Glc}

I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, C-4^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, C-5^{Glc I, II, III, IV, Gal II}, C-6^{Glc II, III, IV} ; 62.1, 61.6 (C-6^{Glc I, Gal II}) ; 59.3, 59.0 (2C) (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.2-20.57 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H et RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

[(2,3,4-Tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranose (6**)**



Le produit peracétylé **3** (770 mg ; 0,31 mmol) est dilué dans du DMF (9 ml). Le milieu est ensuite porté à 50 °C avant l'addition d'acétate d'hydrazine (58 mg ; 0,63 mmol ; 2 éq.). La réaction est maintenue à 50 °C et sous agitation pendant 30 min puis le milieu est dilué avec de l'acétate d'éthyle (15 ml). Le mélange est lavé avec une solution saturée de chlorure de sodium (3 x 40 ml), séché sur sulfate de sodium anhydre puis concentré et coévaporé au toluène. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 2/3), le produit **6** (444 mg ; 0,18 mmol) est obtenu avec un rendement de 58 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2460 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₁₀₁H₁₃₆O₆₈Na

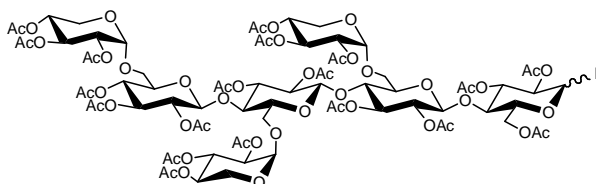
$m/z = 2459,7144$; $m/z_{\text{théor.}} = 2459,7082$

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ (ppm) = 5.59-5.27 (m, 7H, H-1^{Glc I}, H-3^{Glc IV, Xyl II, III, IV}, H-4^{Gal II, III}) ; 5.22-5.08 (m, 6H, H-2^{Gal II, III}, H-3^{Glc I, II, III}, H-4^{Glc IV}) ; 5.01-4.84 (m, 11H, H-1^{Xyl II, III, IV}, H-2^{Glc I, II, III}, H-3^{Gal II, III}, H-4^{Xyl II, III, IV}) ; 4.81-4.48 (m, 7H, H-1^{Glc II, III, IV}, Gal II, III, H-2^{Glc IV, Xyl IV}) ; 4.49 (dd, $J_{5,6a} = 1.5$ Hz et $J_{6a,6b} = 11.0$ Hz, 1H, H-6a^{Glc I}) ; 4.27-4.07 (m, 5H, H-6^{Gal II, III}, H-6b^{Glc I}) ; 3.89-3.52 (m, 23H, H-2^{Xyl II, III}, H-4^{Glc I, II, III}, H-5^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, H-6^{Glc II, III, IV}) ; 2.09-1.95 (m, 78H, CH_3CO) ; 1.79 (br, 1H, OH)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7-169.0 (CH_3CO) ; 101.7, 101.6 (C-1^{Gal II, III}) ; 100.9, 100.6 (2C) (C-1^{Glc II, III, IV}) ; 98.7, 98.6 (C-1^{Xyl II, III}) ; 96.4 (C-1^{Xyl IV}) ; 90.3 (C-1^{Glc I}) ; 76.0, 75.9, 75.7, 75.4, 74.9, 74.8, 74.7, 73.7, 73.1, 72.9, 72.6, 72.4, 72.1 (2C), 72.0, 71.9, 71.8, 71.6, 71.4, 71.3, 70.9, 70.8 (2C), 69.4, 69.4 (3C), 69.2, 69.1, 68.6, 68.5, 68.3, 68.2, (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-4^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-5^{Glc I, II, III, IV, Gal II, III}) ; 67.7 (C-6^{Glc IV}) ; 67.2 (C-6^{Glc III}) ; 67.1 (C-6^{Glc II}) ; 62.1 (C-6^{Glc I α}) ; 61.4 (2C) (C-6^{Gal II, III}) ; 61.3 (C-6^{Glc I β}) ; 59.4, 58.9 (2C) (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.2-20.7 (CH_3CO)

Les attributions des signaux en RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

Fluorure de [(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranosyle (7**)¹²⁸**



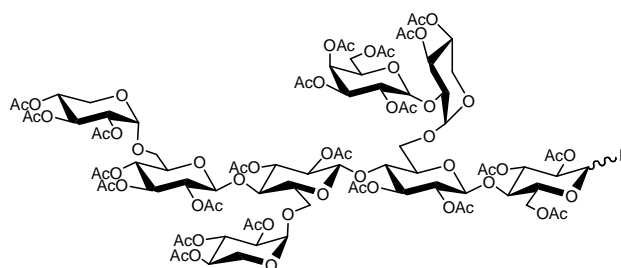
L'hémiacétal **4** (1,2 g ; 645 μmol ; 1 éq) est solubilisé dans le dichlorométhane (25 ml) puis le milieu est refroidi à -30 °C. Le DAST (450 μl ; 3,4 mmol ; 5 éq.) est ensuite ajouté. Le mélange est maintenu 1 h sous agitation à -30 °C puis une nuit à température ambiante. Le DAST est alors neutralisé avec du méthanol (1 ml) puis le milieu est concentré. Après

chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 3/1), préalablement conditionnée avec de la triéthylamine, le produit **7**¹²⁸ (1,1 g ; 569 mmol) est obtenu avec un rendement de 88 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1886 [M+Na]^+$

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.5-168.8 (CH₃CO) ; 105.4 (d, $J_{C,F} = 217.3$ Hz, C-1^{Glc I}) ; 100.8, 100.7, 100.6 (C-1^{Glc II, III, IV}) ; 97.4, 97.3 (C-1^{Xyl II, III}) ; 96.1 (C-1^{Xyl IV}) ; 75.9, 75.3, 75.2 (C-4^{Glc I, II, III}) ; 74.0, 74.9, 73.5, 73.0, 72.9, 72.6, 72.1 (2C), 72.0, 71.9, 71.8, 71.2, 70.9 (2C), 70.6, 69.6, 69.4 (3C), 69.3, 69.2 (2C) (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV}, C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV}, C-4^{Glc IV, Xyl II, III, IV}, C-5^{Glc I, II, III, IV}) ; 67.6 (C-6^{Glc IV}) ; 65.8 (C-6^{Glc III}) ; 65.2 (C-6^{Glc II}) ; 62.1 (C-6^{Glc I}) ; 59.3, 59.1, 59.0 (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.1-20.7 (CH₃CO)

Fluorure de [(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranosyle (8**)**



Le produit **8** est obtenu à partir de l'hémiacétal **5** suivant le mode opératoire d'obtention du produit **7** avec un rendement de 97 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2172 [M+Na]^+$

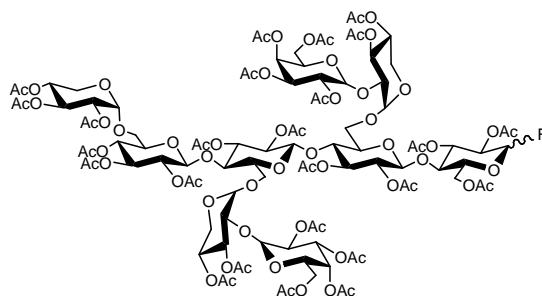
Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₈₉H₁₁₉O₅₉FNa

$m/z = 2173,6245$; $m/z_{\text{théor.}} = 2173,6193$

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ (ppm) = 5.62 (dd, $J_{1,2} = 2.7$ Hz et $J_{\text{C,F}} = 53.0$ Hz, 0.4H, H-1^{Glc Ia}) ; 5.44 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-3^{Glc I}) ; 5.41-5.26 (m, 4H, H-1^{Glc Ib}, H-3^{Glc IV, Xyl II, III, IV}) ; 5.20- 4.88 (m, 13 H, H-1^{Xyl II, III, IV}, H-2^{Glc I, II, Gal II}, H-3^{Glc II, III}, H-4^{Glc IV, Xyl II, III, IV, Gal II}) ; 4.86-4.66 (m, 8H, H-1^{Glc III, IV, Gal II}, H-2^{Glc III, IV, Xyl III, IV}, H-3^{Gal II}) ; 4.63-4.58 (m, 2H, H-1^{Glc II}, H6a^{Glc I}) ; 4.13-4.08 (m, 2H, H-6^{Gal II}) ; 4.05-3.96 (m, 3H, H-5^{Glc I}, H-6a^{Glc III}, H-6b^{Glc I}) ; 3.90-3.71 (m, 13H, H-2^{Xyl II}, H-4^{Glc I, II, III}, H-5^{Glc IV, Xyl III, Gal II}, H-5a^{Xyl II}, H-6^{Glc II}, H-6a^{Glc IV}, H-6b^{Glc III}) ; 3.66-3.63 (m, 5H, H-5^{Glc III, Xyl IV}, H-5b^{Xyl II}, H-6b^{Glc IV}) ; 3.49 (m, 1H, H-5^{Glc II}) ; 2.101.94 (m, 66H, CH_3CO)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7-168.7 (CH_3CO), 106.1 (d, $J_{\text{C,F}} = 215.0$ Hz, C-1^{Glc Ib}) ; 104.1 (d, , $J_{\text{C,F}} = 229.0$ Hz, C-1^{Glc Ia}) ; 101.7 (C-1^{Gal II}) ; 100.8 (2C), 100.5 (C-1^{Glc II, III, IV}) ; 98.2 (C-1^{Xyl II}) ; 97.5 (C-1^{Xyl III}) ; 96.1 (C-1^{Xyl IV}) ; 75.5, 75.4, 75.2 (C-4^{Glc I, II, III}) ; 74.4 (2C), 73.9, 73.5 (2C), 72.4 (2C), 72.1 (3C), 72.0 (2C), 71.5, 70.9 (2C), 70.5, 69.6, 69.4 (3C), 69.3 (2C), 69.2, 68.4 (2C), 67.8, 67.1 (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, C-4^{Glc IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, C-5^{Glc I, II, III, IV, Gal II}, C-6^{Glc IV}) ; 65.5 (2C) (C-6^{Glc II, III}) ; 62.0, 61.3 (C-6^{Glc I, Gal II}) ; 59.2, 59.1, 58.9 (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.1-20.5 (CH_3CO)

Fluorure de [(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranosyle (9**)**



Le produit **9** est obtenu à partir de l'hémiacétal **6** suivant le mode opératoire d'obtention du produit **7**. Le produit **9** est obtenu après chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/toluène ; 3/1 ; dépôt à sec) avec un rendement de 97 %.

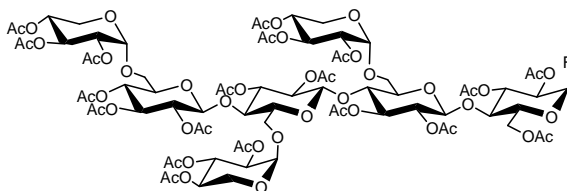
Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₁₀₁H₁₃₅O₆₇FNa

 m/z = 2461,6978 ; m/z_{théor.} = 2461,7038

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 5.62 (dd, $J_{1,2} = 2.7$ Hz, $J_{H,F} = 53.0$ Hz ; 0.2, H-1^{Glc I α}) ; 5.45-5.34 (m, 6H, H-3^{Glc I α , IV, Xyl II, III, IV}, H-4^{Gal II, III}) ; 5.23-5.10 (m, 7H, H-1^{Glc I β} , H-2^{Gal II, III}, H-3^{Glc I β , II, III}, H-4^{Glc IV}) ; 5.05-4.90 (m, 11H, H-1^{Xyl II, III, IV}, H-2^{Glc I, II, III}, H-3^{Gal II, III}, H-4^{Xyl II, III, IV}) ; 4.80-4.77 (m, 3H, H-1^{Glc IV}, H-2^{Glc^{Glc IV}, Xyl IV}) ; 4.71 (m, 1H, H-1^{Glc III}) ; 4.61-4.55 (m, 4H, H-1^{Glc II, Gal II, III}, H-6a^{Glc I}) ; 4.17-4.03 (m, 5H, H-6^{Gal II, III}, H-6b^{Glc I}) ; 3.97-3.62 (m, 21H, H-2^{Xyl II, III}, H-4^{Glc I, II, III}, H-5^{Glc I, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, H-6^{Glc II, III, H-6a^{Glc IV}}) ; 3.56 (dd, $J_{5,6b} = 3.9$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.1$ Hz, 1H, H-6b^{Glc IV}) ; 3.48 (m, 1H, H-5^{Glc II}) ; 2.14-1.93 (m, 75H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.4-168.8 (CH₃CO) ; 106.2 (d, $J_{C,F} = 217.0$ Hz, C-1^{Glc I}) ; 101.5, 101.4 (C-1^{Gal II, III}) ; 100.8, 100.6 (2C) (C-1^{Glc II, III, IV}) ; 98.7, 98.5 (C-1^{Xyl II, III}) ; 96.3 (C-1^{Xyl IV}) ; 76.9 (2C), 75.7, 75.2, 74.9, 74.8, 74.4 (2C), 73.7, 73.1, 73.0, 72.9, 72.6 (2C), 72.1, 72.0, 71.7 (2C), 71.3, 71.2, 70.9, 70.7 (2C), 69.6, 69.3 (3C), 69.1 (2C), 68.2, 68.1 (2C), 67.7, 66.1, 67.0, 66.6 (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-4^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-5^{Glc I, II, III, IV, Gal II, III}, C-6^{Glc II, III, IV}) ; 61.2 (3C) (C-6^{Glc I, Gal II, III}) ; 59.2 (2C), 58.7 (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.0-20.3 (CH₃CO)

Fluorure de [(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle (10**)**



Le fluorure **7** (52 mg ; 28 μ mol) est introduit à l'état solide dans un récipient en plastique puis placé à -50 °C sous agitation. Le mélange HF/pyridine (7/3 ; v/v) est alors ajouté (1 ml) et le refroidissement est arrêté mais l'agitation est maintenue. La température

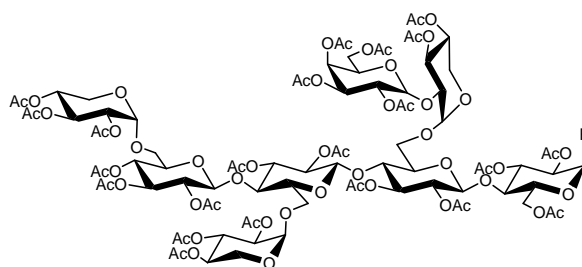
remonte alors lentement pendant 2 h 30 jusqu'à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le milieu réactionnel est dilué dans du dichlorométhane (5 ml), puis versé lentement dans une solution d'ammoniaque (3 M) maintenue dans un bain de glace. La solution est extraite au dichlorométhane puis lavée avec une solution d'hydrogencarbonate de sodium et enfin séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Le produit **10**¹²⁸ (40 mg ; 22 μmol), purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/toluène ; 2/1), est obtenu avec un rendement de 77 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1885 [M+Na]^+$

RMN ¹H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ (ppm) = 5.60 (dd, $J_{1,2} = 2.7\text{ Hz}$ et $J_{\text{H,F}} = 53.0\text{ Hz}$, 1H, H-1^{Glc I}) ; 5.43 (t, $J = 9.4\text{ Hz}$, 1H, H-3^{Glc I}) ; 5.39-5.33 (m, 3H, H-3^{Xyl II, III, IV}) ; 5.18-5.12 (m, 2H, H-3^{Glc III, IV}) ; 5.09-5.02 (m, 5H, H-1^{Xyl II, III}, H-3^{Glc II}, H-4^{Glc IV, Xyl II}) ; 5.00-4.91 (m, 4H, H-1^{Xyl IV}, H-2^{Glc I}, H-4^{Xyl III, IV}) ; 4.88, 4.83 (2dd, $J = 3.4\text{ Hz}$ et $J = 10.2\text{ Hz}$, 2H, H-2^{Xyl II, III}) ; 4.80-4.76 (m, 3H, H-1^{Glc IV}, H-2^{Glc IV, Xyl IV}) ; 4.71-4.64 (m, 3H, H-1^{Glc III}, H-2^{Glc II, III}) ; 4.51 (d, $J = 7.9\text{ Hz}$, 1H, H-1^{Glc II}) ; 4.47 (dd, $J_{5,6a} = 1.9\text{ Hz}$ et $J_{6a,6b} = 12.3\text{ Hz}$, 1H, H6a^{Glc I}) ; 4.12 (dd, $J_{5,6b} = 4.4\text{ Hz}$ et $J_{6a,6b} = 12.2\text{ Hz}$, 1H, H6b^{Glc I}) ; 4.07-3.89 (m, 8H, H-4^{Glc II, III}, H-5^{Glc I, IV}, H-5a^{Xyl II, III}, H-6a^{Glc II, III}) ; 3.85-3.68 (m, 7H, H-4^{Glc I}, H-5^{Glc III}, H-5a^{Xyl IV}, H-5b^{Xyl II, III}, H-6a^{Glc IV}, H-6b^{Glc III}) ; 3.66-3.61 (m, 3H, H-5b^{Xyl IV}, H-6b^{Glc II, Glc IV}) ; 3.36 (m, 1H, H-5^{Glc II}) ; 2.11-1.94 (m, 57H, CH_3CO)

RMN ¹³C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7-168.8 (CH_3CO) ; 103.8 (d, $J_{\text{C,F}} = 228.2\text{ Hz}$, C-1^{Glc I}) ; 100.8 (C-1^{Glc III}) ; 100.6 (C-1^{Glc IV}) ; 100.3 (C-1^{Glc II}) ; 97.4, 97.3 (C-1^{Xyl II, III}) ; 96.1 (C-1^{Xyl IV}) ; 75.8, 75.4, 75.3 (C-4^{Glc I, II, III}) ; 74.9, 74.8, 73.5, 72.9, 72.8, 72.2, 72.0 (2C), 71.8, 70.9 (2C), 70.7 (2C), 70.6, 69.7, 69.6, 69.4 (3C), 69.3, 69.2 (2C) (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV}, C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV}, C-4^{Glc IV, Xyl II, III, IV}, C-5^{Glc I, II, III, IV}) ; 67.5 (C-6^{Glc IV}) ; 65.8, 65.5 (C-6^{Glc II, III}) ; 61.5 (C-6^{Glc I}) ; 59.3, 59.2, 59.0 (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.1-20.7 (CH_3CO)

Fluorure de [(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle (**11**)



Dans un premier temps, le mode opératoire d'obtention du produit **10** est reproduit sur le mélange d'anomères **8** (1,45 g, 674 μ mol). Cependant, il reste après purification du composé β -fluoruré. L'anomérisation est à nouveau effectuée dans des conditions similaires mais à une température de 0 °C et pendant 45 min. Les étapes de lavage sont identiques et après une purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/toluène ; 2/1), préalablement conditionnée avec de la triéthylamine, le produit **11** (765 mg, 356 μ mol) est obtenu avec un rendement de 53 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2174 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₈₉H₁₁₉O₅₉FNa

$m/z = 2173,6218$; $m/z_{\text{théor.}} = 2173,6193$

$[\alpha]_D = +57$ ($c = 1.0$, chloroforme)

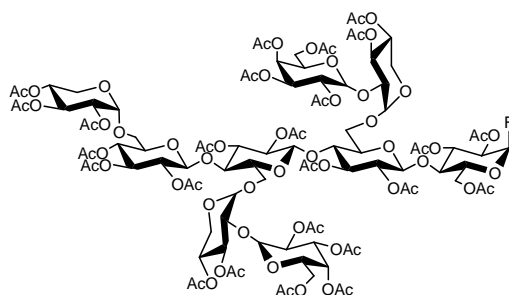
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 5.62 (dd, $J_{1,2} = 2.7$ Hz et $J_{C,F} = 53.1$ Hz, 1H, H-1^{Glc I}) ; 5.44 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-3^{Glc I}) ; 5.42-5.27 (m, 4H, H-3^{Glc IV, Xyl II, III, IV}) ; 5.21- 4.86 (m, 13 H, H-1^{Xyl II, III, IV}, H-2^{Glc I, II, Gal II}, H-3^{Glc II, III}, H-4^{Glc IV, Xyl II, III, IV, Gal II}) ; 4.83-4.65 (m, 8H, H-1^{Glc III, IV, Gal II}, H-2^{Glc III, IV, Xyl III, IV}, H-3^{Gal II}) ; 4.61-4.56 (m, 2H, H-1^{Glc II}, H6a^{Glc I}) ; 4.15-4.12 (m, 2H, H-6^{Gal II}) ; 4.10-3.98 (m, 3H, H-5^{Glc I}, H-6a^{Glc III}, H-6b^{Glc I}) ; 3.96-3.74 (m, 13H, H-2^{Xyl II}, H-4^{Glc I, II, III}, H-5^{Glc IV, Xyl III, Gal II}, H-5a^{Xyl II}, H-6^{Glc II}, H-6a^{Glc IV}, H-6b^{Glc III}) ;

3.71-3.60 (m, 5H, H-5^{Glc III, Xyl IV}, H-5b^{Xyl II}, H-6b^{Glc IV}); 3.42 (m, 1H, H-5^{Glc II}); 2.17-1.94 (m, 66H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7-168.7 (CH₃CO), 103.9 (d, $J_{C,F}$ = 227.6 Hz, C-1^{Glc I}); 101.5 (C-1^{Gal II}); 100.8, 100.6, 100.5 (C-1^{Glc II, III, IV}); 98.5 (C-1^{Xyl II}); 97.5 (C-1^{Xyl III}); 96.1 (C-1^{Xyl IV}); 75.9, 75.6, 75.2 (C-4^{Glc I, II, III}); 74.4 (2C), 74.0, 73.5, 73.2, 72.5, 72.1 (2C), 72.0, 71.9, 71.5, 71.2, 70.9, 70.7, 70.6, 70.5, 69.6, 69.5 (2C), 69.4 (2C), 69.3, 69.2 (2C), 68.4, 67.1 (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, C-4^{Glc IV, Xyl II, III, IV, Gal II}, C-5^{Glc I, II, III, IV, Gal II}); 67.6 (C-6^{Glc IV}); 66.7, 66.5 (C-6^{Glc II, III}); 61.4 (2C) (C-6^{Glc I, Gal II}); 59.3 (2C), 59.0 (C-5^{Xyl II, III, IV}); 21.2-20.5 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type DEPT-135.

Fluorure de [(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3,4-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-(3,4-di-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle (12**)**



Le produit **12** est obtenu à partir du mélange d'anomères **9** (357 mg, 146 μ mol) suivant le mode opératoire d'obtention du produit **10**. Le produit **12** (299 mg, 122 μ mol) est obtenu après chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/toluène ; 2/1), avec un rendement de 84 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2462 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₁₀₁H₁₃₅O₆₇FNa

m/z = 2461,7021 ; m/z théor. = 2461,7038

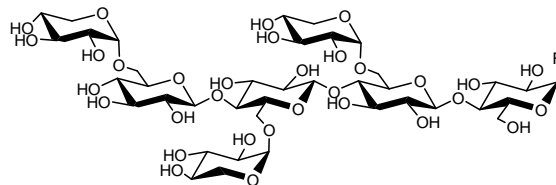
[α]_D = + 40 (c = 1.0, chloroforme)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 5.62 (dd, $J_{1,2} = 2.4$ Hz, $J_{H,F} = 53.1$ Hz ; 1H, H-1^{Glc I}) ; 5.46-5.33 (m, 6H, H-3^{Glc Ia, IV, Xyl II, III, IV}, H-4^{Gal II, III}) ; 5.25-5.09 (m, 6H, H-2^{Gal II, III}, H-3^{Glc Ib, II, III}, H-4^{Glc IV}) ; 5.05-4.90 (m, 10H, H-1^{Xyl II, III, IV}, H-2^{Glc I, III}, H-3^{Gal II, III}, H-4^{Xyl II, III, IV}) ; 4.86 (m, 1H, H-2^{Glc II}) ; 4.80-4.77 (m, 3H, H-1^{Glc IV}, H-2^{Glc IV, Xyl IV}) ; 4.71 (d, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, 1H, H-1^{Glc III}) ; 4.61-4.55 (m, 4H, H-1^{Glc II, Gal II, III}, H-6a^{Glc I}) ; 4.17-4.03 (m, 5H, H-6^{Gal II, III}, H-6b^{Glc I}) ; 3.97-3.62 (m, 21H, H-2^{Xyl II, III}, H-4^{Glc I, II, III}, H-5^{Glc I, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, H-6^{Glc II, III}, H-6a^{Glc IV}) ; 3.56 (dd, $J_{5,6b} = 3.9$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.1$ Hz, 1H, H-6b^{Glc IV}) ; 3.47 (m, 1H, H-5^{Glc II}) ; 2.15-1.95 (m, 75H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7-169.4 (CH₃CO) ; 103.0 (d, $J_{C,F} = 226.0$ Hz, C-1^{Glc I}) ; 101.5, 101.4 (C-1^{Gal II, III}) ; 100.9, 100.7, 100.6 (C-1^{Glc II, III, IV}) ; 98.9, 98.8 (C-1^{Xyl II, III}) ; 96.4 (C-1^{Xyl IV}) ; 77.4, 76.1, 75.8, 75.2, 75.0, 74.5, 74.3, 73.8, 73.2, 73.1, 72.6, 72.4, 72.1 (2C), 71.7 (2C), 71.4, 71.3, 70.9, 70.8 (2C), 70.7, 69.8, 69.4, 69.3 (2C), 69.2 (2C), 68.9, 68.3 (2C), 67.9, 67.1 (2C), 66.6, 66.4 (C-2^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-3^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-4^{Glc I, II, III, IV, Xyl II, III, IV, Gal II, III}, C-5^{Glc I, II, III, IV, Gal II, III}, C-6^{Glc II, III, IV}) ; 61.4, 61.3 (2C) (C-6^{Glc I, Gal II, III}) ; 59.4 (2C), 58.9 (C-5^{Xyl II, III, IV}) ; 21.2-20.3 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H et RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

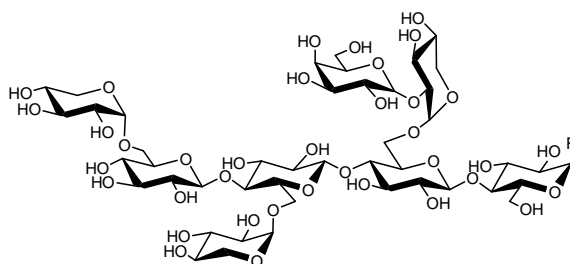
Fluorure de [α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyle (13**)**



Le produit peracétylé **10** (570 mg ; 306 μ mol) est repris dans le méthanol (45 ml). Le mélange est maintenu à 0 °C sous agitation. Après addition de méthanolate de sodium 1 M (382 μ l ; 1,2 éq.), le milieu est maintenu sous agitation une nuit. Le précipité observé est filtré et repris dans l'eau, puis lyophilisé. Le filtrat est neutralisé avec la résine Amberlite IR-120, puis évaporé et lyophilisé. Le produit **13**¹²⁸ (315 mg ; 296 μ mol) est alors obtenu avec un rendement de 97 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1087 [M+Na]^+$

Fluorure de [α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyle (14**)**



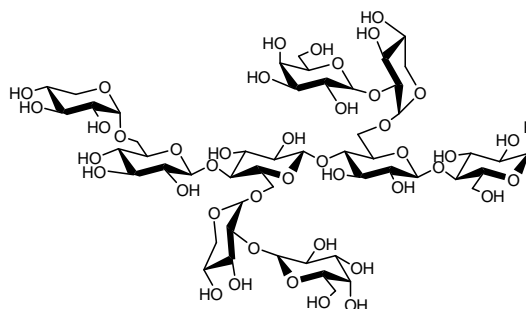
Le produit peracétylé **11** (603 mg ; 280 μ mol) est désacétylé suivant le mode opératoire utilisé pour l'obtention du produit **13**. Le produit **14** (343 mg ; 280 μ mol) est obtenu avec un rendement quantitatif.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1249 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₄₅H₇₅O₃₇FNa

m/z = 1249,3895 ; m/z_{théor.} = 1249,3869

Fluorure de [α-D-xylopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-galactopyranosyl-(1→2)-α-D-xylopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-galactopyranosyl-(1→2)-α-D-xylopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-α-D-glucopyranosyle (15)



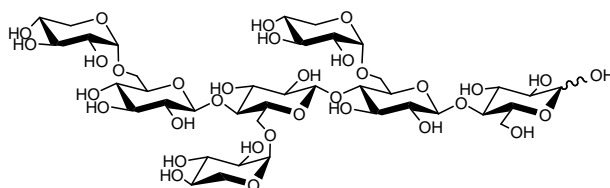
Le produit peracétylé **12** (89 mg ; 36,3 μmol) est désacétylé suivant le mode opératoire utilisé pour l'obtention du produit **13**. Le produit **15** (47 mg ; 33,6 μmol) est obtenu avec un rendement de 93 %.

Spectre de masse (MALDI) : m/z = 1412 [M+Na]⁺

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₅₁H₈₅O₄₂FNa

m/z = 1411,4430 ; m/z_{théor.} = 1411,4397

[α-D-Xylopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[α-D-xylopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[α-D-xylopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-glucopyranosyle (16) XXXG

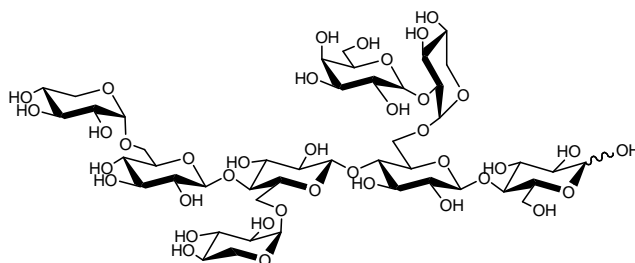


Le produit peracétylé **1** (500 mg ; 263 μmol) est désacétylé suivant le mode opératoire utilisé pour l'obtention du produit **13**. Le produit **16**¹⁶⁹ (280 mg ; 263 μmol) est obtenu avec un rendement quantitatif.

Spectre de masse (ES⁺) : $m/z = 1085 [M+\text{Na}]^+$

Spectre de masse (ES⁻) : $m/z = 1061 [M-\text{H}]^-$

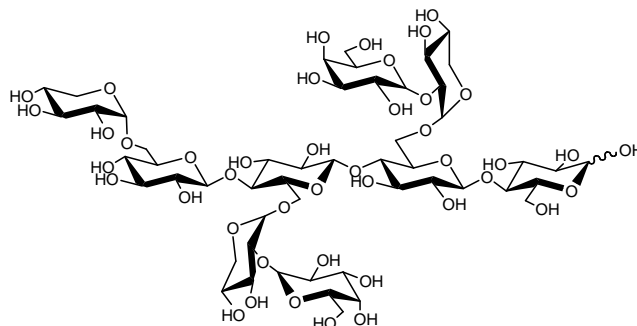
[α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucoopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucoopyranosyle (17a**) XXLG**



Le produit **2** (70 mg ; 32,0 μmol) est désacétylé suivant le mode opératoire utilisé pour l'obtention du produit **13**, après 6h d'agitation, la réaction est traitée avec de la résine Amberlite IR-120. Le produit **17a** (29 mg ; 23,7 μmol) est obtenu, après lyophilisation, avec un rendement de 74 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1247 [M+\text{Na}]^+$

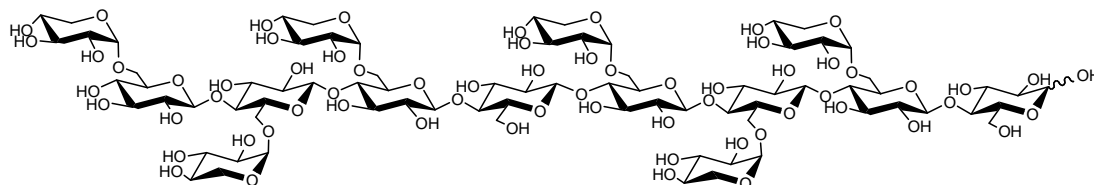
[α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranosyle (18**) XLLG**



Le produit **3** (184 mg ; 74,2 μ mol) est désacétylé suivant le mode opératoire utilisé pour l'obtention du produit **13**. Le produit **18** (98 mg ; 70,7 μ mol) est obtenu avec un rendement de 95 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1409 [M+Na]^+$

[α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose (19**) XXXGXXXG**

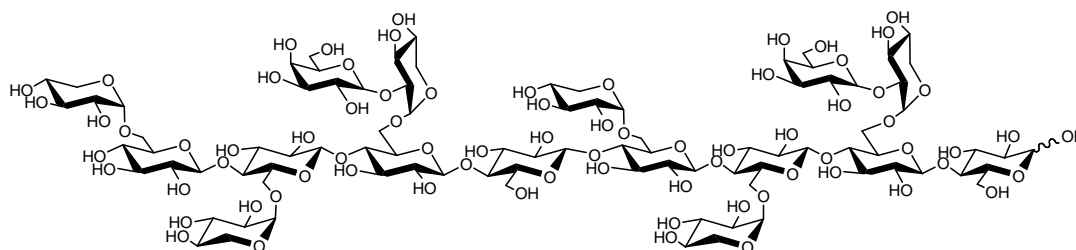


A une solution de **16** (201 mg ; 189 μ mol ; 2 eq.) dans du tampon carbonate (0,1 M ; pH = 10), est ajouté le fluorure **13** (100 mg ; 94 μ mol ; 1 eq.), puis l'enzyme mutée *HiCel7B* E197A (6 mg). Après 40 h à 37 $^{\circ}\text{C}$ sous agitation, le milieu est dilué avec un mélange acétonitrile/eau (7/3) et 2 ml de silice sont ajoutés avant d'évaporer à sec. Le mélange est alors purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétonitrile/eau ; 7/3 puis 65/35

puis 6/4 puis 5/5). Après filtration sur 0,45 μm , le produit **19**⁷² (52 mg ; 25 μmol) est obtenu avec un rendement de 27 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2129 [M+Na]^+$

[α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranosyle (20**) XXLGXXLG**



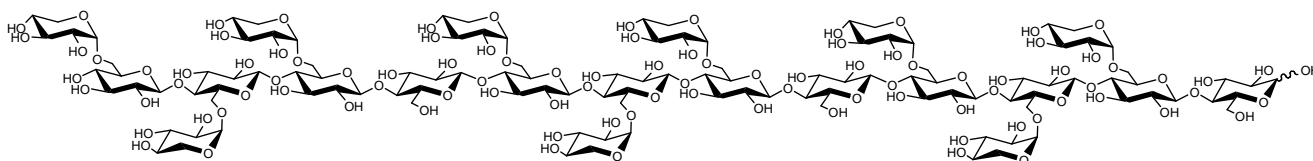
A une solution de composé **17a** (40 mg ; 32,7 μmol ; 1 eq.) et de fluorure **14** (40 mg ; 32,6 μmol ; 1 eq.) dans du tampon carbonate (0,1 M ; pH = 10 ; 1,5 ml) est ajoutée l'enzyme mutée *HiCel7B* E197A (3 mg). Après une nuit sous agitation à 37 $^{\circ}\text{C}$, de l'enzyme *Cel7B* E197A est rajoutée (3 mg) puis le milieu est à nouveau maintenu sous agitation à 37 $^{\circ}\text{C}$ pendant 48 h. Le milieu est ensuite dilué avec un mélange acétonitrile/eau (7/3 ; 3 ml) puis 1 ml de silice est ajouté avant d'évaporer à sec. Le produit est purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétonitrile/eau ; 7/3 puis 65/35 puis 6/4 puis 5/5). Après filtration sur 0,45 μm , le produit **20** (25 mg ; 10,3 μmol) est obtenu avec un rendement de 32 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2454 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES^+) : $\text{C}_{90}\text{H}_{150}\text{O}_{75}\text{Na}$

$m/z = 2453,7938$; $m/z_{\text{théor.}} = 2453,7822$

[α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranose (21)
XXXGXXXGXXXG



Le produit 21¹²⁸ (62 mg ; 19,7 μ mol) est obtenu lors de la synthèse du composé 19 avec un rendement de 21 %.

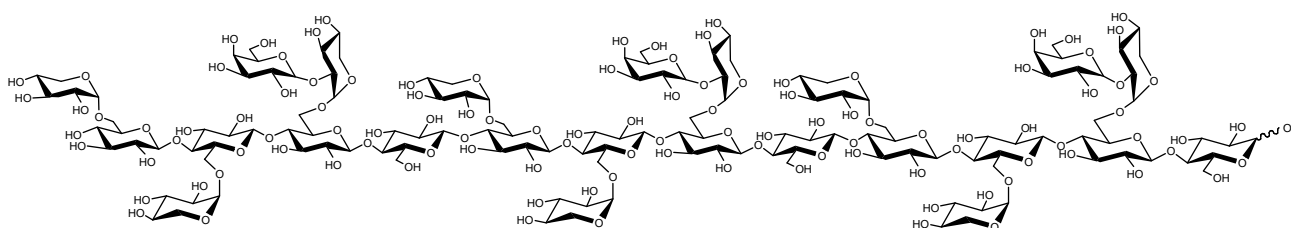
Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 3175 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₁₁₇H₁₉₄O₉₇Na

$m/z = 3174,0113$; m/z théor. = 3174,0146

[α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranosyle (22**)**

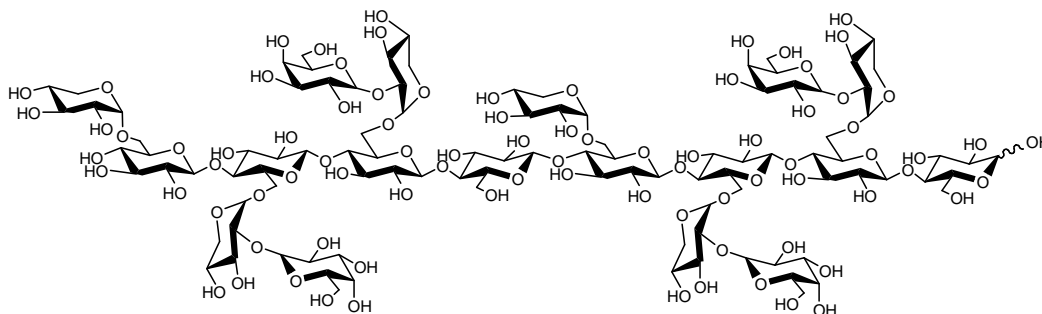
XXLGXXLGXXLG



Le produit **22** (19 mg ; 5,2 μ mol) est obtenu lors de la synthèse du composé **20** avec un rendement de 16 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 3661 [M+Na]^+$

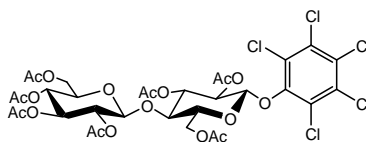
[α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranosyle (23**) XLLGXLLG**



Le produit fluoré **15** (2 mg ; 1,5 μ mol) est solubilisé dans une solution de tampon acétate 0,05 M ; pH = 5,6 (400 μ l). Puis une solution d'enzyme *PttXET16A* E85A dans le tampon acétate (1 mg.ml⁻¹) est ajoutée (20 μ l ; 0,02 mg). Le milieu réactionnel est placé à 25 °C sous agitation pendant 48 h. Le milieu est contrôlé régulièrement par CCM (acétonitrile/eau ; 7/3). Le produit **23** est obtenu en quantité très faible et ne peut être caractérisé que par spectrométrie de masse.

Spectre de masse du mélange (MALDI) : m/z = 2780 [M+Na]⁺

(2,3,4,6-Tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranoside de pentachlorophényle (24**)**



Le cellobiose peracétylé (40,0 g ; 58,9 mmol ; 1 éq) est solubilisé dans 200 ml de dichlorométhane fraîchement distillé, placé sous argon et maintenu à 0 °C. La solution à 33 % d'acide bromhydrique dans l'acide acétique (200 ml) est alors ajoutée goutte à goutte au

moyen d'une ampoule à brome, toujours sous argon. Après addition, le milieu est maintenu sous agitation à 0 °C pendant 45 min, puis 2 h à température ambiante avant d'être lavé avec de l'eau glacée (200 ml) puis avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (3 x 200 ml), séché sur sulfate de sodium anhydre, filtré et évaporé à température ambiante.

Le solide obtenu est alors repris dans l'acétone (150 ml) puis le pentachlorophénolate de sodium (41,0 g ; 90,2 mmol ; 1,5 éq) est ajouté. Le milieu est maintenu à reflux ($T_{\text{bain}} = 80$ °C) sous agitation pendant 5 h. Après retour à température ambiante, le milieu est filtré sur Celite® puis évaporé avant d'être repris dans le dichlorométhane, lavé à l'eau (3 x 400 ml), séché sur sulfate de sodium anhydre, filtré et évaporé. Après solubilisation dans l'acétate d'éthyle (150 ml), le produit est recristallisé dans l'hexane (90 ml). Le filtrat est purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 2/3) en effectuant un dépôt à sec. Le produit **24** (34,8 g ; 39,5 mmol) est obtenu avec un rendement de 67 %.

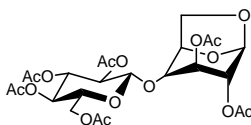
Spectre de masse (FAB) : $m/z = 907$ $[M+Na]^+$

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 907$ $[M+Na]^+$

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ (ppm) = 5.30-5.28 (m, 1H, H-2^I) ; 5.24 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-3^I) ; 5.18 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1^I) ; 5.11 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3^{II}) ; 5.04 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-4^{II}) ; 4.89 (dd, $J = 8.0$ Hz et $J = 9.3$ Hz, 1H, H-2^{II}) ; 4.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1^{II}) ; 4.40 (dd, $J = 2.3$ Hz et $J = 12.0$ Hz, 1H, H-6a^I) ; 4.34 (dd, $J = 4.4$ Hz et $J = 12.5$ Hz, 1H, H-6a^{II}) ; 4.12-4.01 (m, 2H, H-6b^{I,II}) ; 3.87 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-4^I) ; 3.64 (qd, $J = 2.0$ Hz et $J = 9.8$ Hz, 1H, H-5^{II}) ; 3.51 (qd, $J = 2.6$ Hz et $J = 9.8$ Hz, 1H, H-5^I) ; 2.07 (s, 6H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H) (CH_3CO)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) = 170.7, 170.4, 170.2, 170.0, 169.7, 169.5, 169.1 (CH_3CO) ; 149.0, 133.0 (2C), 131.6, 129.6(2C) (C_{arom}) ; 101.0 (C-1^{II}), 100.8 (C-1^I) ; 76.3 (C-4^I) ; 73.3 (C-5^I) ; 73.0 (C-3^{II}) ; 72.4 (C-3^I) ; 72.2 (C-5^{II}) ; 71.8 (C-2^I) ; 71.7 (C-2^{II}) ; 67.9 (C-4^{II}) ; 61.7 (C-6^{II}) ; 61.1 (C-6^I) ; 21.0, 20.9, 20.9, 20.8 (2C), 20.8 (2C) (CH_3CO)

Les attributions des signaux en RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

(2,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-acétyl-1,6-anhydro- β -D-glucopyranose (25)

Le produit 24 (34,6 g ; 39,1 mmol) est chauffé à reflux sous agitation dans une solution (250 ml) de soude 4 M, pendant 24 h. Après retour à température ambiante, le milieu est acidifié jusqu'à pH = 4 avec une solution d'acide sulfurique 1 M, le précipité formé est alors filtré sur Celite[®], puis le milieu est neutralisé avec une solution d'ammoniaque 1 M, avant d'être concentré aux trois quarts. Le produit est dilué dans le méthanol et le précipité formé est filtré sur Celite[®]. Cette opération est répétée jusqu'à une absence de précipité par addition de méthanol. Le milieu est alors concentré et coévaporé plusieurs fois au toluène, puis à la pyridine avant d'être repris dans un mélange pyridine/anhydride acétique (1/1 v/v ; 420 ml). Après introduction d'une quantité catalytique de DMAP, le milieu est acétylé à 35 °C, sous agitation et à l'abri de la lumière pendant une nuit. L'excès d'anhydride acétique est détruit par addition de méthanol (160 ml) à froid, puis le milieu est concentré et coévaporé plusieurs fois au toluène. Le solide ainsi obtenu est repris dans le dichlorométhane puis la solution est lavée à l'eau (300 ml) puis avec une solution saturée d'hydrogénosulfate de potassium (300 ml) puis avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium (300 ml). Les phases organiques sont alors séchées sur sulfate de sodium anhydre puis filtrées et concentrées. Le produit est recristallisé dans l'éthanol et le filtrat de recristallisation est purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 4/6 puis 4/5). Le produit 25¹⁷⁰ (12,2 g ; 21,1 mmol) est ainsi obtenu avec un rendement de 54 %.

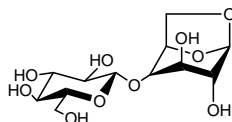
Spectre de masse (DCI) : $m/z = 594 [M+NH_4]^+$

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 5.43 (se, 1H, H-1^I) ; 5.22-5.15 (m, 2H, H-3^{I,II}) ; 5.06-4.98 (m, 2H, H-2^{II}, H-4^{II}) ; 4.84 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, H-1^{II}) ; 4.56 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-4^I) ; 4.52 (s, 1H, H-2^I) ; 4.20 (dd, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, 1H, H-6a^{II}) ; 4.07 (dd, $J_{5,6b} = 2.4$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, 1H, H-6b^{II}) ; 3.94 (d, $J = 7.2$, 1H, H-6a^I) ; 3.80-3.75 (m, 2H, H-5^{II}, H-6b^I) ; 3.51 (s, 1H, H-5^I) ; 2.09, 2.08 (2s, 6H, CH₃CO^I) ; 2.08, 2.02, 1.99, 1.97 (4s, 12H, CH₃CO^{II})

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) = 170.9, 170.5, 170.2, 169.7, 169.6, 169.3 (CH_3CO) ; 100.9, 99.3 (C-1 $^{\text{I}}$ $^{\text{II}}$) ; 77.4 (C-5 $^{\text{I}}$) ; 74.0 (C-4 $^{\text{I}}$) ; 73.2 (C-3 $^{\text{II}}$) ; 72.4 (C-5 $^{\text{II}}$) ; 71.6 (C-2 $^{\text{II}}$) ; 69.2 (C-3 $^{\text{I}}$) ; 68.7 (C-2 $^{\text{I}}$) ; 68.3 (C-4 $^{\text{II}}$) ; 65.2 (C-6 $^{\text{I}}$) ; 62.2 (C-6 $^{\text{II}}$) ; 21.2, 21.0, 20.8 (3C), 20.8 (CH_3CO)

Les attributions des signaux en RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro- β -D-glucopyranose (26**)**



L'anhydro-cellobiose acétylé **25** (12,2 g ; 21,1 mmol) est désacétylé en solution dans le méthanol (150 ml), l'addition de méthanolate de sodium 1 M (2 ml ; 2 mmol) s'effectue à 0 °C, puis le milieu est maintenu sous agitation pendant 5 h à température ambiante. Après neutralisation avec de la résine Amberlite IR-120, filtration et évaporation, le solide est séché sur pentoxyde de phosphore sous vide. L'anhydro-cellobiose **26** (6,72 g ; 20,7 mmol) est ainsi obtenu avec un rendement de 98 %.

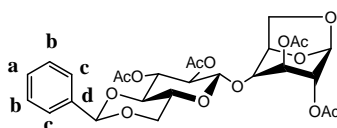
Spectre de masse (ES^+) : $m/z = 347$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ (ppm) = 5.37 (se, 1H, H-1 $^{\text{I}}$) ; 4.69 (m, 1H, H-5 $^{\text{I}}$) ; 4.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1 $^{\text{II}}$) ; 4.01 (dd, $J_{5,6a} = 0.9$ Hz et $J_{6a,6b} = 7.8$ Hz, 1H, H-6a $^{\text{I}}$) ; 3.84 (dd, $J_{5,6a} = 2.2$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, 1H, H-6a $^{\text{II}}$) ; 3.78 (m, 1H, H-3 $^{\text{I}}$) ; 3.75 (se, 1H, H-4 $^{\text{I}}$) ; 3.70 (dd, $J_{5,6a} = 5.9$ Hz et $J_{6a,6b} = 7.8$ Hz, 1H, H-6b $^{\text{I}}$) ; 3.64 (dd, $J_{5,6a} = 5.9$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, 1H, H-6b $^{\text{II}}$) ; 3.47 (se, 1H, H-2 $^{\text{I}}$) ; 3.42 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3 $^{\text{II}}$) ; 3.37 (m, 1H, H-5 $^{\text{II}}$) ; 3.31 (m, 1H, H-4 $^{\text{II}}$) ; 3.26 (dd, $J = 7.9$ Hz et $J = 9.3$ Hz, 1H, H-2 $^{\text{II}}$)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) = 102.0 (C-1 $^{\text{II}}$) ; 102.0 (C-1 $^{\text{I}}$) ; 78.2 (C-4 $^{\text{I}}$) ; 76.7 (C-5 $^{\text{II}}$) ; 76.1 (C-3 $^{\text{II}}$) ; 74.6 (C-5 $^{\text{I}}$) ; 73.6 (C-2 $^{\text{II}}$) ; 72.0 (C-3 $^{\text{I}}$) ; 70.4 (C-2 $^{\text{I}}$) ; 70.3 (C-4 $^{\text{II}}$) ; 65.7 (C-6 $^{\text{I}}$) ; 61.4 (C-6 $^{\text{II}}$)

Les attributions des signaux en RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

(2,3-Di-*O*-acétyl-4,6-*O*-benzylidène- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-acétyl-1,6-anhydro- β -D-glucopyranose (27)



L'anhydro-cellobiose 26 (6,72 g ; 20,7 mmol ; 1 éq) est introduit dans un ballon sous argon contenant le chlorure de zinc (5,8 g ; 42,6 mmol ; 2 éq) préalablement séché sous vide à la flamme. Puis addition du benzaldéhyde (200 ml ; 1,97 mol) fraîchement distillé. Le milieu est maintenu sous argon, sous agitation à température ambiante pendant 20 h puis versé dans une ampoule à décanter contenant de l'eau glacée et de l'hexane. La phase aqueuse est lavée à l'hexane (3 x 100 ml) et la phase organique est extraite à l'eau (2 x 100 ml). Le mélange des phases aqueuses est ensuite rapidement neutralisé avec une solution d'ammoniaque, puis lyophilisé.

Le mélange lyophilisé est ensuite acétylé avec un mélange anhydride acétique/pyridine (1/2 v/v ; 270 ml) en présence d'une quantité catalytique de DMAP, ajoutée à 0 °C, sous agitation pendant une nuit à température ambiante à l'abri de la lumière. Le milieu est ensuite précipité dans une grande quantité d'eau glacée puis filtré sur Celite[®] et repris dans le dichlorométhane, séché sur sulfate de sodium anhydre, filtré et évaporé. Le produit 27¹³⁵ (6,5 g ; 11,2 mmol) est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 1/1) avec un rendement de 54 %.

Spectre de masse (ES⁺) : m/z = 603 [M+Na]⁺

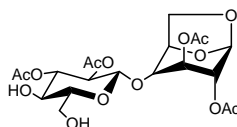
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 7.52-7.33 (m, 5H, H_{arom}) ; 5.48 (s, 1H, PhCH) ; 5.43 (se, 1H, H-1^I) ; 5.31 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-3^{II}) ; 5.07 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-3^I) ; 5.06 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2^{II}) ; 4.88 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1^{II}) ; 4.58 (m, 1H, H-5^I) ; 4.51 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H-2^I) ; 4.36-4.31 (m, 1H, H-5^{II}) ; 3.97 (dd, $J_{5,6} = 0.7$ Hz et $J_{6a,6b} = 7.6$ Hz, 1H, H-6a

¹¹); 3.80 (dd, $J_{5,6} = 5.8$ Hz et $J_{6a,6b} = 7.6$ Hz, 1H, H-6b¹¹); 3.73-3.65 (m, 2H, H-4¹¹, H-6a¹); 3.60-3.56 (m, 2H, H-4¹, H-6b¹); 2.12, 2.10, 2.05, 2.03 (m, 12H, COCH₃)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) : δ (ppm) = 170.5, 170.2, 169.6, 169.5 (COCH₃); 134.7, 129.5 (2C), 129.4, 128.5 (2C) (C_{arom}); 101.8 (PhCH); 100.5 (C-1¹¹); 99.4 (C-1¹); 78.3 (C-4¹¹); 76.0 (C-4¹); 73.4 (C-5¹); 72.4 (C-3¹ ou C-2¹¹); 72.0 (C-3¹¹); 69.7 (C-2¹¹ ou C-3¹); 68.9 (C-2¹); 68.6 (C-5¹¹); 66.8 (C-6¹); 65.1 (C-6¹¹); 21.2, 21.1, 21.0, 20.8 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H et RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

(2,3-Di-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-O-acétyl-1,6-anhydro- β -D-glucopyranose (28)



Le produit 27 (6,5 g ; 11,2 mmol ; 1 éq) est dilué dans l'acétonitrile (190 ml) avant d'ajouter d'acide tétrafluoroborique (HBF₄/H₂O ; 35 % v/v ; 3,5 ml). Après 15 min d'agitation à température ambiante, le milieu est neutralisé avec la triéthylamine (3,6 ml) puis concentré. Le produit 28 (5,5 g ; 11,1 mmol) est obtenu après chromatographie rapide sur gel de silice avec un rendement de 99 %.

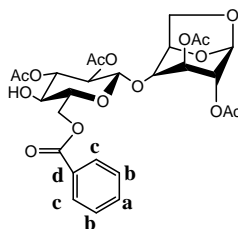
Spectre de masse (DCI) : $m/z = 594$ [M+NH₄]⁺

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ (ppm) = 5.42 (se, 1H, H-1¹); 5.15 (se, 1H, H-3¹); 5.01 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-3¹¹); 4.91 (dd, $J = 7.8$ Hz et $J = 9.6$ Hz, 1H, H-2¹¹); 4.74 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1¹¹); 4.53 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-4¹ ou H-5¹); 4.46 (se, 1H, H-2¹); 3.94 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-6a¹); 3.89 (dd, $J_{5,6} = 2.6$ Hz et $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, 1H, H-6a¹¹); 3.77 (dd, $J_{5,6} = 5.9$ Hz et $J_{6a,6b} = 7.5$ Hz, 1H, H-6b¹); 3.74 (dd, $J_{5,6} = 5.8$ Hz et $J_{6a,6b} = 7.5$ Hz, 1H, H-6b¹¹); 3.63 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-4¹¹); 3.50 (se, 1H, H-5¹ ou H-4¹); 3.47 (m, 1H, H-5¹¹); 2.66 (se, OH); 2.12, 2.09, 2.06, 2.02 (m, 12H, COCH₃)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) = 171.7, 170.7, 170.1, 169.6 (COCH_3) ; 100.8 (C-1^{II}) ; 99.1 (C-1^{I}) ; 76.7 (C-5^{II}) ; 76.2 (C-5^{I} ou C-4^{I}) ; 76.1 (C-3^{II}) ; 73.9 (C-4^{I} ou C-5^{I}) ; 71.7 (C-2^{II}) ; 69.7 (C-3^{I}) ; 69.5 (C-4^{II}) ; 69.0 (C-2^{I}) ; 65.1 (C-6^{I}) ; 62.4 (C-6^{II}) ; 21.2, 21.1, 21.0, 20.9 (CH_3CO)

Les attributions des signaux en RMN ^1H et RMN ^{13}C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

(2,3-Di-*O*-acétyl-6-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-acétyl-1,6-anhydro- β -D-glucopyranose (29)



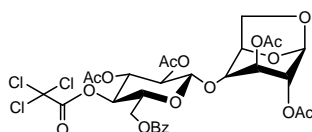
Le diol 28 (5,5 g ; 11,1 mmol ; 1 éq.) est solubilisé dans le dichlorométhane (90 ml) avant addition du 1-(benzoyloxy)-benzotriazole (2,81 g ; 11,8 mmol ; 1,05 éq.) et de la triéthylamine (1,9 ml ; 13,6 mmol ; 1,2 éq.). Après 20 h sous agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué dans le dichlorométhane, puis lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (1 x 200 ml), séché sur sulfate de sodium anhydre, filtré et concentré, puis purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1/1 puis 3/2). Le produit 29 (4,36 g ; 7,3 mmol) est alors obtenu avec un rendement de 65 %.

Spectre de masse (DCI) : $m/z = 614$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) : δ (ppm) = 8.01-7.98 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom, c}}$) ; 7.55 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{arom, a}}$) ; 7.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom, b}}$) ; 5.39 (s, 1H) ; 5.15 (s, 1H) ; 5.05 (t, $J = 8.5$, 1H) ; 4.95 (t, $J = 8.5$, 1H) ; 4.85 (d, $J = 3.9$, 1H) ; 4.69 (dd, $J = 4,4$ Hz et $J = 12,0$ Hz, 1H) ; 4.55-4.48 (m, 3H) ; 3.89 (d, $J = 7.8$, 1H) ; 3.75-3.70 (m, 1H) ; 3.63 (dd, $J = 4.5$ Hz et $J = 9.5$ Hz, 1H) ; 3.51 (s, 1H) ; 3.12 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H) ; 2.06-1.98 (m, 12H, CH_3CO)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ (ppm) = 171.4, 170.1, 169.6, 169.4 (CH_3CO) ; 167.1 (PhCO) ; 133.6 ($\text{C}_{\text{arom. a}}$) ; 129.9 (2C, $\text{C}_{\text{arom. c}}$) ; 129.6 ($\text{C}_{\text{arom. d}}$) ; 128.6 (2C, $\text{C}_{\text{arom. b}}$) ; 100.7, 99.1 (C-1^{I} $^{\text{II}}$) ; 76.9, 75.7, 74.8, 73.9, 71.5, 69.6, 69.0, 68.9, ($\text{C-2}^{\text{I, II}}$, $\text{C-3}^{\text{I, II}}$, $\text{C-4}^{\text{I, II}}$, $\text{C-5}^{\text{I, II}}$) ; 65.1, 63.5 ($\text{C-6}^{\text{I, II}}$) ; 20.9-20.8 (CH_3CO)

(2,3-Di-*O*-acétyl-6-*O*-benzoyl-4-*O*-trichloroacétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-*O*-acétyl-1,6-anhydro- β -D-glucopyranose (30)



Le produit **29** (2,88 g ; 4,83 mmol ; 1 éq.) est solubilisé dans le dichlorométhane (40 ml) et placé à 0 °C sous agitation, avant d'ajouter le chlorure de trichloroacétyle (1,2 ml ; 10,8 mmol ; 2,2 éq.) ainsi que la triéthylamine (1,5 ml ; 10,8 mmol ; 2,2 éq.). Le milieu est maintenu 15 min à 0 °C, puis 30 min à température ambiante. Il est ensuite dilué dans 40 ml de dichlorométhane puis lavé avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium, séché sur sulfate de sodium anhydre, filtré et concentré. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 1/1), le produit **30**¹¹² est obtenu avec un rendement de 89 % (3,19 g ; 4,31 mmol).

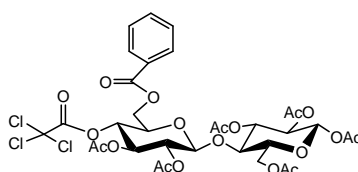
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ (ppm) = 8.02-7.99 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom. c}}$) ; 7.58-7.53 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom. a}}$) ; 7.45-7.41 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom. b}}$) ; 5.41 (se, 1H, H-1^{I}) ; 5.40 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-3^{II}) ; 5.27 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-4^{II}) ; 5.19 (se, 1H, H-3^{I}) ; 5.06 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-2^{II}) ; 4.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-1^{II}) ; 4.57 (dd, $J_{5, 6a} = 2.0$ Hz et $J_{6a, 6b} = 12.5$ Hz, 1H, H-6a^{II}) ; 4.56 (m, 1H, H-5^{I}) ; 4.50 (se, 1H, H-2^{I}) ; 4.37 (dd, $J_{5, 6a} = 5.0$ Hz et $J_{6a, 6b} = 12.5$ Hz, 1H, H-6b^{II}) ; 4.13-4.10 (m, 1H, H-5^{II}) ; 3.88 (dd, $J_{5, 6a} = 0.8$ Hz et $J_{6a, 6b} = 7.7$ Hz, 1H, H-6a^{I}) ; 3.74 (dd, $J_{5, 6a} = 5.8$ Hz et $J_{6a, 6b} = 7.7$ Hz, 1H, H-6b^{I}) ; 3.51 (se, 1H, H-4^{I}) ; 2.02 (s, 6H), 1.99 (s, 3H), 1.96 (s, 3H) (COCH_3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ (ppm) = 170.1, 170.0, 169.9, 169.3 (COCH_3) ; 166.0 (PhCO) ; 161.0 (Cl_3CCO) ; 133.6 ($\text{C}_{\text{arom. a}}$) ; 129.9 (2C, $\text{C}_{\text{arom. c}}$) ; 129.6 ($\text{C}_{\text{arom. d}}$) ; 128.7 (2C, $\text{C}_{\text{arom. b}}$) ; 101.2 (C-1^{II}) ; 99.1 (C-1^{I}) ; 77.8 (C-4^{I}) ; 74.0 (C-5^{I}) ; 72.7 (C-4^{II}) ; 72.4 (C-3^{II}) ;

71.9 (C-5^{II}) ; 71.8 (C-2^{II}) ; 69.5 (C-3^I) ; 68.7 (C-2^I) ; 65.2 (C-6^I) ; 62.3 (C-6^{II}) ; 21.0, 20.9, 20.8, 20.7 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H et RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

(2,3-Di-*O*-acétyl-6-*O*-benzoyl-4-*O*-trichloroacétyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-1,2,3,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranose (31)



Dans une solution d'anhydro-cellobiose 30 (3,6 g ; 4,86 mmol ; 1 éq.) dans l'anhydride acétique (81 ml), le triflate de triéthylsilyle (140 μl ; 0,62 mmol ; 0,1 éq.) est ajouté à 0 °C sous agitation. L'agitation ainsi que la température de 0 °C sont maintenues pendant 30 min, avant de verser le milieu réactionnel dans une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (250 ml) et le maintenir 1 h sous agitation à température ambiante. Le milieu est ensuite extrait au dichlorométhane (200 ml), puis lavé à l'eau (2 x 200 ml). La phase aqueuse ayant alors un pH = 1, la phase organique est à nouveau lavée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (1 x 200 ml) puis à nouveau à l'eau, avant d'être séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée.

Le mélange d'anomères ainsi obtenu est solubilisé dans le dichlorométhane puis placé à 0 °C et l'acide bromhydrique à 33 % dans l'acide acétique (17 ml) est ajouté goutte à goutte au moyen d'une ampoule à brome. Après 1 h à 0 °C et 30 min à température ambiante, le milieu est dilué dans le dichlorométhane, lavé à l'eau (1 x 100 ml), puis avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (3 x 100 ml). Une fois séché sur sulfate de sodium, le produit est filtré et évaporé. Le mélange est ensuite acétylé dans un mélange anhydride acétique/pyridine (1/1 v/v ; 60 ml) en présence d'acétate d'argent (1,52 g ; 9,1 mmol ; 2 éq.), sous agitation pendant une nuit à température ambiante. La solution est filtrée sur Celite[®], puis diluée dans le dichlorométhane, lavée à l'eau glacée puis avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium glacée. La phase organique est alors séchée sur sulfate de

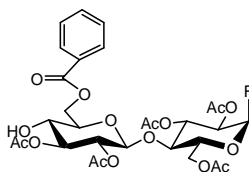
sodium anhydre, filtrée et concentrée. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 2/5), le produit **31**¹¹² (1,96 g ; 2,3 mmol) est obtenu avec un rendement de 47 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 865 [M+Na]^+$

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) = 8.03 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{arom. c}) ; 7.59 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{arom. a}) ; 7.48 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_{arom. b}) ; 5.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H) ; 5.36-5.17 (m, 3H) ; 5.02-4.94 (m, 2H) ; 4.61-4.57 (m, 2H) ; 4.49 (dd, $J = 1.5$ Hz et $J = 12.0$ Hz, 1H) ; 4.38 (dd, $J = 4.2$ Hz et $J = 12.6$ Hz, 1H) ; 4.09 (dd, $J = 4.6$ Hz et $J = 12.0$ Hz, 1H) ; 3.93 (m, 1H) ; 3.80 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H) ; 3.72 (m, 1H) ; 2.14-1.88 (m, 18H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) : δ (ppm) = 170.4, 169.9, 169.8, 169.5, 169.2, 168.9 (CH₃CO) ; 166.0 (PhCO) ; 160.8 (Cl₃CCO) ; 133.8 (C_{arom. a}) ; 129.9 (2C, C_{arom. c}) ; 129.3 (C_{arom. d}) ; 128.8 (2C, C_{arom. b}) ; 101.0, 91.8 (C-1^{I,II}) ; 76.3, 73.7, 72.5 (2C), 72.3, 71.9, 71.6, 70.5 (C-2^{I,II}, C-3^{I,II}, C-4^{I,II}, C-5^{I,II}) ; 62.1, 61.6 (C-6^{I,II}) ; 20.9-20.6 (CH₃CO)

Fluorure de (2,3-di-O-acétyl-6-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acétyl- α -D-glucopyranosyle (32**)**



Le composé solide **31** (1,60 g ; 1,90 mmol) est placé à 0 °C dans un récipient en plastique sous agitation. Suite à l'addition d'un mélange HF/pyridine (7/3, v/v ; 9 ml) le milieu est maintenu 2 h sous agitation à 0 °C. La solution est diluée dans le dichlorométhane, neutralisée dans une solution d'ammoniaque (3 M) maintenue à 0 °C, puis extraite au dichlorométhane, lavée avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium (3 x 100 ml). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée. Le mélange est ensuite purifié par chromatographie rapide sur gel de silice préalablement

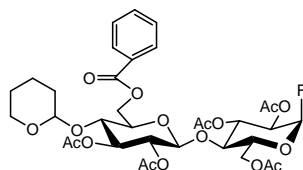
conditionné avec de la triéthylamine (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 1/2). Le produit **32**¹¹² (1,14 g ; 1,73 mmol) est alors obtenu avec un rendement de 91 %.

Spectre de masse (DCI) : $m/z = 676 [M+NH_4]^+$

RMN ¹H (CDCl₃ ; 300 MHz) : δ (ppm) = 8.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{arom. c}) ; 7.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_{arom. a}) ; 7.23 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{arom. b}) ; 5.62 (dd, $J_{1,2} = 2.4$ Hz et $J_{H,F} = 53.1$ Hz, 1H, H-1^I) ; 5.43 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H) ; 4.99 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H) ; 4.89-4.83 (m, 1H) ; 4.79 (dd, $J = 3.0$ Hz et $J = 10.2$ Hz, 1H) ; 4.72 (dd, $J = 3.6$ Hz et $J = 12.1$ Hz, 1H) ; 4.55-4.50 (m, 3H) ; 4.16-4.03 (m, 3H) ; 3.80 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H) ; à 3.67-3.56 (m, 1H) ; 3.15 (se, OH) ; 2.08, 2.05, 2.02, 2.01, 1.97 (5s, 15H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃ ; 75 MHz) : δ (ppm) = 171.5, 170.4, 170.3, 169.7, 169.3 (CH₃CO) ; 167.3 (PhCO) ; 133.9 (C_{arom. a}) ; 130.0 (2C, C_{arom. c}) ; 129.4 (C_{arom. d}) ; 128.7 (2C, C_{arom. b}) ; 103.9 (d, $J_{C,F} = 229.0$ Hz, C-1^I) ; 101.1 (C-1^{II}) ; 75.8, 74.8, 71.7, 71.0, 71.0, 70.8, 70.5, 69.1, 68.8 (C-2^{I,II}, C-3^{I,II}, C-4^{I,II}, C-5^{I,II}) ; 63.3, 61.4 (C-6^{I,II})

Fluorure de (2,3-di-O-acétyl-6-O-benzoyl-4-O-tétrahydropyranyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acétyl- α -D-glucopyranosyle (33**)**

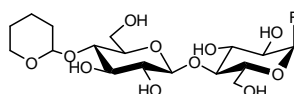


A une solution de fluorure de cellobiose **32** (1,14 g ; 1,73 mmol ; 1 équ.) dans le dichlorométhane (10 ml) sont ajoutés le dihydropyrane fraîchement distillé (690 μ l ; 7,56 mmol ; 4 équ.) et l'acide camphosulfonique (29 mg ; 1,25 mmol ; 0,07 équ.). Le milieu réactionnel est maintenu 1 h sous agitation à température ambiante puis il est dilué dans le dichlorométhane et versé dans une ampoule à décanter contenant de l'eau glacée. Après extraction au dichlorométhane, le milieu est lavé avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et concentrée. Le mélange est purifié par chromatographie rapide sur

gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 2/3), puis recristallisé dans l'éthanol absolu. Le produit **33**¹¹² (1,22 g ; 1,65 mmol) est obtenu avec un rendement de 95 %.

Spectre de masse (DCI) : $m/z = 760 [M+NH_4]^+$

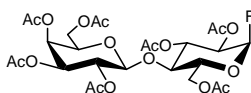
Fluorure de (4-*O*-tétrahydropyranyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-α-D-glucopyranosyle (34)



Le fluorure de cellobiose **33** (201 mg ; 271 μmol ; 1 éq.) est solubilisé dans le méthanol (18 ml) et placé à 0 °C, sous agitation, avant addition d'une solution de méthanolate de sodium (1 M ; 270 μl ; 270 μmol ; 1 éq.). Le milieu est maintenu 8 h à 0 °C puis une nuit à température ambiante. La solution est alors neutralisée avec de la résine Amberlite IR-120 puis filtrée et concentrée. Après addition de 15 ml d'eau glacée, le milieu est lavé à l'éther (2 x 30 ml) puis la phase aqueuse est lyophilisée. Le produit **34**¹¹² (116 mg ; 271 μmol) est alors obtenu avec un rendement quantitatif.

Spectre de masse (ES⁺) : $m/z = 451 [M+Na]^+$

Fluorure de (2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl-α-D-glucopyranosyle (35)



Le lactose peracétylé (3,0 g ; 4,42 mmol) est introduit solide dans un flacon en plastique, puis placé sous agitation à 0 °C. Le mélange HF/pyridine (7/3 v/v ; 12 ml) est alors ajouté et la température est maintenue pendant 2 h à 0 °C sous agitation. Le milieu est alors dilué au dichlorométhane puis versé dans une solution glacée d'ammoniaque (3 M). Après extraction au dichlorométhane, la phase organique est lavée avec une solution saturée

d'hydrogénocarbonate de sodium (3 x 150 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée.

Le mélange est ensuite repris dans le DMF (20 ml) et porté à 50 °C avant l'addition d'acétate d'hydrazine (30 mg ; 0,33 mmol). La température et l'agitation sont maintenues pendant 20 min, puis le milieu est dilué à l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution saturée de chlorure de sodium (2 x 40 ml) puis à l'eau (1 x 40 ml). La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et concentrée puis coévaporée plusieurs fois au toluène avant que le mélange soit purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole ; 1/1) préalablement conditionnée avec de la triéthylamine. Le fluorure **35**¹³⁴ (2,03 g ; 3,18 mmol) est alors obtenu avec un rendement de 72 %.

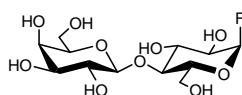
Spectre de masse (DCI) : $m/z = 656 [M+NH_4]^+$

RMN ¹H (CDCl₃ ; 300 MHz) : δ (ppm) = 5.64 (dd, $J_{1,2} = 2.8$ Hz et $J_{H,F} = 53.0$ Hz, 1H, H-1^{Glc}) ; 5.46 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-3^{Glc}) ; 5.33 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-4^{Gal}) ; 5.09 (dd, $J = 7.9$ Hz et $J = 10.4$ Hz, 1H, H-2^{Gal}) ; 4.93 (dd, $J = 3.4$ Hz et $J = 10.4$ Hz, 1H, H-3^{Gal}) ; 4.86 (ddd, $J = 2.8$ Hz, $J = 10.2$ Hz et $J = 24.2$ Hz, 1H, H-2^{Glc}) ; 4.53-4.48 (m, 1H, H-6a^{Glc}) ; 4.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1^{Gal}) ; 4.15-4.03 (m, 4H, H-5^{Glc}, H-6b^{Glc}, H-6^{Gal}) ; 3.86 (m, 1H, H-5^{Gal}) ; 3.83 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-4^{Glc}) ; 2.13, 2.11, 2.07, 2.04 (6H), 2.02, 1.94 (6s, 21H, CH₃CO)

RMN ¹³C (CDCl₃ ; 75 MHz) : δ (ppm) = 170.6, 170.5, 170.4 (2C), 170.3, 169.6, 169.1 (CH₃CO) ; 103.9 (d, $J_{C,F} = 228.0$ Hz, C-1^{Glc}) ; 101.0 (C-1^{Gal}) ; 75.3 (C-4^{Glc}) ; 71.2 (C-5^{Gal}) ; 71.0 (C-5^{Glc}) ; 70.9 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, C-3^{Glc}) ; 70.6 (d, $J = 24.4$ Hz, C-2^{Glc}) ; 69.3 (C-2^{Gal}) ; 69.2 (C-3^{Glc}) ; 66.8 (C-4^{Gal}) ; 61.5 (C-6^{Glc}) ; 61.1 (C-6^{Gal}) ; 21.03, 21.00, 20.85, 20.83 (2C), 20.78, 20.7 (CH₃CO)

Les attributions des signaux en RMN ¹H et RMN ¹³C ont été effectuées grâce à des analyses de type COSY et HMQC.

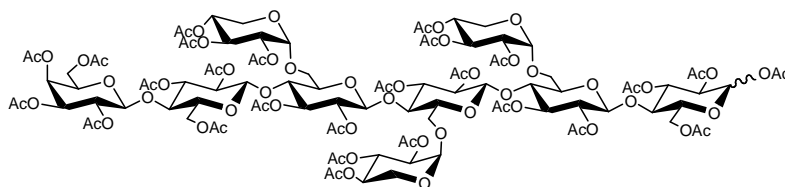
Fluorure de β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyle (**36**)



Le fluorure **35** (454 mg ; 712 μmol) est solubilisé dans le méthanol (45 ml), puis placé à 0 °C avant addition d'une solution de méthanolate de sodium (1 M ; 300 μl ; 300 μmol ; 2,4 équ.). Le milieu est maintenu 5 h sous agitation à 0 °C. Le précipité observé est filtré puis lyophilisé. Le filtrat est neutralisé avec de la résine Amberlite IR 120 puis filtré, évaporé et lyophilisé. Le fluorure libre **36** (229 mg ; 664 μmol) est ainsi obtenu avec un rendement de 93 %.

Spectre de masse (ESI) : $m/z = 367 [M+Na]^+$

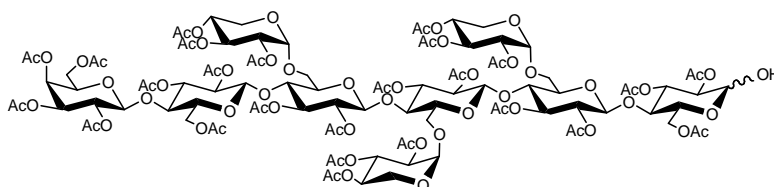
(2,3,4,6-Tétra-O-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2,3,6-tri-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-O-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-O-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-O-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-O-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tétra-O-acétyl- α,β -D-glucopyranose (37**)**



A une solution de fluorure **36** (98 mg ; 285 μmol ; 1,2 équ.), dans une solution tampon carbonate/bicarbonate (0,1 M ; pH = 10 ; 5 ml) est ajouté l'heptasaccharide **16** (252 mg ; 237 μmol ; 1 équ.) ainsi que l'enzyme mutée *HiCel7B E197A* (1,6 mg). Le milieu réactionnel est placé à 37 °C sous agitation pendant une nuit, puis traité avec une résine mixte et lyophilisé. Le mélange est ensuite acétylé par un mélange pyridine/anhydride acétique (2/1 ; v/v ; 30 ml) en présence de DMAP en quantité catalytique, pendant une nuit, sous agitation, à température ambiante, à l'abri de la lumière, puis 2 h à 50 °C. L'anhydride acétique en excès est alors estérifié par addition de méthanol (6 ml) à froid puis le milieu est concentré et coévaporé plusieurs fois au toluène. Le résidu est alors repris dans le dichlorométhane puis filtré. Le filtrat est ensuite purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 1/3). Le composé **37** (317 mg ; 128 μmol) est alors obtenu avec un rendement de 54 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2503 [M+Na]^+$

(2,3,4,6-Tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2,3,6-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl-D-glucopyranose (**38**)



Mode opératoire A

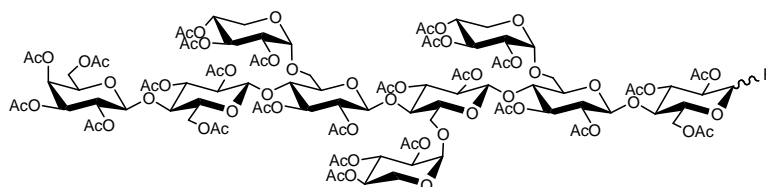
Le produit peracétylé **37** (63 mg ; 25,4 μ mol ; 1,0 éq.) est solubilisé dans le DMF (1 ml) et placé sous agitation à 50 °C et l'acétate d'hydrazine (5 mg ; 54,3 μ mol ; 2,1 éq.) est ajouté. Le milieu est maintenu à 50 °C sous agitation pendant 25 min puis dilué dans l'acétate d'éthyle. Après lavage avec une solution saturée de chlorure de sodium puis à l'eau, séchage sur sulfate de sodium anhydre, concentration et purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 1/3 puis 2/3), le produit **38**¹²⁸ (31 mg ; 12,7 μ mol) est obtenu avec un rendement de 50 %.

Mode opératoire B

Le produit peracétylé **37** (11 mg ; 4,4 μ mol) est solubilisé à chaud dans le 2-méthyl-2-butanol (1 ml) puis le milieu est placé à 50 °C sous agitation avant addition de la lipase (20 mg). L'agitation et la température sont maintenues pendant 70 h. Puis addition de 80 mg de lipase supplémentaire et maintien de la température à 70 °C pendant 36 h. Le milieu réactionnel est ensuite filtré puis lavé au dichlorométhane et concentré. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 1/3 puis 1/2) le produit **38** (9mg ; 3,7 μ mol) est obtenu avec un rendement de 84 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1925 [M+Na]^+$

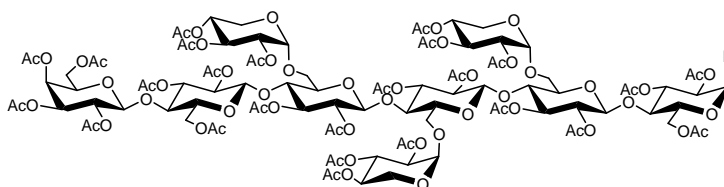
Fluorure de (2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2,3,6-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α,β -D-glucopyranosyle (**39**)



Le composé **38** (32 mg ; 13,1 μ mol ; 1,0 éq.) est solubilisé dans le dichlorométhane (2 ml) et placé à -30 °C. Le DAST (20 μ l ; 151 μ mol ; 11,5 éq.) est ensuite ajouté puis le refroidissement arrêté et l'agitation maintenue pendant une nuit. Quelques gouttes de méthanol sont ensuite ajoutées pour détruire l'excès de DAST avant que le produit soit concentré. Il est ensuite purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 1/3). Le produit **39**¹²⁸ (30 mg ; 12,3 μ mol) est alors obtenu avec un rendement de 94 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2463 [M+Na]^+$

Fluorure de (2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2,3,6-tri-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-(2,3-di-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyle (**40**)

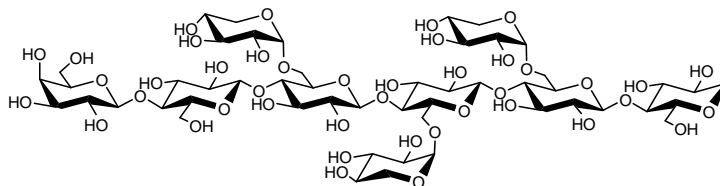


Le mélange d'anomères **39** (73 mg ; 29,9 μ mol) est introduit dans un récipient en plastique et placé à -50 °C sous agitation. Une solution HF/pyridine (7/3 ; v/v ; 1,5 ml) est

alors versée dans le milieu. Celui-ci est maintenu 15 min à $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis ramené à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 2 h 30. Il est ensuite dilué avec du dichlorométhane avant d'être neutralisé par une solution d'ammoniaque 3 N glacée. Le milieu résultant est ensuite extrait au dichlorométhane puis lavé avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée (3 x 50 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Après deux chromatographies rapides sur gel de silice préalablement conditionnée avec de la triéthylamine (acétone/toluène ; 1/3 et acétone/toluène ; 1/5 puis 1/4) l'anomère **40**¹²⁸ (33 mg ; 13,3 μmol) est obtenu avec un rendement de 45 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2461 [M+\text{Na}]^+$

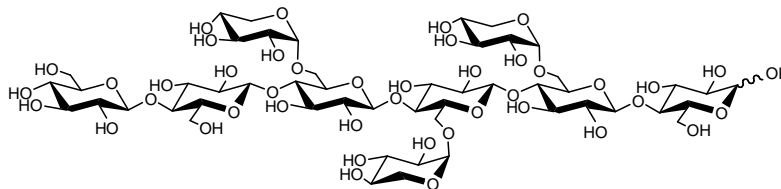
Fluorure de β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyle (41**)**



Le produit peracétylé **40** (65 mg ; 26,6 μmol ; 1 éq.) est solubilisé dans du méthanol (8 ml) et placé à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un bain de glace. Après addition de méthanolate de sodium 1 M (26 μl ; 26 μmol ; 1 éq.), le milieu est maintenu à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 12 h. Le précipité formé est filtré puis repris dans l'eau et lyophilisé alors que le filtrat est neutralisé avec de la résine Amberlite IR120 puis filtré, évaporé et repris dans l'eau avant d'être lyophilisé à son tour. Le produit libre **41** est obtenu avec un rendement quantitatif.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1411 [M+\text{Na}]^+$

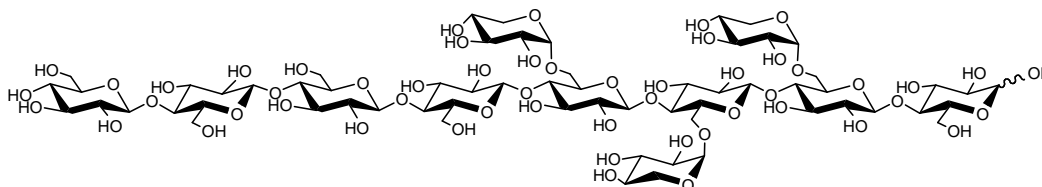
β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranosyle (42**) GGXXXG**



L'heptasaccharide **16** (40 mg ; 37,7 μ mol ; 1 eq.) est solubilisé dans une solution tampon carbonate/bicarbonate (0,1 M ; pH = 10 ; 1,2 ml) puis le fluorure **34** (21 mg ; 49 μ mol ; 1,3 eq.) est ajouté ainsi que de l'enzyme mutée *HiCel7B* E197A (1,6 mg). Le milieu est ensuite placé à 37 °C et maintenu à cette température sous agitation pendant une nuit. La réaction n'étant pas terminée, du fluorure **34** (4 mg ; 9,3 μ mol ; 0,2 eq.) est ajouté ainsi que de l'enzyme (1 mg). Le milieu est à nouveau maintenu à 37 °C sous agitation pendant 8 h. Après quoi il est dilué dans 4 ml d'eau. Le groupement tétrahydropyranyle est alors hydrolysé *in situ* par addition de quelques gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique (1 M), en maintenant pendant 10 min le milieu à pH = 1 puis en neutralisant avec de la triéthylamine. La déprotection n'étant pas totale, le processus d'hydrolyse est répété une deuxième puis une troisième fois. Le mélange est ensuite évaporé plusieurs fois en présence d'eau puis lyophilisé. Il est ensuite repris dans l'eau et évaporé à sec en présence de silice et le résidu obtenu est déposé sur une colonne de gel de silice. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétonitrile/eau ; 8/2 puis 7/3) le nonasaccharide **42**¹²⁸ (39 mg ; 28,1 μ mol) est obtenu avec un rendement de 75 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1409$ $[M+Na]^+$

β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranosyle (43**) GGGGXXXG**



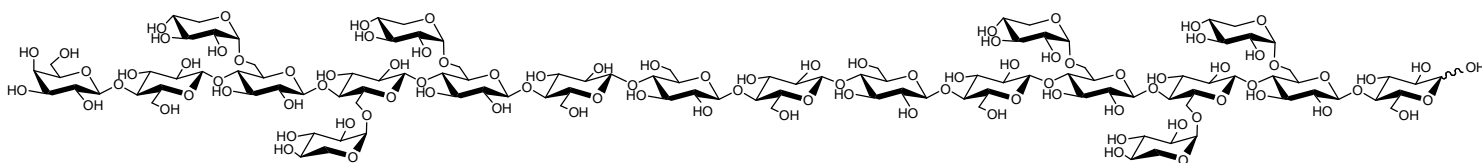
L'undécasaccharide **43** est obtenu à partir du nonasaccharide **42** (45 mg ; 32,4 μ mol ; 1 éq.) et du fluorure **34** (18 mg ; 42,1 μ mol ; 1,3 éq.) selon la méthode d'obtention du composé **42** utilisant l'enzyme mutée *HiCel7B E197A* (4 mg). Le composé **43**¹²⁸ (39 mg ; 22,8 μ mol) est obtenu, après purification par chromatographie rapide sur gel de silice (acétonitrile/eau ; 8/2 puis 7/3), avec un rendement de 70 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1734 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : C₆₃H₁₀₆O₅₃FNa

$m/z = 1733,5525$; $m/z_{\text{théor.}} = 1733,5497$

β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranosyle (44**) LacXXXGGGGGXXXG**



Le fluorure **41** (21 mg ; 15,1 μmol ; 1,3 éq.) ainsi que l'undécasaccharide **43** (20 mg ; 11,7 μmol ; 1 éq.) sont solubilisés dans une solution tampon carbonate/bicarbonate (0,1 M ; 3 ml) puis après addition de l'enzyme mutée *HiCel7B E197A* (6 mg), le milieu est placé sous agitation à 37 °C pendant une nuit. Le milieu est ensuite dessalé avec de la résine mixte puis filtré. Le produit est reprecipité plusieurs fois au méthanol, purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétonitrile/eau ; 7/3) et filtré sur filtre PVDF 0,45 μm . Le produit **44** (26 mg ; 8,4 μmol) est ainsi obtenu avec un rendement de 72 %.

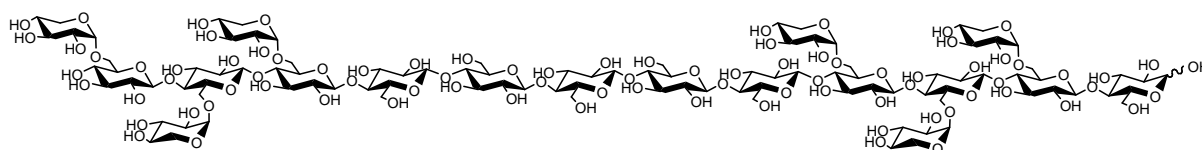
Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 3102 [M+Na]^+$

Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : $C_{114}H_{190}O_{95}Na$

$m/z = 3101,9858$; $m/z_{\text{théor.}} = 3101,9934$

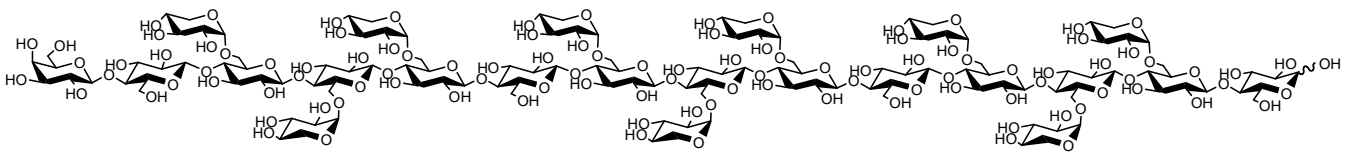
[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranosyle (45**)**

XXXGGGGGXXXG



Le composé **44** (1,5 mg ; 0,5 μmol) en solution dans l'eau (100 μl) est soumis à l'action de la lactase de *Kluyveromyces fragilius* (50 μl). Après 2 h d'incubation à 37 °C sous agitation et dénaturation de l'enzyme par addition de quelques gouttes de méthanol, le milieu est analysé en CCM et en spectrométrie de masse. La CCM ne montre pas la présence de lactose et l'analyse par spectrométrie de masse confirme que celui-ci n'a pas été hydrolysé.

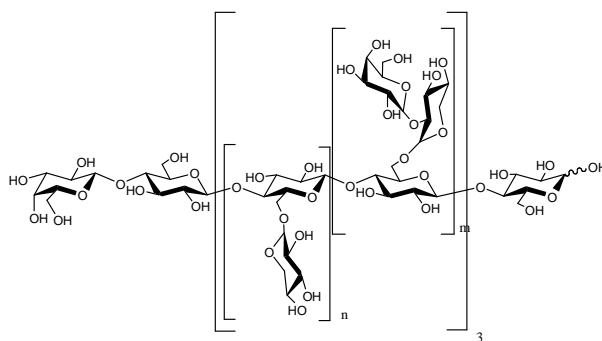
β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose (**46**) LacXXXGXXXGXXXG



Le composé **21** (35 mg ; 11 μ mol) est solubilisé dans le tampon carbonate (0,1 M ; pH = 9,7 ; 3 ml). Puis après addition du fluorure **36** (9 mg ; 26 μ mol, 2éq.) et de l'enzyme *HiCel7B E197A* (2 mg), le milieu est maintenu 24 h à 37 °C sous agitation. Le couplage n'étant pas terminé, de l'enzyme est à nouveau ajoutée (1 mg) et le milieu est à nouveau maintenu 24 h à 37 °C sous agitation. Il est ensuite dilué dans un mélange acétonitrile/eau ; 7/3 (5ml) puis évaporé à sec en présence de silice. Après purification par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice (acétonitrile/eau ; 7/3) et filtration sur filtre PVDF (0,45 μ m) le produit **46** (28 mg ; 8 μ mol) est obtenu avec un rendement de 71 %

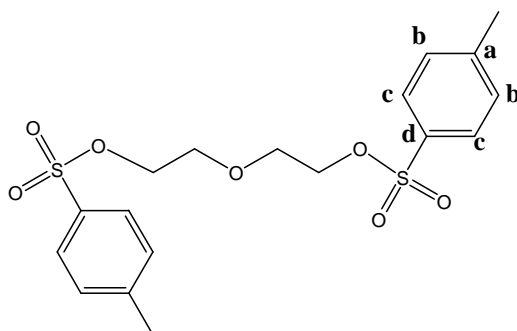
Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 3498 [M+Na]^+$

Lac[XGO]₃ (**47**)



Le produit **47** est obtenu à partir du mélange [XGO]₃ (40 mg ; 10 μmol ; 1 éq.) et du fluorure **36** (16 mg ; 50 μmol ; 5 éq.) selon la méthode d'obtention du composé **46** en utilisant l'enzyme mutée *HiCel7B E197A* (3 mg). Le composé **47** (21 mg ; 5 μmol) est obtenu, après purification par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice (acétonitrile/eau ; 8/2 puis 7/3), et filtration sur filtre PVDF (0,45 μm) avec un rendement de 48 %.

1,5-Di-(tosyloxy)-3-oxapentane [Ts(OCH₂CH₂)₂OTs] (**48**)



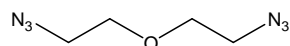
Le di(éthylène glycol) commercial (1 g ; 6,94 mmol) est solubilisé dans le dichlorométhane (50 ml). Puis le chlorure de tosyle (10 g ; 52,6 mmol ; 8 éq.) ainsi que la triéthylamine (6 ml ; 44,3 mmol ; 6 éq.) sont ajoutés à température ambiante. Le mélange réactionnel est maintenu 15 h sous agitation à température ambiante puis 24 h à 30 °C. Après dilution dans le dichlorométhane (100 ml), le milieu est lavé avec de l'eau, une solution d'acide chlorhydrique 1 N (2 x 200 ml), une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (200 ml) et enfin à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. Du dichlorométhane (5 ml) est ajouté puis le milieu est placé dans un bain de glace avant d'être reprecipité à l'éther diéthylique (50 ml). Le précipité est filtré sur büchner puis séché. Le produit **48**¹⁴⁰ (2,87 g ; 6.94 mmol) est obtenu avec un rendement quantitatif.

Spectre de masse (ES⁺) : m/z = 437 [M+Na]⁺

RMN ¹H (CDCl₃ ; 400 MHz) : δ (ppm) = 7.73 (td, J = 1.8 Hz et J = 8.5 Hz, 4H, H_{arom. c}) ; 7.33 (td, J = 2.3 Hz et J = 8.5 Hz, 4H, H_{arom. b}) ; 4.07 (m, 4H, TsOCH₂CH₂O) ; 3.59 (m, 4H, TsOCH₂CH₂O) ; 2.43 (s, 6H, CH₃Ph)

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 100 MHz) : δ (ppm) = 145.6 (2C, $\text{C}_{\text{arom. a}}$) ; 133.4 (2C, $\text{C}_{\text{arom. d}}$) ; 130.4 (4C, $\text{C}_{\text{arom. b}}$) ; 128.5 (4C, $\text{C}_{\text{arom. c}}$) ; 69.2 (2C, $\text{TsOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 68.9 (2C, $\text{TsOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 21.5 (2C, CH_3Ph)

1,5-Diazido-3-oxapentane [$\text{N}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}_3$] (49)

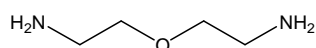


Le ditosylate 48 (1,5 g ; 3,6 mmol) est solubilisé dans le DMF avant addition de l'azoture de sodium (1,4 g ; 21,5 mmol ; 6 éq.). Le milieu est placé sous agitation à 60 °C. Après 24 h, il présente une coloration jaune/orangé et un fort précipité. Le DMF est alors évaporé puis coévaporé plusieurs fois au toluène. Le milieu est alors repris dans le dichlorométhane et les sels présents sont filtrés sur büchner. Le filtrat est concentré et le mélange est purifié par chromatographie rapide (acétone/toluène ; 0/1 puis 1/5). Le produit 49¹⁴¹ (380 mg ; 2,4 mmol) est ainsi obtenu avec un rendement de 67 %.

RMN ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) : δ (ppm) = 3.65 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H, CH_2O) ; 3.38 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz) : δ (ppm) = 70.0 (2C, CH_2O) ; 50.6 (2C, N_3CH_2)

1,5-Diamino-3-oxapentane [$\text{NH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$] (50)



Le produit 49 (28 mg ; 179 μmol) est solubilisé dans un mélange eau/pyridine ; 1/1 (5 ml) et placé sous argon. Après barbotage de H_2S pendant 30 min, le milieu est maintenu sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite neutralisé à l'acide acétique 2 N, puis concentré et coévaporé à l'eau, avant d'être lyophilisé. Le produit 50 (17 mg ; 163 μmol) est obtenu avec un rendement de 91 %.

Spectre de masse (ES⁺) : $m/z = 105 [M+H]^+$

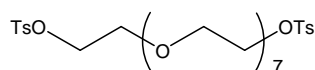
Spectre de masse haute résolution (ES⁺) : $C_4H_{13}N_2O$

$m/z = 105,1035$; $m/z_{\text{théor.}} = 105,1028$

RMN ¹H (D₂O ; 300 MHz) : δ (ppm) = 3.77 (t, $J = 6$ Hz, 4H, CH₂O) ; 3.15 (t, $J = 6$ Hz, 4H, NH₂CH₂)

RMN ¹³C (D₂O ; 75 MHz) : δ (ppm) = 65.9 (2C, CH₂O) ; 37.1 (2C, N₃CH₂)

1,23-Di-(tosyloxy)-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosane [Ts(OCH₂CH₂)₈OTs] (51)



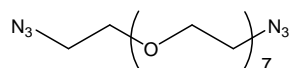
L'octa(éthylène glycol) commercial (409 mg ; 1,10 mmol ; 1 éq.) est solubilisé dans du dichlorométhane (10 ml). Après addition de chlorure de tosyle, préalablement recristallisé dans le cyclohexane, (1,06 g ; 5,58 mmol ; 5 éq.) et de triéthylamine (0,8 ml ; 5,8 mmol ; 5 éq.) le milieu est maintenu une nuit sous agitation à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite dilué dans le dichlorométhane puis lavé à l'eau (50 ml), avec une solution d'acide chlorhydrique 1 N (2 x 50 ml), avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (50 ml) puis à l'eau (50 ml). Après séchage sur sulfate de sodium et filtration, les phases organiques sont rassemblées et concentrées puis purifiées par chromatographie rapide sur gel de silice (AcOEt/EP ; 2/1 puis 5/1). Le produit 51¹³⁹ (351 mg ; 0,52 mmol) est alors isolé avec un rendement de 47 %.

Spectre de masse (ES⁺) : $m/z = 701 [M+Na]^+$

RMN ¹H (CDCl₃ ; 400 MHz) : δ (ppm) = 7.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, H_{arom. c}) ; 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, H_{arom. b}) ; 4.09 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, TsOCH₂) ; 3.62 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H, TsOCH₂CH₂) ; 3.57-3.52 (m, 24H, OCH₂CH₂O), 2.39 (s, 6H, CH₃Ph)

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 100 MHz) : δ (ppm) = 144.3 (2C, $\text{C}_{\text{arom. a}}$) ; 132.5 (2C, $\text{C}_{\text{arom. d}}$) ; 129.3 (4C, $\text{C}_{\text{arom. b}}$), 127.5 (4C, $\text{C}_{\text{arom. c}}$) ; 71.2 (2C), 71.1(2C), 71.0 (6C), 70.9 (2C) ($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$) ; 69.8 (2C, $\text{TsOCH}_2\text{CH}_2$) ; 69.2 (2C, TsOCH_2) ; 21.8 ($\text{CH}_3\text{-Ph}$)

1,23-Diazido-3,6,9,12,15,18,21-heptaotricosane [$\text{N}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_8\text{N}_3$] (52)



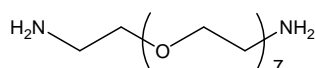
Le produit 51 (355 mg ; 0,52 mmol ; 1 éq.) est solubilisé dans le DMF (7 ml) à 60 °C. Après addition d'azoture de sodium, le milieu est maintenu à 60 °C sous agitation pendant une nuit. Le DMF est ensuite évaporé sous pompe à palettes et le milieu est coévaporé au toluène. Le milieu est ensuite repris dans le dichlorométhane est lavé à l'eau (2 x 60 ml) puis séché sur sulfate de sodium, filtré et concentré. Le mélange est purifié par chromatographie rapide sur gel de silice (acétone/toluène ; 1/2). Le produit 52 (137 mg ; 0,33 mmol) est obtenu avec un rendement de 63 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 443$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

RMN ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) : δ (ppm) = 3.61 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 3.59 (t, $J = 3$ Hz, 24H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 3.32 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, N_3CH_2)

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz) : δ (ppm) = 70.8 (4C), 70.7 (6C) ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 70.1 (2C, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$) ; 53.6 (2C, $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 50.8 (2C, N_3CH_2)

1,23-Diamino-3,6,9,12,15,18,21-heptaotricosane [$\text{NH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$] (53)



Le produit **52** (72 mg ; 171 μmol) est réduit selon le mode opératoire décrit pour l'obtention du produit **50**. La diamine **53** (50 mg ; 136 μmol) est ainsi obtenue avec un rendement de 80 %.

Spectre de masse (ES^+) : $m/z = 369$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

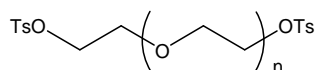
Spectre de masse haute résolution (ES^+) : $\text{C}_{16}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_7$

$m/z = 369,2610$; $m/z_{\text{théor.}} = 369,2601$

RMN ^1H (D_2O ; 300 MHz) : δ (ppm) = 3.78 (m, 24H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 3.73 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 3.07 (t, $J = 5.1$, 4H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 1.97 (s, 4H, NH_2)

RMN ^{13}C (D_2O ; 100 MHz) : δ (ppm) = 70.7 (2C), 70.6 (8C) ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ; 70.5 (2C, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$) ; 69.8 (2C, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 40.3 (2C, NH_2CH_2)

α - ω -Ditosyloxy-poly(éthylène glycol) [$\text{Ts}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OTs}$] (54**)**



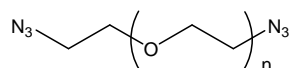
Le composé **54** est obtenu à partir du poly(éthylène glycol) commercial de masse molaire moyenne environ $2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (10 g ; 5,2 mmol ; 1 éq.) selon la méthode de tosylation décrite pour la synthèse du composé **48**. Après lavages, séchage et concentration, le produit obtenu est une huile jaune. Du dichlorométhane (20 ml) est ajouté, puis le milieu est placé dans un bain de glace avant d'être reprecipité à l'éther diéthylique (250 ml). Le précipité est filtré sur Büchner puis séché. Le filtrat est évaporé et reprecipité à nouveau. Le produit **54** (10,2 g ; 4,6 mmol) est ainsi obtenu avec un rendement de 88 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 2241$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (valeur médiane du massif)

RMN ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz) : δ (ppm) = 7.75 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, $\text{H}_{\text{arom. c}}$) ; 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H, $\text{H}_{\text{arom. b}}$) ; 4.11 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H, TsOCH_2) ; 3.64 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, $\text{TsOCH}_2\text{CH}_2$) ; 3.62-3.56 (m, 192H, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$) ; 2.41 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Ph}$)

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 100 MHz) : δ (ppm) = 144.9 (2C, $\text{C}_{\text{arom. a}}$) ; 133.2 (2C, $\text{C}_{\text{arom. d}}$) ; 129.9 (4C, $\text{C}_{\text{arom. b}}$), 128.1 (4C, $\text{C}_{\text{arom. c}}$) ; 70.9-70.4 ($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$) ; 69.4 (2C, $\text{TsOCH}_2\text{CH}_2$) ; 68.8 (2C, TsOCH_2) ; 21.8 ($\text{CH}_3\text{-Ph}$)

α,ω -Diazido-poly(éthylène glycol) [$\text{N}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{N}_3$] (55**)**



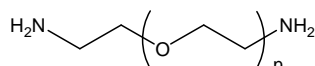
La synthèse du produit **55** est réalisée à partir du composé **54** (9,1 g ; 4,09 mmol ; 1 éq.) en suivant le mode opératoire décrit pour l'obtention du produit **49**. Après élimination des sels par filtration sur büchner. Le filtrat est concentré et l'huile jaune obtenue est déposée sur une colonne de gel de silice. Après purification par chromatographie rapide sur gel de silice, (dichlorométhane/méthanol ; 96/4 puis 95/5 puis 90/10), le produit **55** est obtenu avec un rendement de 78 %. Il est alors reprecipité dans l'éther diéthylique. Le produit **55** (5,6 g ; 2,84 mmol) est finalement obtenu avec un rendement de 69 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1983$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (valeur médiane du massif)

RMN ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz) : δ (ppm) = 3.65-3.57 (m, 192H, OCH_2) ; 3.35 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H, N_3CH_2)

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 100 MHz) : δ (ppm) = 70.8-70.7 (OCH_2) ; 70.2 ($\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 50.8 (N_3CH_2)

α,ω -Diamino-poly(éthylène glycol) [$\text{NH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$] (56**)**



Le produit **55** (268 mg ; 0,14 mmol) est solubilisé dans l'éthanol (12 ml) à 40 °C. Puis addition du catalyseur Pd/C 10 % (70 mg). Après mise sous argon du système, le milieu est

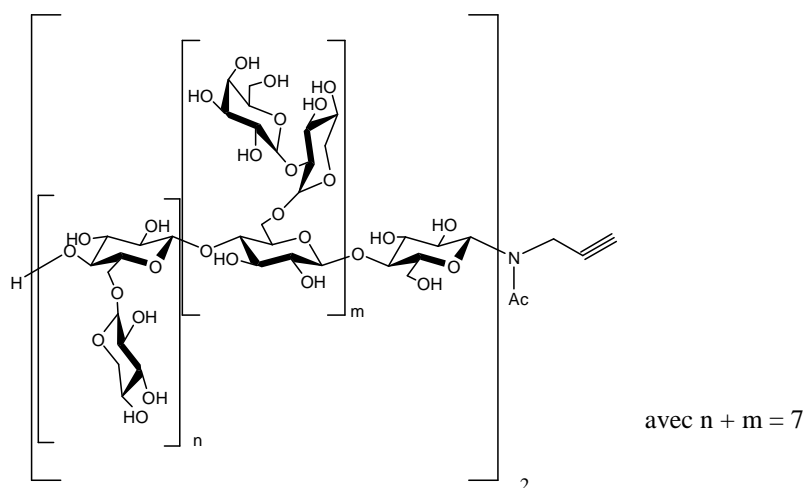
placé sous atmosphère d'hydrogène (H_2) pendant 24 h à température ambiante. Le milieu est filtré sur Celite[®] et rincé à l'éthanol à chaud, concentré et coévaporé à l'eau avant d'être lyophilisé. Le produit **56** (233 mg ; 0,12 mmol) est alors obtenu avec un rendement de 86 %.

Spectre de masse (MALDI) : $m/z = 1785 [M+Na]^+$ (valeur médiane du massif)

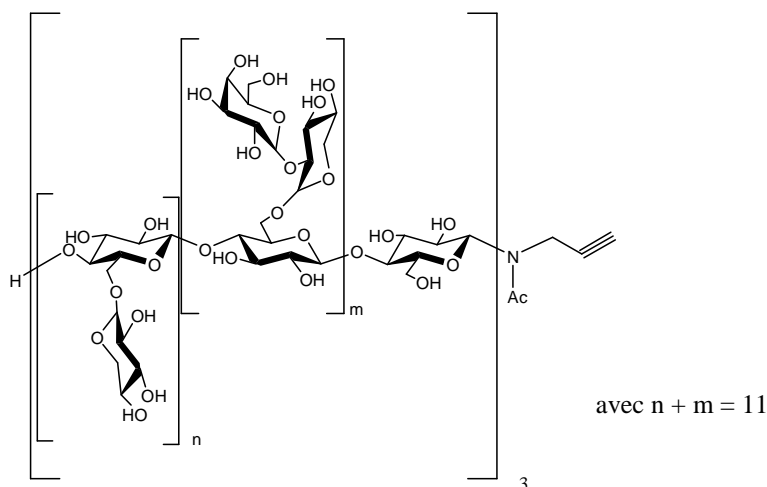
RMN 1H ($CDCl_3$; 400 MHz) : δ (ppm) = 3.63-3.54 (m, 196H, CH_2O) ; 2.78 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H, NH_2CH_2) ; 1.82 (se, NH_2)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$; 100 MHz) : δ (ppm) = 70.8-70.5 (OCH_2) ; 49.4 (NH_2CH_2)

N-Acétyl-N-propargyl-oligoxyglucosyle amine $[XGO]_2NAcPr$ (**57**)



Au mélange $[XGO]_2$ (10 mg ; 3,8 μ mol) obtenu précédemment (§ 2.3.4) est ajoutée la propargylamine (0,5 ml ; 7,8 mmol) puis le milieu est maintenu sous agitation à 40 °C pendant 48 h. Après dilution dans un mélange MeOH/dichlorométhane (1/2 v/v ; 1ml) qui entraîne la précipitation, le milieu est centrifugé plusieurs fois. L'amine est ensuite acétylée par un mélange $Ac_2O/MeOH$ (1/1 v/v ; 1 ml) à température ambiante pendant 3 j. Après précipitation au dichlorométhane et centrifugation, le milieu est lyophilisé. Le mélange **47** (6 mg ; 2,0 μ mol) est ainsi obtenu avec un rendement de 54 %.

N-Acétyl-N-propargyl-oligoxyloglucosyle amine [XGO]₃NAcPr (58)


Le mélange 58 est obtenu à partir du mélange [XGO]₃ (10 mg ; 2,5 μmol) dont l'obtention a été décrite précédemment (§ 2.3.4) par la méthode décrite pour l'obtention du mélange 57. Ainsi le mélange 58 (5 mg ; 1,3 μmol) est obtenu avec un rendement de 53 %.

Structure hybride [XGO]₂(CH₂CH₂O)₂[XGO]₂ (59) et [XGO]₃(CH₂CH₂O)₂[XGO]₃ (60)

Deux solutions sont préparées dans un mélange *t*-butanol/eau ; 1/1 : une solution S₁ de diazide 49 (1 mg.ml⁻¹) et une solution S₂ d'ascorbate de sodium (2 mg.ml⁻¹). Une solution S₃ de sulfate de cuivre dans l'eau (0,3 mg.ml⁻¹) est également préparée. Les mélanges 57 (6 mg ; 2 μmol) et 58 (5 mg ; 1,3 μmol) sont ensuite respectivement solubilisés dans 440 μl (1 μmol) et dispersés dans 280 μl (0,7 μmol) de solution S₁. Puis après addition de la solution S₂ respectivement 160 μl (1,6 μmol) et 104 μl (1,0 μmol) et S₃ respectivement 86 μl (0,2 μmol) et 58 μl (0,1 μmol) les deux milieux réactionnels sont incubés à température ambiante sous agitation pendant 24 h. Puis après un nouvel addition de la solution S₂ respectivement 160 μl et 104 μl et S₃ respectivement 86 μl et 58 μl les deux milieux réactionnels sont incubés à nouveau 24 h à température ambiante et sous agitation. Les mélanges réactionnels ne sont pas purifiés en raison des trop faibles quantités de produit disponibles

Spectre de masse (MALDI) : milieu A : $m/z = 2666$ [M+Na]⁺ (composé 57) et $m/z = 5490$ [M+Na]⁺ (composé 59) ; milieu B : $m/z = 4079$ [M+Na]⁺ (composé 58)

5. Etude des interactions

5.1. Détermination des isothermes d'adsorption

Les isothermes d'adsorption sont déterminées grâce aux calculs des quantités de XG adsorbés sur la cellulose en fonction de la concentration en XG dans le surnageant après adsorption.

La BMCC humide (10-20 % w/w), préalablement dialysée pour ôter toute trace d'azote de sodium et conditionnée dans de l'eau contenant du thimerosal (0,02 % w/w), est introduite dans un eppendorf (environ exactement 20 mg). Parallèlement, plusieurs solutions de XGs ou XGOs de concentrations variables (5-2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sont préparées à partir d'une solution mère dans de l'eau contenant du thimerosal (0,02 % w/w). Dans chaque eppendorf sont introduites les solutions de XGOs ou XGs (1,5 ml). La BMCC est ensuite mise en suspension par agitation au vortex en ajoutant au milieu trois billes de verre facilitant la dispersion. Les mélanges sont ensuite placés sur une roue agitante et incubés à 4, 25, 40, 60 ou 70 °C pendant 15 h. Les échantillons sont ensuite centrifugés (15 min, $20\cdot 10^3\text{g}$), puis 1 ml de surnageant est prélevé en prenant garde à éviter d'entraîner la cellulose auquel cas les solutions sont filtrées sur filtres PVDF 0,45 μm .

Les différentes solutions de substrat xyloglucosidiques (solutions initiales et surnageants) sont ensuite dosées par la méthode des oses totaux.¹⁷¹ Les solutions initiales sont diluées de façon à ne pas excéder 200 $\mu\text{g}_{\text{XGs}}\cdot\text{ml}^{-1}$ et les surnageants correspondants ont dilués de manière identique. Puis les solutions sont dosées par un analyseur automatique procédant à l'hydrolyse totale par une solution à l'orcinol sulfurique (700 ml H₂O ; 1,4 l H₂SO₄ ; 2,3 g orcinol) puis détection de la quantité d'oses par un photomètre à 420 nm. La quantité de substrat adsorbé est déterminée par différence entre la quantité présente dans le surnageant (substrat non adsorbé) et la quantité dans la solution initiale. Un blanc est réalisé pour évaluer la quantité de sucre relarguée par la cellulose en incubant la cellulose dans de l'eau contenant du thimerosal (0,02 % w/w) sans substrat xyloglucosidique. Deux ou quatre mesures sont réalisées pour un point donné, en fonction des quantités de substrat disponibles, la moyenne ainsi que les barres erreur peuvent ensuite être calculées.

5.2. Titration calorimétrique isotherme (ITC)

Les titrations calorimétriques isothermes sont réalisées à 25 °C sur un appareil VP-ITC de Microcal (Northampton, MA, USA). La suspension de whiskers de cellulose (1,4 ml) de concentration variable (12 à 53 mg.ml⁻¹) est introduite dans la cellule de mesure. Puis de faibles quantités successives de solutions de XGOs (typiquement 10 µl) de concentrations variables (2-75 mg.ml⁻¹ dans l'eau) sont injectées dans la cellule au moyen d'une seringue rotative. La solution est agitée dans la cellule par la rotation de cette seringue à 300 rpm. Le volume de chaque injection est de 10 µl et l'intervalle entre deux injections est de 300 à 720 s, afin de permettre une bonne rééquilibration du système. La première injection est très souvent faussée, en conséquence elle est, le plus souvent, fixée à 5 µl et le point correspondant est retiré de la courbe enthalpique. La chaleur de dilution peut être soustraite à la chaleur globale. Les variations enthalpiques sont alors calculées par rapport à la quantité de XGOs injectée dans la cellule ITC.

5.3. Biosynthèse des composites XGs-cellulose bactérienne

Les différents milieux de culture sontensemencés à partir d'une aliquote de pré-culture de *Gluconacetobater xylinus* en milieu Hestrin & Schramm prélevée dès l'apparition de la cellulose. Dans le cas des milieux minimum, la souche doit être préalablement séparée du milieu de préculture qui est un milieu H & S.

Les cultures sont réalisées en présence de 5 % de XG_{REC} enrichi ou pas en ¹³C ou de XG_{T700}. Les composites sont récupérés après 5 à 7 jours d'incubation à 20 °C en milieu H & S et après 3 jours d'incubation en milieux minimums appauvris ou enrichis en ¹³C

Les composites ainsi obtenus sont purifiés par broyage en milieu humide, plasmolyse et lyse des glycoprotéines, comme dans le cas de la cellulose bactérienne (§ 2.2.2), le traitement à la soude n'est pas effectué sur les composites pour éviter la désorption de XGOs ou XGs. Après centrifugation et dialyse, les composites sont conservés en présence d'azote de sodium.

5.4. Résonance magnétique nucléaire du solide

Les expériences de RMN du solide du ^{13}C sont réalisées sur un spectromètre Bruker DMX-400 opérant à la fréquence du carbone de 100,62 MHz et équipé d'une sonde CP/MAS, 4 mm. La vitesse de rotation à l'angle magique (Magic Angle Spinning) est fixée à 7.10^3 Hz et les expériences sont réalisées à 20 °C. Les spectres des composites XGs-CB sont réalisés en milieu humide pour une meilleure résolution et calibrés après mesure de déviation du champ sur le spectre de l'Adamantane ($\delta = 38,55$ ppm). Deux types d'expérience RMN ^{13}C sont réalisés :

- *CP/MAS* : cette expérience permet grâce à l'inclinaison de l'échantillon ($\theta = 54,7^\circ$) d'éliminer les interactions dipolaires et quadripolaires ainsi que l'anisotropie du déplacement chimique, et grâce à la polarisation croisée, de transférer la polarisation importante de ^1H au ^{13}C faiblement polarisé et de diminuer ainsi les temps d'acquisition.

- *$T_{1\rho}$ /MAS* : toujours sous rotation à l'angle magique, il s'agit ici d'analyser les temps de relaxation des différents carbones et d'en déduire une éventuelle différence de mobilité. En effet, plus le carbone considéré est mobile et plus sa relaxation sera rapide donc plus le temps de relaxation correspondant sera faible. Inversement si le carbone est très peu mobile, son temps de relaxation sera important.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse a eu pour but la compréhension des interactions à l'échelle moléculaire de deux des différents constituants de la paroi végétale, les xyloglucanes (XGs) et la cellulose. Ces études sur l'influence de la structure des XGs dans l'architecture de la paroi pourraient permettre de rationaliser *in planta* des modifications afin d'améliorer la biotransformation de la biomasse végétale. L'article, dont un extrait est présenté ci-dessous, paru dans le magazine européen de la recherche, illustre quelques uns des domaines d'application.

Le pari végétal de la biomasse

L'extraction des huiles des plantes oléagineuses laisse, ..., de côté une bonne part de la biomasse constituée de polymères protéiques et glucidiques, qu'il deviendrait rentable de valoriser. Cette logique intégrée, visant à tirer parti de la totalité des substances des plantes, est poussée à l'extrême dans le concept de *bioraffinerie* visant à produire des dizaines de produits chimiques à partir des résidus de la paroi végétale.

L'enjeu est de taille car cette paroi rigide entourant les cellules végétales représente 85 % de la biomasse produite par l'agriculture. « La paroi végétale a pour fonction de soutenir et de protéger la plante et est de ce fait résistante à la dégradation par les micro-organismes. Il faut donc recourir à des traitements chimiques coûteux en énergie ou à une dégradation enzymatique complexe, pour dégrader les trois types de polymères qui composent la paroi : la cellulose - molécule organique la plus abondante sur terre -, l'hémicellulose et la lignine » souligne l'Allemand Ralf Möller, Cette dégradation chimique ou enzymatique vise à décomposer ces polymères en petites molécules qui pourront ensuite être réassemblées au gré de l'imagination des chimistes : biocarburant à partir du glucose de la cellulose, résines ou solvants à partir du xylose de l'hémicellulose ou encore émulsifiants et adhésifs à partir des phénols de la lignine.

Un important effort fondamental de compréhension de la structure de la paroi végétale, et en particulier des moyens de valoriser à des coûts économiquement compétitifs est cependant nécessaire avant que ce grand dessein de la chimie verte puisse se concrétiser. Les bioraffineries qui succéderont peut-être un jour aux usines pétrochimiques des terminaux pétroliers se préparent aujourd'hui dans les laboratoires fondamentaux de biologie végétale.

Mikhail Stein

research*eu n°52 p.28 ; JUIN 2007

La compréhension des interactions XGs-cellulose, qui est le réseau majeur de la paroi primaire d'un point de vue structural, apparaît comme une thématique d'importance, comme le montrent les nombreuses recherches effectuées en ce sens. Il appartient à chacun de faire un choix de l'approche à utiliser pour aborder un tel sujet. Dans le cadre du travail qui vient d'être présenté, l'étude *in vitro* a été retenue, en raison de la possibilité de préparation de substrats pertinents. En effet, cette approche a été envisagée à de nombreuses reprises par le passé mais elle se heurtait inévitablement à un problème de définition des substrats utilisés. Afin de tenter de lever ces verrous, la synthèse chimio-enzymatique a été utilisée pour l'obtention des substrats xyloglucosidiques.

La préparation de substrats naturels et d'oligosaccharides issus d'hydrolyses partielles a été réalisée à partir de XGs de tamarin et de XGs de *Rubus*. Certaines caractéristiques

intéressantes ont été obtenues. Des composés de longueur de chaîne principale variable et des XGs présentant une modification de la substitution ou du degré d'acétylation ont été préparés par extraction et hydrolyses enzymatiques. Pour compléter la gamme de substrats xyloglucosidiques, des XGOs de structure totalement définie ont été chimio-enzymatiquement synthétisés. Dans cette étude, l'utilisation de la glycosynthase *HiCel7B E197A*, s'est avérée un outil puissant pour la construction de tels XGOs. Cependant, si certaines structures, et en particulier $(XXXG)_3$, $(XXLG)_3$ et $XXXGG_4XXXG$, ont pu être obtenues, la synthèse de XGOs plus longs et/ou de degrés de substitution supérieurs, s'est heurtée à deux principaux obstacles.

Tout d'abord, la synthèse de XGOs de structure contrôlée et de masse molaire plus élevée tel que le $(XXXG)_4$ est complexe en raison de difficultés de purification. En effet, la purification par chromatographie sur gel de silice, est quasiment impossible à cause de l'affinité très importante de cet XGO, et de ces analogues de substitution différente, pour la silice.

Le second obstacle rencontré au cours de ces synthèses chimio-enzymatiques est la spécificité d'activité de l'enzyme *HiCel7B E197A* qui n'a pas permis l'oligomérisation du motif $XXLG$. Des essais avec d'autres glycosynthases, et en particulier la *PttXET16A E85A*, ont donné des résultats encourageants mais les conditions doivent être optimisées pour pouvoir envisager la production de quantité de produit suffisante. Cet échec a néanmoins permis de préciser les topologies des sites actifs de ces deux glycosynthases.

Une étude détaillée des interactions de ces différents substrats avec la cellulose a été menée à l'aide de plusieurs techniques complémentaires.

La détermination des isothermes d'adsorption, utilisant la cellulose bactérienne microcristalline (BMCC), a permis de mettre en évidence l'importance de certains éléments structuraux des xyloglucanes. L'influence favorable, vis-à-vis de la quantité adsorbée, de l'augmentation de masse molaire, et de la présence de chaînes latérales trisaccharidiques ou plus vraisemblablement de leur répartition a été déterminée. Le mécanisme d'interaction est également fonction de la longueur de la chaîne principale. En effet, le modèle de Scatchard a permis de conclure à un mécanisme coopératif pour les interactions impliquant des XGs de tamarin natifs mais cette caractéristique n'est plus vérifiée pour les XGOs de masse molaire moyenne $3.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. L'acétylation semble quant à elle n'avoir que très peu de conséquence

sur la capacité d'adsorption. De même, la présence d'un résidu galactosyle par motif constitutif ou d'une zone non substituée, de quatre résidus glucosyle, ne modifient pas l'affinité des XGOs pour la BMCC. Ce type de ramification permet donc une solubilisation des XGs et prévient contre une éventuelle agglomération mais ne semble pas avoir directement d'influence sur la capacité d'interaction.

Une approche enthalpique, par titration calorimétrique et étude des isothermes d'adsorption à différentes températures, a permis de montrer l'existence de plusieurs sites d'adsorption sur la BMCC. En effet, outre les interactions en surface de la cellulose, qui ont lieu quelque soit la masse molaire des substrats xyloglucosidiques, les XGOs de masse molaire moindre semblent capables de se loger dans des rainures de la BMCC par un processus endothermique probablement de type hydrophobe. Les XGs sont, quant à eux, trop longs pour pénétrer dans ces rainures. Ils génèrent également un mécanisme endothermique mais celui-ci est dû à leur auto-association, cette association n'est pas observée dans le cas des XGOs en raison de leur faible masse molaire. Bien que la BMCC ne soit pas représentative de la cellulose des parois végétales, les interactions se produisant à sa surface sont probablement représentatives de ce qui pourrait avoir lieu au sein de la paroi. De plus, il est possible qu'au niveau des défauts de la cellulose pariétale les interactions soient de nature différente de celles se produisant en surface des microfibrilles cristallines.

Les analyses RMN effectuées à partir de cellulose appauvrie en ^{13}C et de XGs de *Rubus* marqués ^{13}C ont permis d'observer une mobilité plus importante du résidu fucosyle par rapport aux autres saccharides présents, laissant penser que les interactions se situent loin de ce résidu et donc au niveau du squelette cellulosique de XGs. Par ailleurs, en faisant varier le contraste isotopique grâce à l'utilisation de la cellulose marquée ^{13}C et de XGs naturels, aucune modification de conformation n'est observée sur la cellulose. Enfin, contrairement aux XG_{T700}, utilisés lors d'analyses RMN antérieures, une seule population de XGs semble présente avec les XG_{REC}, plus courts ($M_w = 30.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), ce qui peut laisser penser que ceux-ci, sont plutôt soumis à un régime d'adsorption de type « tuiles » qu'à la formation de boucles (Figure 64).

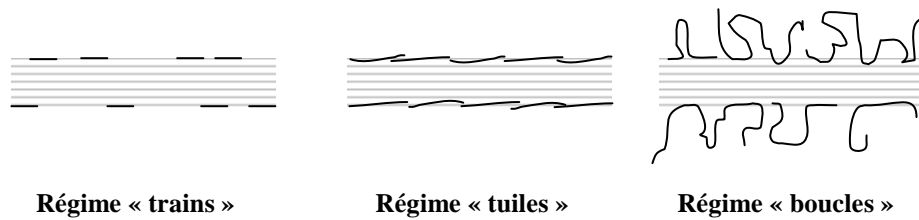


Figure 64 : Régime d'interactions envisageables en fonction de la longueur du substrat xyloglucosidique

Si ces études n'ont pas permis d'aboutir à un mécanisme définitif des interactions XGs-cellulose au sein de la paroi végétale, elles ont néanmoins mis en évidence certaines tendances concernant l'influence de paramètres structuraux des XGs. Ces influences ont pu être déterminées grâce à l'obtention de substrats bien définis et à la mise en œuvre de méthodes d'analyse des interactions suffisamment sensibles et ne nécessitant que de faibles quantités de produits.

Perspectives

Lors de la poursuite de ce projet, d'autres composés pourraient être produits pour confirmer certaines tendances. Tout d'abord, il pourrait être envisagé de défucosyler les XGs de *Rubus* par l'acide oxalique ou au moyen d'une α -L-fucosidase, afin de déterminer si la meilleure affinité de ce substrat est due à l'existence de chaînes latérales trisaccharidiques, ou bien si seule la répartition de ces chaînes latérales est en cause.

Par ailleurs, l'utilisation de glycosynthèses de spécificité différente pourrait permettre de synthétiser des composés de type $(XLLG)_n$ et de confirmer l'absence d'influence des résidus galactosyle.

La préparation de XGOs présentant une zone non substituée plus longue peut aussi être intéressante pour expliquer les mécanismes d'interaction, mais l'insolubilité de composés trop peu substitués peut rendre leur synthèse difficile.

L'absence de taille de XGOs intermédiaires entre $[XGO]_3$ et les XGs naturels n'a pas été un obstacle pour cette étude mais une gamme de composés de taille variable pourrait permettre de déterminer l'influence de la longueur de chaîne sur les différents régimes d'adsorption (trains, tuiles et boucles). L'obtention de composés de type $[XGO]_4$ pourrait, par exemple, être réalisée mais en utilisant un moyen de purification autre que la chromatographie sur gel de silice, comme la chromatographie d'exclusion.

Les bola-oligosaccharides, XGO-PEG-XGO, seraient également une bonne alternative à la production de XGOs plus longs. A ce jour, les précurseurs ont pu être synthétisés et suite à l'échec de la méthode de couplage par amination réductrice, des tests de « click-chemistry » ont été effectués. Ces derniers se sont avérés positifs mais il serait à présent nécessaire de synthétiser des quantités de produits plus importantes afin de pouvoir tester ces produits en interaction avec la cellulose.

Les méthodes envisageables pour l'étude des interactions sont nombreuses. Des choix ont été faits au cours de ce travail mais il est également possible d'utiliser d'autres techniques. La SPR pourrait ainsi être envisagée. Cette méthode nécessite cependant de fixer un des deux substrats sur la surface d'or, ceci peut être réalisé, par exemple, par un couplage streptavidine/biotine. La streptavidine est une protéine qui s'adsorbe spontanément sur beaucoup de surfaces dont les métaux. Par ailleurs, elle possède une très forte reconnaissance pour la biotine. En introduisant un groupement biotine à l'extrémité des XGs il est donc

possible de greffer ces derniers sur une surface d'or préalablement fonctionnalisée par la streptavidine. Il est alors possible d'accéder à différentes grandeurs cinétiques. Ce type de couplage est déjà utilisé, entre autre, pour l'étude des interactions protéine/sucre. Un simple dépôt des XGs suivi d'un séchage peut également être envisagé si l'adhésion est suffisante.

Une analyse AFM pourrait également être réalisée pour quantifier l'affinité des XGOs ou XGs pour la cellulose. Dans ce cas, les substrats xyloglucosidiques possédant un groupement thiol sur l'extrémité réductrice pourraient être fixés à une pointe d'AFM recouverte d'or. La pointe d'AFM peut également être fonctionnalisée par des fonctions amines qui pourraient ensuite réagir avec l'extrémité réductrice des oligosaccharides. La cellulose serait ensuite déposée sur la surface du montage AFM par dépôt et séchage pour comparer l'affinité des différents XGs et XGOs envers la cellulose.

Ces méthodes nécessiteraient donc des étapes supplémentaires de synthèse ainsi que des mises au point expérimentales mais pourraient permettre d'apporter des informations complémentaires sur l'affinité de substrats xyloglucosidiques pour différents types de cellulose.

D'un point de vue personnel, ce sujet de recherche pluridisciplinaire m'a permis d'acquérir des compétences diverses, dans un premier temps à travers le regard du chimiste et la chimie des oligosaccharides, en particulier, frontière complexe entre la chimie organique des glucides et la chimie des polymères, puis dans un second temps par les approches du physico-chimiste, qui m'étaient, jusqu'à présent, moins familières, avec la mise en œuvre de techniques d'analyses diverses nécessitant parfois des adaptations expérimentales en fonction des substrats utilisés.

Malgré les difficultés de ce travail aux interfaces de différents domaines, ces trois années m'ont permis de développer des savoirs en synthèse chimio-enzymatique et extraction de polysaccharides, ainsi qu'en chimie analytique. De plus, la collaboration entre l'INRA et le CERMAV m'a donné l'opportunité de travailler dans deux environnements différents qui m'ont apporté chacun des connaissances tant sur le plan scientifique qu'humain.

Ce projet m'aura donc permis de définir avec plus de précisions mon projet professionnel que je souhaiterais poursuivre en synthèse saccharidique. Le travail de synthèse chimio-enzymatique m'a donné l'opportunité d'acquérir des compétences en chimie des

oligosaccharides et l'approche physico-chimique, au travers des différentes méthodes d'analyse que j'ai pu utiliser, me permet de disposer de connaissances utiles pour la caractérisation de produits organiques et d'assemblage.

Ces travaux ont donné lieu aux communications scientifiques suivantes :

Communication orales et posters :

- 2003-2006 : Communication orale annuelle aux colloques du GDR-AMV
- 2006 : Poster « Studies of interactions between xyloglucans and cellulose: model of the primary cell wall » Summer Course Glycosciences (Wageningen, Pays-Bas)
- 2007 : Poster « Chemo-enzymatically synthesised xylogluco-oligosaccharides for interaction studies with model celluloses: thermodynamical approaches » International fungal/plants cell wall meeting (Biarritz, France)

Publications :

- Kathleen Piens, Maria Henriksson, Fredrika Gullfot, Marie Lopez, Régis Fauré, Farid M. Ibatullin, Tuula T. Teeri, Hugues Driguez and Harry Brumer Glycosynthase activity of hybrid aspen xyloglucan *endo*-transglycosylase *PttXET* 16-34 nucleophile mutants *Org. Biomol. Chem.* (sous presse)
- Marie Lopez, Hervé Bizot, Alain Buléon and Hugues Driguez Chemoenzymatic Synthesis of Xylogluco-Oligosaccharides and their Interactions with Cellulose (en préparation)
- Marie Lopez, Hervé Bizot, Gérard Chambat, Marie-France Marais, Marie-Christine Ralet, Hugues Driguez and Alain Buléon Xyloglucans-Cellulose interactions: enthalpic study and influence of side chains and molecular weight (en préparation)

Références bibliographiques

1. N. Carpita; M. McCann The cell wall In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds.; ASPP **2000**, p 52-108
2. H. Chanzy Aspects of cellulose structure In *Cellulose sources and exploitation*; Ellis Horwood Ltd. **1990**, p 3-12
3. J.-P. Vincken; H. A. Schols; R. J. F. J. Oomen; M. C. McCann; P. Ulvskov; A. G. J. Voragen; R. G. F. Visser, If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture *Plant Physiol.* **2003**, *132*(4), 1781-1789
4. A. G. J. Voragen, Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V. and Renard, C. M. G. C Pectins In *Food polysaccharides*, Stephen A. M., D. Y., Ed.; Marcel Dekker: Londres, Royaume-Uni, **1995**, *Vol. 10*, p 287-339
5. L. G. Wilson; S. C. Fry, Extensin a major cell wall glycoprotein *Plant, Cell & Environment* **1986**, *9*(4), 239-260
6. A. Bacic; H. Du; B. A. Stone; A. E. Clarke, Arabinogalactan proteins: a family of cell-surface and extracellular matrix plant proteoglycans *Essays in Biochemistry* **1996**, *31*, 91-101
7. M. McNeil; A. G. Darvill; S. C. Fry; P. Albersheim, Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*(1), 625-663
8. N. G. Lewis; E. Yamamoto, Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1990**, *41*(1), 455-496
9. M.-C. Ralet; G. Andre-Leroux; B. Quemener; J.-F. Thibault, Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall *Phytochem.* **2005**, *66*(24), 2800-2814
10. Y. Kato; D. J. Nevins, Isolation and identification of *O*-(5-*O*-feruloyl- α -arabinofuranosyl)-1(\rightarrow 3)-*O*- β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-walls *Carbohydr. Res.* **1985**, *137*, 139-150
11. T. Ishii, Structure and functions of feruloylated polysaccharides *Plant Sci.* **1997**, *127*(2), 111-127
12. D. M. Gibeaut; N. C. Carpita, Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides *FASEB J.* **1994**, *8*(12), 904-915
13. N. C. Carpita; D. M. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth *Plant J.* **1993**, *3*(1), 1-30
14. W.-R. Scheible; M. Pauly, Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*(3), 285-295
15. B. Henrissat, CAZy ~ Carbohydrate-Active enZymes <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>,
16. Y. Nishiyama; P. Langan; H. Chanzy, Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(31), 9074-9082
17. Y. Nishiyama; U. J. Kim; D. Y. Kim; K. S. Katsumata; R. P. May; P. Langan, Periodic Disorder along Ramie Cellulose Microfibrils *Biomacromolecules* **2003**, *4*(4), 1013-1017
18. T. H. Giddings, Jr.; D. L. Brower; L. A. Staehelin, Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls *J. Cell Biol.* **1980**, *84*(2), 327-339

19. K. Okuda; L. Tsekos; R. M. Brown, Cellulose microfibril assembly in *Erythrocladia subintegra* Rosenv.: An ideal system for understanding the relationship between synthesizing complexes (TCs) and microfibril crystallization *Protoplasma* **1994**, *180*(1), 49-58
20. J. Sugiyama; H. Chanzy; J. F. Revol, On the polarity of cellulose in the cell wall of *Valonia Planta* **1994**, *193*(2), 260-265
21. D. P. Delmer, Cellulose Biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*(1), 245-276
22. E. Canale-Parola, Biology of the sugar-fermenting Sarcinae *Bacteriol. Rev.* **1970**, *34*(1), 82-97
23. A. J. Brown, The chemical action of pure cultivation of bacterium aceti. *J. Am. Chem. Soc.* **1886**, *49*, 432-439
24. S. Hestrin; M. Aschner, Synthesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum* *Nature* **1947**, *159*, 64-65
25. S. Hestrin; M. Schramm, Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose *Biochem. J.* **1954**, *58*(2), 345-352
26. H. P. Fink, Investigation of the supramolecular structure of never dried bacterial cellulose *Macromol. Symp.* **1997**, *120*, 207-217
27. C. H. Haigler; M. Benziman Cellulose and other natural polymer systems. Biogenesis, Structure and degradation, Brown, R. M. J., Ed.; Plenum Press: New-York - London, **1982**, p 273
28. P. Ross; R. Mayer; M. Benziman, Cellulose biosynthesis and function in bacteria *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*(1), 35-58
29. J.-C. Portais; A.-M. Delort, Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can ¹³C-NMR tell us? *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26*(4), 375-402
30. R. M. Brown, The Biosynthesis of Cellulose *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.* **1996**, *33*(10), 1345-1373
31. S. Kimura; W. Laosinchai; T. Itoh; X. Cui; C. R. Linder; R. M. Brown, Jr., Immunogold Labeling of Rosette Terminal Cellulose-Synthesizing Complexes in the Vascular Plant *Vigna angularis* *Plant Cell* **1999**, *11*(11), 2075-2086
32. J. Lai-Kee-Him; H. Chanzy; M. Muller; J.-L. Putaux; T. Imai; V. Bulone, *In Vitro* Versus *in Vivo* Cellulose Microfibrils from Plant Primary Wall Synthases: Structural Differences *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*(40), 36931-36939
33. D. P. Delmer; Y. Amor, Cellulose Biosynthesis *Plant Cell* **1995**, *7*(7), 987-1000
34. J. E. Burn; C. H. Hocart; R. J. Birch; A. C. Cork; R. E. Williamson, Functional Analysis of the Cellulose Synthase Genes Cesa1, Cesa2, and Cesa3 in *Arabidopsis* *Plant Physiol.* **2002**, *129*(2), 797-807
35. B. Henrissat, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities *Biochem. J.* **1991**, *280*(2), 309-316
36. T. Desprez; S. Vernhettes; M. Fagard; G. Refregier; T. Desnos; E. Aletti; N. Py; S. Pelletier; H. Hofte, Resistance against Herbicide Isoxaben and Cellulose Deficiency Caused by Distinct Mutations in Same Cellulose Synthase Isoform CESA6 *Plant Physiol.* **2002**, *128*(2), 482-490
37. N. G. Taylor; S. Laurie; S. R. Turner, Multiple Cellulose Synthase Catalytic Subunits Are Required for Cellulose Synthesis in *Arabidopsis* *Plant Cell* **2000**, *12*(12), 2529-2540
38. P. Albersheim; A. Darvill; K. Roberts; L. A. Staehelin; J. E. Varner, Do the Structures of Cell Wall Polysaccharides Define Their Mode of Synthesis? *Plant Physiol.* **1997**, *113*(1), 1-3

39. N. Carpita; C. Vergara, Botany: Enhanced: A Recipe for Cellulose *Science* **1998**, 279(5351), 672-673
40. I. M. Saxena; R. M. Brown, Jr.; M. Fevre; R. A. Geremia; B. Henrissat, Multidomain architecture of β -glycosyl transferases: implications for mechanism of action *J. Bacteriol.* **1995**, 177(6), 1419-1424
41. D. R. Lane; A. Wiedemeier; L. Peng; H. Hofte; S. Vernhettes; T. Desprez; C. H. Hocart; R. J. Birch; T. I. Baskin; J. E. Burn; T. Arioli; A. S. Betzner; R. E. Williamson, Temperature-Sensitive Alleles of RSW2 Link the KORRIGAN Endo-1,4- β -Glucanase to Cellulose Synthesis and Cytokinesis in *Arabidopsis Plant Physiol.* **2001**, 126(1), 278-288
42. S. Pagant; A. Bichet; K. Sugimoto; O. Lerouxel; T. Desprez; M. McCann; P. Lerouge; S. Vernhettes; H. Hofte, KOBITO1 Encodes a Novel Plasma Membrane Protein Necessary for Normal Synthesis of Cellulose during Cell Expansion in *Arabidopsis Plant Cell* **2002**, 14(9), 2001-2013
43. M. S. Doblin; I. Kurek; D. Jacob-Wilk; D. P. Delmer, Cellulose Biosynthesis in Plants: from Genes to Rosettes *Plant Cell Physiol.* **2002**, 43(12), 1407-1420
44. S. C. Fry, The Structure and Functions of Xyloglucan *J. Exp. Bot.* **1989**, 40(1), 1-11
45. T. Hayashi, Xyloglucans in the Primary Cell Wall *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1989**, 40(1), 139-168
46. W. S. York; V. S. Kumar Kolli; R. Orlando; P. Albersheim; A. G. Darvill, The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants *Carbohydr. Res.* **1996**, 285, 99-128
47. J.-P. Vincken; G. Beldman; A. G. J. Voragen, Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? *Carbohydr. Res.* **1997**, 298(4), 299-310
48. E. M. Kerr; S. C. Fry, Pre-formed xyloglucans and xylans increase in molecular weight in three distinct compartments of a maize cell-suspension culture *Planta* **2003**, 217(2), 327-339
49. R. Yokoyama; J. K. C. Rose; K. Nishitani, A Surprising Diversity and Abundance of Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolases in Rice. Classification and Expression Analysis *Plant Physiol.* **2004**, 134(3), 1088-1099
50. S. C. Fry; W. S. York; P. Albersheim; A. Darvill; T. Hayashi; J. P. Joseleau; Y. Kato; E. P. Lorences; G. A. Maclachlan; M. McNeil; A. J. Mort; J. S. G. Reid; H. U. Seitz; R. R. Selvendran; A. G. J. Voragen; A. R. White, An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides *Physiol. Plant.* **1993**, 89(1), 1-3
51. W. S. York; H. van Halbeek; A. G. Darvill; P. Albersheim, Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ^1H NMR spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry *Carbohydr. Res.* **1990**, 200, 9-31
52. S. C. Fry, Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells *New Phytol.* **2004**, 161(3), 641-675
53. A. R. White; Y. Xin; V. Pezeshk, Xyloglucan glucosyltransferase in Golgi membranes from *Pisum sativum* (pea) *Biochem. J.* **1993**, 294(1), 231-238
54. R. Gordon; G. Maclachlan, Incorporation of UDP- ^{14}C Glucose into Xyloglucan by Pea Membranes *Plant Physiol.* **1989**, 91(1), 373-378
55. A. Faik; N. J. Price; N. V. Raikhel; K. Keegstra, An *Arabidopsis* gene encoding an α -xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99(11), 7797-7802
56. R. Fauré; D. Cavalier; K. Keegstra; S. Cottaz; H. Driguez, Glycosynthase-Assisted Synthesis of Xylo-Gluco-Oligosaccharide Probes for α -Xylosyltransferases *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2007(26), 4313-4319

57. D. M. Cavalier; K. Keegstra, Two Xyloglucan Xylosyltransferases Catalyze the Addition of Multiple Xylosyl Residues to Cellohexaose *J. Biol. Chem.* **2006**, 281(45), 34197-34207
58. A. Faik; C. Chileshe; J. Sterling; G. Maclachlan, Xyloglucan Galactosyl- and Fucosyltransferase Activities from Pea Epicotyl Microsomes *Plant Physiol.* **1997**, 114(1), 245-254
59. A. Camirand; D. Brummell; G. Maclachlan, Fucosylation of Xyloglucan: Localization of the Transferase in Dictyosomes of Pea Stem Cells *Plant Physiol.* **1987**, 84(3), 753-756
60. G. F. Zhang; L. A. Staehelin, Functional Compartmentation of the Golgi Apparatus of Plant Cells: Immunocytochemical Analysis of High-Pressure Frozen- and Freeze-Substituted Sycamore Maple Suspension Culture Cells *Plant Physiol.* **1992**, 99(3), 1070-1083
61. M. C. McCann; B. Wells; K. Roberts, Complexity in the spatial localization and length distribution of plant cell wall matrix polysaccharides *J. Micros.* **1992**, 166, 123-136
62. W. S. York; A. G. Darvill; P. Albersheim, Inhibition of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Stimulated Elongation of Pea Stem Segments by a Xyloglucan Oligosaccharide *Plant Physiol.* **1984**, 75(2), 295-297
63. G. J. McDougall; S. C. Fry, Anti-Auxin Activity of Xyloglucan Oligosaccharides: the Rôle of Groups other than the Terminal α -L-Fucose Residue *J. Exp. Bot.* **1989**, 40(2), 233-238
64. D. Desveaux; A. Faik; G. Maclachlan, Fucosyltransferase and the Biosynthesis of Storage and Structural Xyloglucan in Developing Nasturtium Fruits *Plant Physiol.* **1998**, 118(3), 885-894
65. J. Sampedro; C. Sieiro; G. Revilla; T. Gonzalez-Villa; I. Zarra, Cloning and Expression Pattern of a Gene Encoding an α -Xylosidase Active against Xyloglucan Oligosaccharides from *Arabidopsis* *Plant Physiol.* **2001**, 126(2), 910-920
66. N. Iglesias; J. A. Abelenda; M. Rodino; J. Sampedro; G. Revilla; I. Zarra, Apoplastic Glycosidases Active Against Xyloglucan Oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell Physiol.* **2006**, 47(1), 55-63
67. J. M. Labavitch; P. M. Ray, Relationship between Promotion of Xyloglucan Metabolism and Induction of Elongation by Indoleacetic Acid *Plant Physiol.* **1974**, 54(4), 499-502
68. D. J. Cosgrove, Cell Wall Loosening by Expansins *Plant Physiol.* **1998**, 118(2), 333-339
69. S. C. Fry; R. C. Smith; K. F. Renwick; D. J. Martin; S. K. Hodge; K. J. Matthews, Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants *Biochem. J.* **1992**, 282(3), 821-828
70. K. Nishitani; R. Tominaga, Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(29), 21058-21064
71. R. Fauré; M. Saura-Valls; I. Brumer, H.; A. Planas; S. Cottaz; H. Driguez, Synthesis of a Library of Xylogluco-oligosaccharides for Active-Site Mapping of Xyloglucan endo-Transglycosylase *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 5151-5161
72. M. Saura-Valls; R. Fauré; S. Ragas; K. Piens; H. Brumer; T. T. Teeri; S. Cottaz; H. Driguez; A. Planas, Kinetic analysis using low-molecular mass xyloglucan oligosaccharides defines the catalytic mechanism of a *Populus* xyloglucan endotransglycosylase *Biochem. J.* **2006**, 395, 99-106
73. K. Keegstra; K. W. Talmadge; W. D. Bauer; P. Albersheim, The Structure of Plant Cell Walls: III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components *Plant Physiol.* **1973**, 51(1), 188-197
74. B. S. Valent; P. Albersheim, The Structure of Plant Cell Walls: V. On the Binding of Xyloglucan to Cellulose Fibers *Plant Physiol.* **1974**, 54(1), 105-108

75. M. C. McCann; B. Wells; K. Roberts, Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall *J. Cell Sci.* **1990**, *96*(2), 323-334
76. T. J. Bootten; P. J. Harris; L. D. Melton; R. H. Newman, Solid-state ¹³C-NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan-cellulose interactions in the cell wall *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*(397), 571-583
77. O. Baron-Epel; P. K. Gharyal; M. Schindler, Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells *Planta* **1988**, *175*(3), 389-395
78. J. E. Thompson; S. C. Fry, Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells *Planta* **2000**, *211*(2), 275-286
79. A. W. Zykwinska; M.-C. J. Ralet; C. D. Garnier; J.-F. J. Thibault, Evidence for *In Vitro* Binding of Pectin Side Chains to Cellulose *Plant Physiol.* **2005**, *139*(1), 397-407
80. S. Morris; S. Hanna; M. J. Miles, The self-assembly of plant cell wall components by single-molecule force spectroscopy and Monte Carlo modelling *Nanotechnology* **2004**, (9), 1296-1301
81. M. Pauly; P. Albersheim; A. Darvill; W. S. York, Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants *Plant J.* **1999**, *20*(6), 629-639
82. J. K. C. Rose; A. B. Bennett, Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*(5), 176-183
83. T. Hayashi; G. Maclachlan, Pea Xyloglucan and Cellulose: I. Macromolecular Organization *Plant Physiol.* **1984**, *75*(3), 596-604
84. W. D. Reiter; C. C. S. Chapple; C. R. Somerville, Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis* *Science* **1993**, *261*(5124), 1032-1035
85. G. F. Vanzin; M. Madson; N. C. Carpita; N. V. Raikhel; K. Keegstra; W.-D. Reiter, The mur2 mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*(5), 3340-3345
86. E. Zablackis; W. S. York; M. Pauly; S. Hantus; W. D. Reiter; C. C. Chapple; P. Albersheim; A. Darvill, Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1* *Science* **1996**, *272*(5269), 1808-1810
87. M. Madson; C. Dunand; X. Li; R. Verma; G. F. Vanzin; J. Caplan; D. A. Shoue; N. C. Carpita; W.-D. Reiter, The MUR3 Gene of *Arabidopsis* Encodes a Xyloglucan Galactosyltransferase That Is Evolutionarily Related to Animal Exostosins *Plant Cell* **2003**, *15*(7), 1662-1670
88. E. Nguema-Ona; C. Andeme-Onzighi; S. Aboughe-Angone; M. Bardor; T. Ishii; P. Lerouge; A. Driouich, The *reb1-1* Mutation of *Arabidopsis*. Effect on the Structure and Localization of Galactose-Containing Cell Wall Polysaccharides *Plant Physiol.* **2006**, *140*(4), 1406-1417
89. T. Hayashi; T. Takeda; K. Ogawa; Y. Mitsuishi, Effects of the Degree of Polymerization on the Binding of Xyloglucans to Cellulose *Plant Cell Physiol.* **1994**, *35*(6), 893-899
90. J. P. Vincken; A. de Keizer; G. Beldman; A. G. Voragen, Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose *Plant Physiol.* **1995**, *108*(4), 1579-1585
91. T. Hayashi; K. Ogawa; Y. Mitsuishi, Characterization of the adsorption of Xyloglucan to Cellulose *Plant Cell Physiol.* **1994**, *35*(8), 1199-1205
92. D. U. de Lima; M. S. Buckeridge, Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation *Carbohydr. Polym.* **2001**, *46*(2), 157-163

93. G. Chambat; M. Karmous; M. Costes; M. Picard; J.-P. Joseleau, Variation of xyloglucan substitution pattern affects the sorption on celluloses with different degrees of crystallinity *Cellulose* **2005**, 12(2), 117-125
94. T. Hayashi; M. P. F. Marsden; D. P. Delmer, Pea Xyloglucan and Cellulose: VI. Xyloglucan-Cellulose Interactions *in Vitro* and *in Vivo Plant Physiol.* **1987**, 83(2), 384-389
95. T. Mishima; M. Hisamatsu; W. S. York; K. Teranishi; T. Yamada, Adhesion of β -glucans to cellulose *Carbohydr. Res.* **1998**, 308(3-4), 389-395
96. S. E. C. Whitney; J. E. Brigham; A. H. Darke; J. S. G. Reid; M. J. Gidley, In vitro assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects *Plant J.* **1995**, 8(4), 491-504
97. E. Chanliaud; J. de Silva; B. Strongitharm; G. Jeronimidis; M. J. Gidley, Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites *Plant J.* **2004**, 38(1), 27-37
98. M. Kacurakova; A. C. Smith; M. J. Gidley; R. H. Wilson, Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy *Carbohydr. Res.* **2002**, 337(12), 1145-1153
99. S. E. C. Whitney; J. E. Brigham; A. H. Darke; J. S. G. Reid; M. J. Gidley, Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose *Carbohydr. Res.* **1998**, 307(3-4), 299-309
100. S. Levy; W. S. York; R. Stuike-Prill; B. Meyer; L. A. Staehelin, Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding *Plant J.* **1991**, 1(2), 195-215
101. S. Levy; G. Maclachlan; L. A. Staehelin, Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations *Plant J.* **1997**, 11(3), 373-386
102. J. Hanus; K. Mazeau, The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale *Biopolymers* **2006**, 82(1), 59-73
103. M. L. Sinnott, Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer *Chem. Rev.* **1990**, 90(7), 1171-1202
104. G. Davies; B. Henrissat, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases *Structure* **1995**, 3(9), 853-859
105. D. E. J. Koshland, Stereochemistry and mechanism of enzymatic reaction *Biol. Rev.* **1953**, 28, 416-436
106. S. G. Withers; I. P. Street, Identification of a covalent α -D-glucopyranosyl enzyme intermediate formed on a β -glucosidase *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110(25), 8551-8553
107. H. Prade; L. F. Mackenzie; S. G. Withers, Enzymatic synthesis of disaccharides using *Agrobacterium sp.* β -glucosidase *Carbohydr. Res.* **1997**, 305(3-4), 371-381
108. B. Sauerbrei; J. Thiem, Galactosylation and glucosylation by use of β -galactosidase *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33(2), 201-204
109. E. Bankova; N. Bakalova; S. Petrova; D. Kolev, Enzymatic synthesis of Oligosaccharides and Alkylglycosides in water-organic media via transglycosylation of Lactose *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* **2006**, 114-119
110. L. F. Mackenzie; Q. Wang; R. A. J. Warren; S. G. Withers, Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120(22), 5583-5584
111. S. Fort; V. Boyer; L. Greffe; G. J. Davies; O. Moroz; L. Christiansen; M. Shülein; S. Cottaz; H. Driguez, Highly Efficient Synthesis of β (1-4)-Oligo- and -Polysaccharides Using a Mutant Cellulase. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5429-5437

112. S. Fort; L. Christiansen; M. Schulein; S. Cottaz; H. Driguez, Stepwise synthesis of cellodextrins assisted by mutant cellulase *Isr. J. Chem.* **2000**, *40*, 217-221
113. V. Boyer; S. Fort; T. P. Frandsen; M. Schülein; S. Cottaz; H. Driguez, Chemoenzymatic Synthesis of a Bifunctionalized Cellohexaoside as a Specific Substrate for the Sensitive Assay of Cellulase by Fluorescence Quenching *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*(6), 1389-1394
114. D. U. de Lima; W. Loh; M. S. Buckeridge, Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan *Plant Physiol. Biochem.* **2004**, *42*(5), 389-394
115. G. Chambat; N. Cartier; A. Lebfèvre; M.-F. Marais; J. P. Joseleau, Changes in cell wall and extracellular polysaccharides during the culture cycle of *Rubus fruticosus* cells in suspension culture *Plant Physiol. Biochem.* **1997**, *35*(8), 655-664
116. J. P. Joseleau; N. Cartier; G. Chambat; A. Faik; K. Ruel, Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells *Biochimie* **1992**, *74*(1), 81-88
117. G. Chambat; N. Cartier; J. P. Joseleau, Extracellular polysaccharides from suspension-cultured cells of *Rubus fruticosus*. Structure of a galactoglucomannan *Food hydrocoll.* **1987**, *1*, 555-556
118. N. Cartier; G. Chambat; J.-P. Joseleau, Cell wall and extracellular galactoglucomannans from suspension-cultured *Rubus fruticosus* cells *Phytochem.* **1988**, *27*(5), 1361-1364
119. N. Cartier; G. Chambat; J.-P. Joseleau, An arabinogalactan from the culture medium of *Rubus fruticosus* cells in suspension *Carbohydr. Res.* **1987**, *168*(2), 275-283
120. A. Faik; G. Chambat; J. P. Joseleau, Changes in wall-bound polysaccharidase activities during the culture cycle of a *Rubus fruticosus* cell suspension *Int. J. Biol. Macromol.* **1995**, *17*(6), 381-386
121. G. O. Aspinall; J. A. Molloy; J. W. T. Craig, Extracellular polysaccharides from suspension-cultured sycamore cells *Can. J. Biochem.* **1969**, *47*, 1063-1070
122. M. Glicksman *Food Hydrocolloids*; Crc Pr I Llc, **1983**, Vol. 3, 208 p
123. V. Silvestre Etude des interactions entre la Cellulose et les Xyloglucanes via des systèmes modèles de parois végétales primaires, Thèse, *Faculté des Sciences et Techniques (Nantes)*, **2004**, 164 p
124. W. S. York; L. K. Harvey; R. Guillen; P. Alberheim; A. G. Darvill, Structural analysis of tamarind seed xyloglucan oligosaccharides using β -galactosidase digestion and spectroscopic methods *Carbohydr. Res.* **1993**, *248*, 285-301
125. G. Excoffier; D. Gagnaire; J.-P. Utile, Coupure sélective par l'hydrazine des groupements acétylés anomères de résidus glycosyles acétylés *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*(2), 368-373
126. P. J. Card; G. S. Reddy, Fluorinated carbohydrates. 2. Selective fluorination of gluco- and mannopyranosides. Use of 2-D NMR for structural assignments *J. Org. Chem.* **1983**, *48*(24), 4734-4743
127. T. K. Lindhorst; C. Braun; S. G. Withers, Syntheses of 4'-deoxy-[α]-maltosyl fluoride and 4''-deoxy- α -maltotriosyl fluoride as probes of [α]-glucanotransferase mechanisms *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*(1), 93-106
128. R. Fauré Synthèses chimio-enzymatique de xylogluco-oligosaccharides pour l'étude des enzymes intervenant dans le métabolisme des xyloglucanes, Thèse, *Université Joseph Fourier (Grenoble)*, **2004**, 261 p
129. P. Johansson; S. Denman; H. Brumer; A. M. Kallas; H. Henriksson; T. Bergfors; T. T. Teeri; T. A. Jones, Crystallization and preliminary X-ray analysis of a xyloglucan endotransglycosylase from *Populus tremula* x *tremuloides* *Acta Crystallogr. Sect. D* **2003**, *59*(3), 535-537

130. K. Piens; M. Henriksson; F. Gullfot; M. Lopez; R. Fauré; F. M. Ibatullin; T. T. Teeri; H. Driguez; H. Brumer, Glycosynthase activity of hybrid aspen xyloglucan endo-transglycosylase *PttXET16-34* nucleophile mutants *Org. Biomol. Chem.* **2007**, sous presse
131. S.-I. Shoda; T. Kawasaki; K. Obata; S. Kobayashi, A facile enzymatic synthesis of cellooligosaccharide derivatives using β -lactosyl fluoride *Carbohydr. Res.* **1993**, 249(1), 127-137
132. M. N. Namchuk; S. G. Withers, Mechanism of *Agrobacterium* β -glucosidase: kinetic analysis of the role of noncovalent enzyme/substrate interactions *Biochemistry* **1995**, 34(49), 16194-16202
133. M. Hayashi; S. Hashimoto; R. Noyori, Simple Synthesis of glucosyl fluoride *Chem. Lett.* **1984**, 1747-1750
134. J. Junnemann; J. Thiem; C. Pedersen, Facile synthesis of acetylated glycosyl fluorides derived from di- and tri-saccharides *Carbohydr. Res.* **1993**, 249(1), 91-94
135. Y. Ichikawa; A. Manaka; H. Kuzuhara, Discrimination between the 2,3- and 2',3'-hydroxyl groups of maltose and cellobiose through their specific protection *Carbohydr. Res.* **1985**, 138, 55-64
136. E. P. Kyba; R. C. Helgeson; K. Madan; G. W. Gokel; T. L. Tarnowski; S. S. Moore; D. J. Cram, Host-guest complexation. 1. Concept and illustration *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99(8), 2564-2571
137. A. Richard; V. Marchi-Artzner; M.-N. Laloz; M.-J. Brienne; F. Artzner; T. Gulik-Krzywicki; M.-A. Guedeau-Boudeville; J.-M. Lehn, Fusogenic supramolecular vesicle systems induced by metal ion binding to amphiphilic ligands *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101(43), 15279-15284
138. W. W. Harding; M. Hodge; Z. Wang; W. L. Woolverton; D. Parrish; J. R. Deschamps; T. E. Prisinzano, Enantioselective synthesis of (2R,3R)- and (2S,3S)-2-[(3-chlorophenyl)-(2-methoxyphenoxy)methyl]morpholine *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16(13), 2249-2256
139. E. M. D. Keegstra; J. W. Zwikker; M. R. Roest; L. W. Jennekens, A highly selective synthesis of monodisperse oligo(ethylene glycols) *J. Org. Chem.* **1992**, 57(24), 6678-6680
140. Y. Chen; G. L. Baker, Synthesis and Properties of ABA Amphiphiles *J. Org. Chem.* **1999**, 64(18), 6870-6873
141. J. R. Thomas; X. Liu; P. J. Hergenrother, Size-Specific Ligands for RNA Hairpin Loops *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(36), 12434-12435
142. S. Hase; T. Ikenaka; Y. Matsushima, Structure analyses of oligosaccharides by tagging of the reducing end sugars with a fluorescent compound *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 85(1), 257-263
143. E. Coles; V. N. Reinhold; S. A. Carr, Fluorescent labeling of carbohydrates and analysis by liquid chromatography. Comparison of derivatives using mannosidosis oligosaccharides *Carbohydr. Res.* **1985**, 139, 1-11
144. C. Dumon; E. Samain; B. Priem, Assessment of the Two *Helicobacter pylori* α -1,3-Fucosyltransferase Ortholog Genes for the Large-Scale Synthesis of LewisX Human Milk Oligosaccharides by Metabolically Engineered *Escherichia coli* *Biotechnol. Progr.* **2004**, 20(2), 412-419
145. R. Huisgen, 1,3-Dipolar cycloadditions. 76. Concerted nature of 1,3-dipolar cycloadditions and the question of diradical intermediates *J. Org. Chem.* **1976**, 41(3), 403-419
146. A. R. Katritzky; S. K. Singh, Synthesis of *C*-Carbamoyl-1,2,3-triazoles by Microwave-Induced 1,3-Dipolar Cycloaddition of Organic Azides to Acetylenic Amides *J. Org. Chem.* **2002**, 67(25), 9077-9079
147. H. C. Kolb; M. G. F. K.; B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40(11), 2004-2021
148. I. Langmuir, The Adsorption of Gases on plane surfaces of Glass, Mica and Platinum *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, 40(9), 1361-1403

149. H. Freundlich *Colloid and Capillary Chemistry*; E.P. Dutton and Co: New-York, **1928**, 883 p
150. G. Scatchard, The attraction of proteins for small molecules and ions *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 660-672
151. D. K. Yuryev, Absurd trivial errors in Scatchard plot analysis <http://www.orc.ru/~yur77/absurd.htm>,
152. A. Velazquez-Campoy; S. A. Leavitt; E. Freire, Characterization of protein - protein interactions by isothermal titration calorimetry *Methods Mol. Biol.* **2004**, *261*(Protein-Protein Interactions), 35-54
153. J. C. D. Houtman; P. H. Brown; B. Bowden; H. Yamaguchi; E. Appella; L. E. Samelson; P. Schuck, Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: Application to adaptor protein complexes in cell signaling *Protein Sci.* **2007**, *16*(1), 30-42
154. T. K. Dam; C. F. Brewer, Thermodynamic Studies of Lectin-Carbohydrate Interactions by Isothermal Titration Calorimetry *Chem. Rev.* **2002**, *102*(2), 387-430
155. S. D. Spencer; R. B. Raffa, Isothermal Titration Calorimetric Study of RNase-A Kinetics (cCMP → 3'-CMP) Involving End-Product Inhibition *Pharm. Res.* **2004**, *21*(9), 1642-1647
156. E. Poduch; A. M. Bello; S. Tang; M. Fujihashi; E. F. Pai; L. P. Kotra, Design of Inhibitors of Orotidine Monophosphate Decarboxylase Using Bioisosteric Replacement and Determination of Inhibition Kinetics *J. Med. Chem.* **2006**, *49*(16), 4937-4945
157. A. Arnaud; L. Bouteiller, Isothermal Titration Calorimetry of Supramolecular Polymers *Langmuir* **2004**, *20*(16), 6858-6863
158. A.-L. Dupont; G. Harrison, Conformation and dn/dc determination of cellulose in *N,N*-dimethylacetamide containing lithium chloride *Carbohydr. Polym.* **2004**, *58*(3), 233-243
159. P. Valjamae; V. Sild; A. Nutt; G. Pettersson; G. Johansson, Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I *Eur. J. Biochem.* **1999**, *266*(2), 327-334
160. M. Srisodsuk; K. Kleman-Leyer; S. Keranen; T. K. Kirk; T. T. Teeri, Modes of action on cotton and bacterial cellulose of a homologous endoglucanase-exoglucanase pair from *Trichoderma reesei* *Eur. J. Biochem.* **1998**, *251*(3), 885-892
161. J. Araki; M. Wada; S. Kuga; T. Okano, Influence of surface charge on viscosity behavior of cellulose microcrystal suspension *J. Wood Sci.* **1999**, *45*(3), 258-261
162. X. M. Dong; J.-F. Revol; D. G. Gray, Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose *Cellulose* **1998**, *5*(1), 19-32
163. M. J. Pena; P. Ryden; M. Madson; A. C. Smith; N. C. Carpita, The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in *Arabidopsis* during growth *Plant Physiol.* **2004**, *134*(1), 443-451
164. K. Maruyama; C. Goto; M. Numata; T. Suzuki; Y. Nakagawa; T. Hoshino; T. Uchiyama, O-acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of *Mentha* *Phytochem.* **1996**, *41*(5), 1309-1314
165. W. S. York; J. E. Oates; H. van Halbeek; A. G. Darvill; P. Albersheim; P. R. Tiller; A. Dell, Location of the O-acetyl substituents on a nonasaccharide repeating unit of sycamore extracellular xyloglucan *Carbohydr. Res.* **1988**, *173*(1), 113-132

166. M. Wisniewska; S. Chibowski; T. Urban, The Temperature Influence on the Adsorption and Electrokinetical Properties in the Nonionic Polymer/Controlled Porosity Glass (CPG) System *Mater. Chem. Phys.* **2007**, doi:10.1016/j.matchemphys.2007.02.010
167. N. R. Gilkes; E. Jervis; B. Henrissat; B. Tekant; R. C. Miller, Jr.; R. A. Warren; D. G. Kilburn, The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(10), 6743-6749
168. P. Kooiman, The constitution of *Tamarindus*-amyloid *Rec. Trav. Chim.* **1961**, 80, 849-865
169. L. Greffe; L. Bessueille; V. Bulone; H. Brumer, Synthesis, preliminary characterization, and application of novel surfactants from highly branched xyloglucan oligosaccharides *Glycobiology* **2005**, 15(4), 437-445
170. M. Kloosterman; M. J. V. d. M. Dees, G. A.; J. H. Van Boom, Mild procedures for the synthesis of 1,6-anhydroaldohexopyranoses *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1985**, 104, 116-119
171. M. Tollier; J. P. Robin, Adaptation de la méthode à l'orcinol sulfurique au dosage automatique des glucides neutres totaux : conditions d'application aux extraits d'orginie végétale *Ann. Technol. Agric.* **1979**, 28, 1-15
172. R. Heller, Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro* *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* **1953**, 14, 1-233

Annexes

Annexe 1 : Liste des abréviations	I
Annexe 2 : Table des Figures.....	III
Annexe 3 : Table des Schémas.....	VI
Annexe 4 : Table des Tableaux.....	VII
Annexe 5 : Composition des différents milieux de culture utilisés.....	VIII
Annexe 6 : Spectre de masse MALDI des fractions XGO _{4/3} et XGO _{1/2}	X
Annexe 7 : Analyse RMN du composé 3	XI
Annexe 8 : Analyse RMN du composé 6	XII
Annexe 9 : Analyse RMN du composé 12	XIII
Annexe 10 : Microscopie Electronique en Transmission (MET) de BMCC.....	XIV
Annexe 11 : Spectre RMN ¹³ C (CP-MAS) des composites XG _{T700} /CB et XG _{T700} /CB ¹² C.....	XV
Annexe 12 : Spectre RMN ¹³ C de XG _{REC} ¹³ C et du composite XG _{REC} ¹³ C/CB ¹² C.....	XVI
Annexe 13 : RMN ¹³ C (SPE-MAS) du composite XG _{REC} ¹³ C/CB ¹² C.....	XVII
Annexe 14 : Principe de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR).....	XVIII

Annexe 1 : Liste des abréviations

A : Alanine

Ac : Acétyle

Ac₂O : Anhydride acétique

AFM : Microscopie à Force Atomique

BMCC : Cellulose Bactérienne MicroCristalline

Bz : Benzoyle

CB : Cellulose Bactérienne

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

COSY : Correlated spectroscopy

CP : Polarisation croisée

DAST (Diethyl amino)sulfur trifluoride

DCI : Ionisation par désorption chimique

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarisation Transfert

DHP : Dihydropyrane

DMAP : Diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylformamide

éq. : équivalent(s)

ES : ElectroSpray

Et₃N : Triéthylamine

FAB : Bombardement par des atomes rapides

Fuc : L-fucose

Gal : D-galactose

Glc : D-glucose

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HiCel7B : Cellulase 7B de *Humicola insolens*

ITC : Titration calorimétrique isotherme

k_{cat} : constante catalytique

K_M : constante de Michaelis

l : litre

MALDI : Ionisation par Désorption Laser Assistée par Matrice

MAS : rotation à l'Angle Magique

OEG : Oligo(éthylène glycol)

PEG : Poly(éthylène glycol)

Ph : phényle

PttXET16A : Xyloglucane-*Endo*-Transglycosylase 16A de *Populus tremula x tremuloides*

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

SPR : Résonance plasmonique de surface

T_A : Température ambiante

TCA : Trichloroacétyle

THP : Tétrahydropyranyle

T_p : solution tampon

UDP : Uridine DiPhosphate

XET : Xyloglucane-*Endo*-Transglycosylase

XGOs : XyloGluco-Oligosaccharides

[XGO] : XyloGluco-Oligosaccharide(s) comportant quatre résidus glucosyle

XGs : XyloGlucanes

XG_{REC} : XyloGlucanes de *Rubus* Extra-Cellulaires

XG_{RP} : XyloGlucanes de *Rubus* Pariétaux

XG_{T100} : XyloGlucanes de graines de Tamarin de masse molaire moyenne $100.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$

XG_{T700} : XyloGlucanes de Tamarin commerciaux de masse molaire moyenne $700.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$

Xyl : D-xylose

Annexe 2 : Table des Figures

Figure 1 : Paroi des cellules végétales : (a) Coupe vue par microscopie (b) représentation schématique.....	5
Figure 2 : Variabilité de taille des microfibrilles en fonction de l'origine de la cellulose d'après Chanzy ²	7
Figure 3 : Représentation schématique des hémicelluloses présentes au sein de la paroi végétale.....	8
Figure 4 : Représentation schématique des constituants des pectines.....	9
Figure 5 : Représentation schématique de la structure des pectines ³	9
Figure 6 : Principaux précurseurs de biosynthèse de lignine	11
Figure 7 : Représentation des liaisons existantes au sein de la lignine	12
Figure 8 : Représentation schématique de la formation des liaisons entre les pectines via les acides diféruques.....	12
Figure 9 : Représentation schématique d'une chaîne de cellulose cristalline et identification de son motif élémentaire : le cellobiose	15
Figure 10 : Production de cellulose par voie bactérienne (<i>Acetobacter xylinum</i>)	16
Figure 11 : Modèle représentant le procédé de formation de l'assemblage de type ruban vrillé dans le système d' <i>Acetobacter xylinum</i> ²⁷	16
Figure 12 : Modèle hypothétique d'organisation du complexe cellulose synthase dans la membrane plasmique ³³	18
Figure 13 : Organisation en rosette des microfibrilles de cellulose ⁴³	19
Figure 14 : Structure chimique des XGs de paroi cellulaire de Type I	21
Figure 15 : Nomenclature associée à la dénomination des XGs et XGOs ⁵⁰	22
Figure 16 : Représentation des blocs constitutifs de XGs de tamarin [XGO].....	22
Figure 17 : Glycoside-hydrolases agissant sur les XGs	26
Figure 18 : Réaction de transglycosylation catalysée par les XETs.....	26
Figure 19 : Modèle de la paroi primaire des cellules végétales de Type I ¹³	28
Figure 20 : Représentation schématique des parois primaires de haricot mungo (<i>Vigna radiatif</i> L.) ⁷⁶	29
Figure 21 : Réseau xyloglucanes-cellulose de la paroi primaire des cellules végétales ⁸²	31
Figure 22 : Conformations « vrillée » et « ruban plat » des XGs.....	39
Figure 23 : Mécanisme d'une β -D-glycoside-hydrolase agissant avec inversion de configuration.....	41
Figure 24 : Mécanisme d'une β -D-glycoside-hydrolase agissant avec rétention de configuration.....	42
Figure 25 : Trois topologies possibles pour les sites actifs des glycoside-hydrolases	42
Figure 26 : Mécanisme d'une glycosynthase	44
Figure 27 : Utilisation de fluorures d' α -glycosyle comme substrats de la glycosynthase <i>HiCel7B</i> E197A pour synthèse d'oligosaccharides liés en β -(1,4) ^{112, 111}	45
Figure 28 : RMN ¹³ C des XGs de <i>Rubus</i> extra-cellulaires (XG _{REC}).....	52
Figure 29 : Spectre RMN ¹³ C des XG _{REC} après désacétylation.....	53
Figure 30 : Sites d'hydrolyse privilégiés des cellulases sur les XGs de tamarin.....	57
Figure 31 : Spectre de masse des fractions [XGO] ₁ (A), [XGO] ₂ (B) et [XGO] ₃ (C)	58
Figure 32 : XXXGGGGGXXXG (45), XGO présentant une zone non substituée	60
Figure 33 : Les quatre motifs élémentaires constitutifs des XGs de tamarin	61

Figure 34 : Spectre RMN ^1H (A) et RMN ^{13}C (B) du composé 11	68
Figure 35 : Représentation schématique de motifs élémentaires de XGs illustrant la position alternée des chaînes latérales par rapport au squelette glucosidique	75
Figure 36 : Représentation de l'effet de structure des XGOs et de leurs dérivés fluorés sur la reconnaissance par l'enzyme <i>HiCel7B E197A</i>	76
Figure 37 : Représentation schématique des interactions entre les structures hybrides XGOPEGXGO et la cellulose	91
Figure 38 : Spectre RMN ^1H (A) et RMN ^{13}C (B) du $\text{TsO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8\text{Ts}$	93
Figure 39 : Cinétique d'adsorption de XG_{T700} ($C_0 = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sur la BMCC à 40 °C	110
Figure 40: Dispositif expérimental de mesure ITC	114
Figure 41 : Exemple de titrage ITC : le signal brut enregistré au cours de la mesure (A), donne, par intégration des pics par rapport au temps et normalisation à la concentration de ligand, une sigmoïde (B).....	115
Figure 42 : Comparaison de l'adsorption à 40 °C de XGs de tamarin sur la BMCC et la cellulose de type Avicel	118
Figure 43: Microscopie électronique en transmission (coloration négative) des deux types de cellulose utilisés : la BMCC (A) Cédric Gaillard (INRA-Nantes) et les whiskers de cellulose (B) Laurent Heux (CERMAV-Grenoble)	119
Figure 44 : Isothermes d'adsorption de XGOs et XGs de tamarin sur la BMCC à 40 °C.....	121
Figure 45 : Représentation des différents domaines des XGs de tamarin en interaction avec la cellulose ⁹⁰	123
Figure 46 : Application du modèle de Langmuir aux isothermes d'adsorption des XGs de tamarin $100\cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $700\cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et des $[\text{XGO}]_3$ sur la BMCC	124
Figure 47 : Représentation des deux sites d'interaction de la BMCC vis à vis des $[\text{XGO}]_3$ (A) et des XGs de tamarin (B)	126
Figure 48 : Application du modèle de Freundlich à l'adsorption de $[\text{XGO}]_3$ sur la BMCC	126
Figure 49 : Application du modèle de Scatchard aux isothermes d'adsorption de XG_{T700} , $M_w = 700\cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (A) et de $[\text{XGO}]_3$, $M_w = 3,8\cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (B) sur la BMCC	128
Figure 50 : Isothermes d'adsorption de XGs de <i>Rubus</i> Extra-Cellulaires (XG_{REC}) et de <i>Rubus</i> Pariétaux (XG_{RP}) sur la BMCC à 40 °C comparées à celle des XG_{T100}	129
Figure 51 : Isothermes d'adsorption des composés présentant un degré de galactosylation variable sur la BMCC à 40 °C	131
Figure 52 : Isothermes d'adsorption des composés LacXXXGGGGGXXXG , Lac(XXXG)_3 et $(\text{XXXG})_3$ sur la BMCC à 40 °C	133
Figure 53 : Isothermes d'adsorption des XG_{REC} et $\text{XG}_{\text{REC}}^{\text{dés}}$ sur la BMCC à 40 °C, l'agrandissement des isothermes pour $C_e \in [0 ; 250]$ est représenté en bas à droite	134
Figure 54 : Isothermes d'adsorption de XG_{T700} sur la BMCC à 60 °C, 40 °C, 25 °C et 4 °C. Les courbes à 4 et 60 °C ont été agrandies pour $C_e \in [0 ; 15]$ et représentées en bas à droite.....	136
Figure 55 : Comparaison de l'adsorption des XGs de tamarin sur la BMCC et sur les whiskers de cellulose précipités après incubation par une solution de NaCl	138
Figure 56 : Isothermes d'adsorption des XGs de tamarin sur la BMCC avec et sans ajout de NaCl	138

Figure 57 : Thermogramme de titration calorimétrique isotherme de whiskers de cellulose (53 mg.ml ⁻¹) par XGO _{1/2} (75 mg.ml ⁻¹).....	139
Figure 58 : Résultats d'ITC des whiskers (53 mg.ml ⁻¹) par des XGO _{1/2} (19 mg.ml ⁻¹) (A) et des whiskers (17 mg.ml ⁻¹) par des XGO _{1/2} (10 mg.ml ⁻¹) (B)	140
Figure 59 : Variation enthalpique de la titration de whiskers désulfatés à 20 °C, 40 °C, 60 °C et 80 °C (12 mg.ml ⁻¹) par une solution de XGO _{s_{4/3}} (10 mg.ml ⁻¹)	141
Figure 60 : ITC d'une suspension de whiskers de cellulose (17 mg.ml ⁻¹) par une solution de XGO _{s_{1/2}} (75 mg.ml ⁻¹).....	142
Figure 61 : Isothermes d'adsorption de [XGO] ₃ sur la BMCC à 4 °C et 70°C	144
Figure 62 : Représentation schématique de l'adsorption de XGOs (A) et de XGs (B) sur la cellulose	146
Figure 63 : Courbe de dosage conductimétrique d'une suspension de whiskers de papier coton Whatman (1,6 mg.ml ⁻¹ ; 22 ml) par une solution de NaOH (2.10 ⁻⁴ M).....	159
Figure 64 : Régime d'interactions envisageables en fonction de la longueur du substrat xyloglucosidique.....	230

Annexe 3 : Table des Schémas

Schéma 1 : Acétylation et déprotection anomère des différents XGOs	64
Schéma 2 : Schéma réactionnel des réactions de fluoration et d'anomérisation	66
Schéma 3 : Mécanisme de formation du β -D-glucoside de méthyle	67
Schéma 4 : Schéma réactionnel de la désacétylation des composés 10-12	69
Schéma 5 : Rétrosynthèse pour l'obtention du composé XXXGGGGGXXXG par voie chimio-enzymatique utilisant la glycosynthase <i>HiCel7B E197A</i>	79
Schéma 6 : Utilisation du motif lacosyle comme groupement protecteur.....	80
Schéma 7 : Obtention du composé α -fluoré 41	82
Schéma 8 : Protection des positions 1 ^I et 6 ^I du cellobiose	83
Schéma 9 : Protection des positions 4 ^{II} et 6 ^{II} du cellobiosyle par des groupes protecteurs de réactivité différente.....	84
Schéma 10 : Obtention du fluorure d' α -cellobiosyle protégé en position 4 ^{II}	85
Schéma 11 : Addition d'un motif cellobiosyle sur l'heptasaccharide XXXG 16	87
Schéma 12 : Obtention par voie chimio-enzymatique de l'oligosaccharide LacXXXGGGGGXXXG 44	88
Schéma 13 : Utilisation de structures hybrides pour mimer des XGOs de tailles plus importantes, enchaînement de type tête-à-queue (A) ou de type tête-à-tête (B).....	90
Schéma 14 : Voie d'obtention des dérivés $N_3(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2N_3$ et $NH_2(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2NH_2$	92
Schéma 15 : Réaction d'amination réductrice.....	95
Schéma 16 : Réaction de cycloaddition utilisant un catalyseur au cuivre	98
Schéma 17 : Fonctionnalisation de XGOs par une N-acétylpropargylamine	99
Schéma 18 : Quelles réponses sur les mécanismes d'interactions XGs-cellulose à partir de quels substrats ?...	102
Schéma 19 : Schéma illustrant la technique de détermination d'un point d'une isotherme d'adsorption	109
Schéma 20 : Récapitulatif de l'influence des différents paramètres structuraux des XGOs et XGs déterminée grâce à l'utilisation de substrats présentant des caractéristiques diverses et bien définies.	149

Annexe 4 : Table des Tableaux

Tableau 1 : Composition en oses neutres et masse molaire moyenne des XG _{REC} et XG _{RP}	51
Tableau 2 : Dosage d'oses neutres et détermination des masses molaires par chromatographie d'exclusion stérique des XG _{REC} avant et après désacétylation.....	53
Tableau 3 : Détermination des masses molaires moyennes (M_w) et des indices de polydispersité (I_p) des XGs de tamarin utilisés par chromatographie d'exclusion stérique.....	54
Tableau 4 : Évaluation des masses molaires des XGO _{4/3} et XGO _{1/2} par spectrométrie de masse et par chromatographie d'exclusion stérique.....	55
Tableau 5 : Conditions d'utilisation des β -D-galactosidases 3042B et d' <i>Aspergillus niger</i> pour l'obtention de l'oligosaccharide XXLG.....	62
Tableau 6 : Récapitulatif des essais de condensation enzymatique : XXXG- α F + XXXG.....	70
Tableau 7 : Récapitulatif des essais de couplage entre XXLG- α F (14) et XXLG (17a) utilisant la glycosynthase <i>HiCel7B</i> E197A.....	71
Tableau 8 : Essais de couplage enzymatique des dérivés digalactosylés utilisant le mutant <i>Cel7B</i> E197A.....	72
Tableau 9 : Essais de couplage enzymatique des dérivés digalactosylés utilisant la glycosynthase <i>PttXET16A</i> E85A.....	74
Tableau 10 : Valeurs des grandeurs cinétiques de catalyse de XXXG- α F (13) par <i>HiCel7B</i> E197A et XXXG- α F (13) et XLLG- α F (15) par <i>PttXET16A</i> E85A.....	77
Tableau 11 : Quantités d'oligosaccharides de structure contrôlée obtenus par voie chimio-enzymatique.....	78
Tableau 12 : Rendements des couplages enzymatiques du produit 36 sur les XGOs 21 et [XGO] ₃	88
Tableau 13 : Récapitulatif des essais d'amination réductrice.....	96
Tableau 14 : Résultats des analyses par spectrométrie de masse des essais de formation de bola-oligosaccharides par « clic-chemistry » à partir du di-azido-di(éthylène glycol) N ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ N ₃ 49	100
Tableau 15 : Coefficients directeurs (a_1), ordonnées à l'origine (a_2) et coefficients de corrélation (R^2) des approximations linéaires relatives à l'application du modèle de Langmuir.....	125
Tableau 16 : Données caractéristiques de l'adsorption des XG _{T700} et [XGO] ₃ sur la BMCC déterminées à partir du modèle de Freundlich.....	127
Tableau 17 : Récapitulatif des caractéristiques des XGs de tamarin extraits de graines, des XG _{REC} et des XG _{RP}	130

Annexe 5 : Composition des différents milieux de culture utilisés

Milieu Hestrin & Schramm ²⁵

Espèce du milieu	Concentration (g.l ⁻¹)
Peptone	5
Extrait de levure	5
Na ₂ HPO ₄	2,7
Acide citrique	1,15
Cycloheximidine	0,1
Glucose	20
HCl	Quantité nécessaire pour ajuster le pH à 5

Milieu explicite appauvri ¹³C

Espèce du milieu	Concentration (g.l ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
KH ₂ PO ₄	2,5
Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O	3
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	2.10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,5.10 ⁻³
Nicotinamide	0,6.10 ⁻³
Inositol	2,5.10 ⁻³
Celtone *	4
Mélange de vitamines	10 ml
Ethanol*	8,5
Cycloheximidine	0,1
Glucose*	20

* Espèce appauvrie en ¹³C

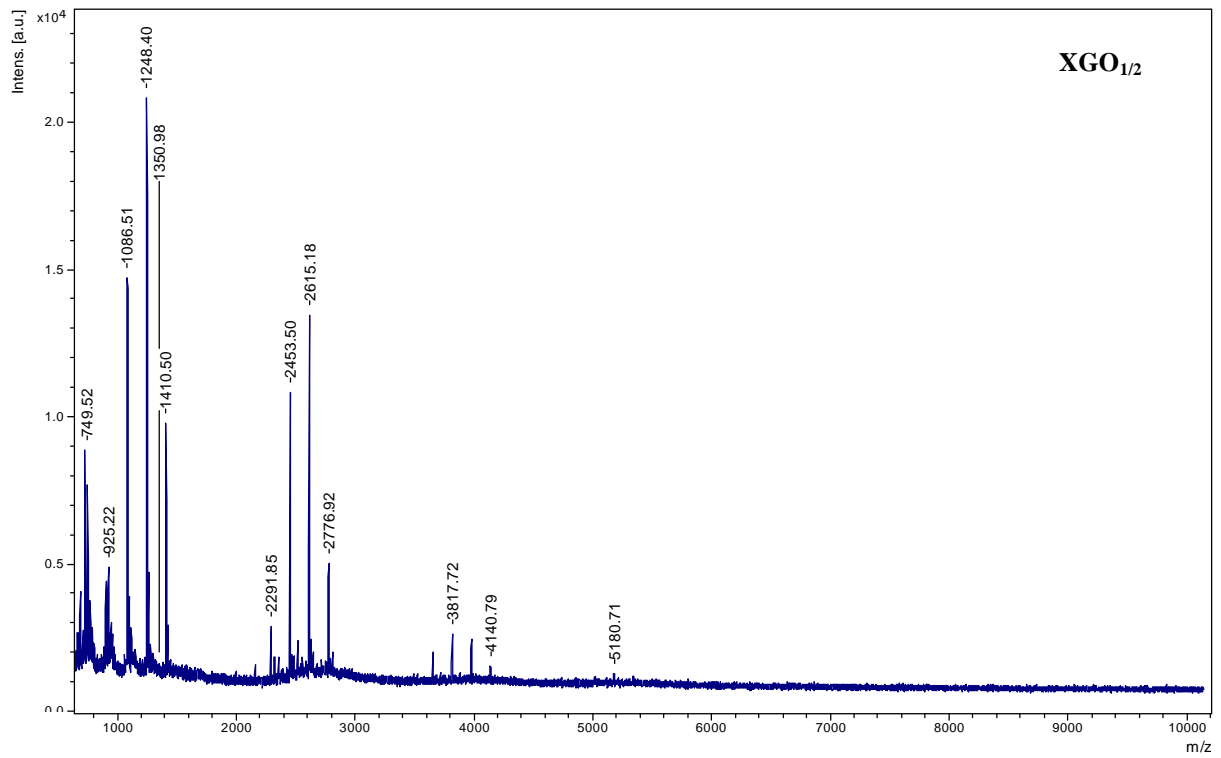
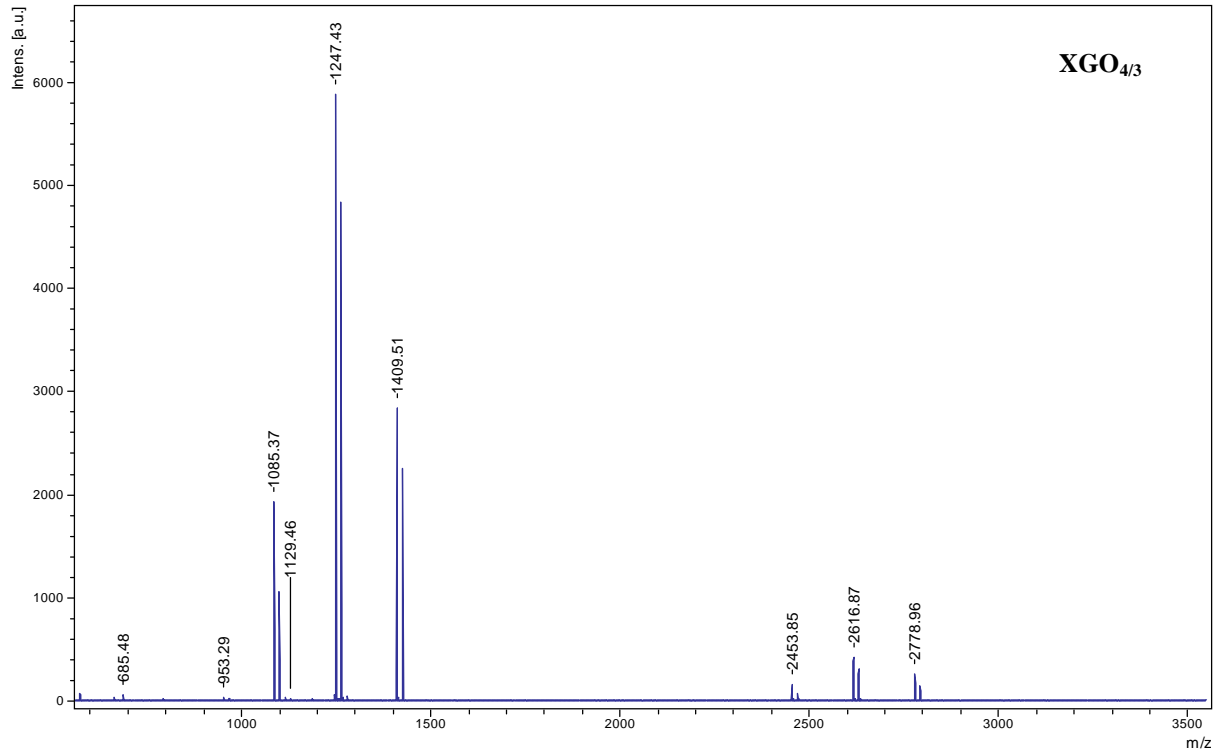
Milieu explicite enrichi ¹³C

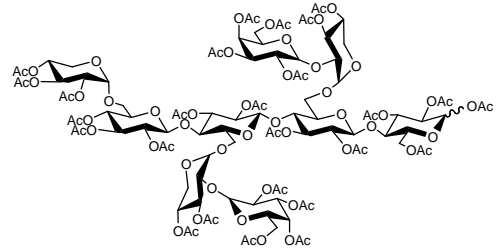
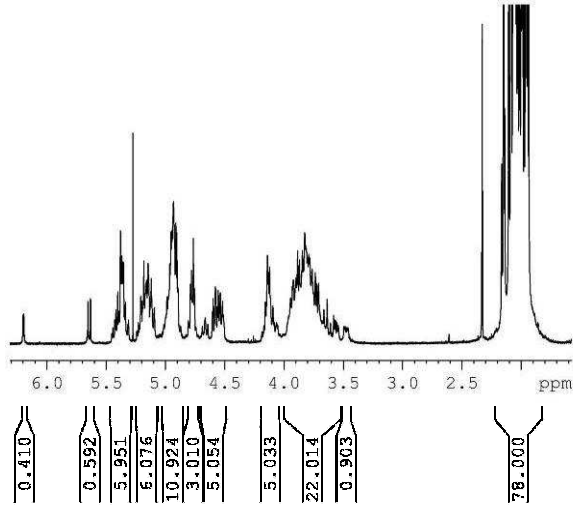
Espèce du milieu	Concentration (g.l ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
KH ₂ PO ₄	2,5
Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O	3
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	2.10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,5.10 ⁻³
Nicotinamide	0,6.10 ⁻³
Inositol	2,5.10 ⁻³
Celtone	4
Mélange de vitamines	10 ml
Ethanol	10
Acide citrique	1,3
Cycloheximidine	0,1
Glucose*	20

* Le glucose est enrichi en ¹³C 10 %

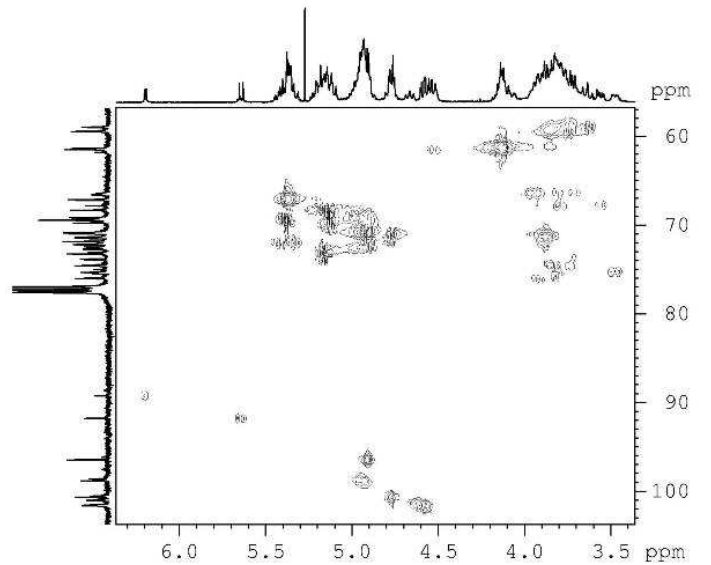
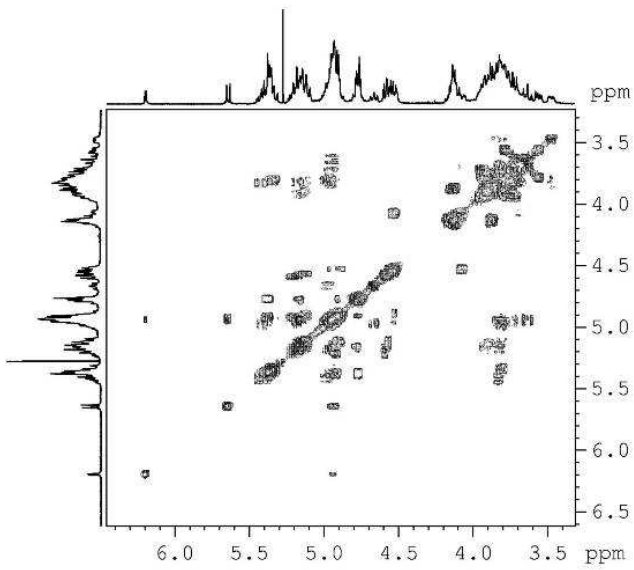
Milieu de Heller ¹⁷²

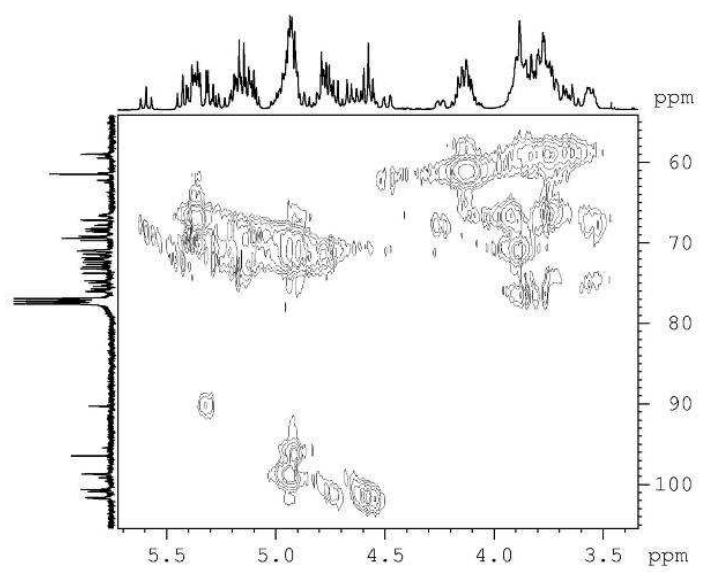
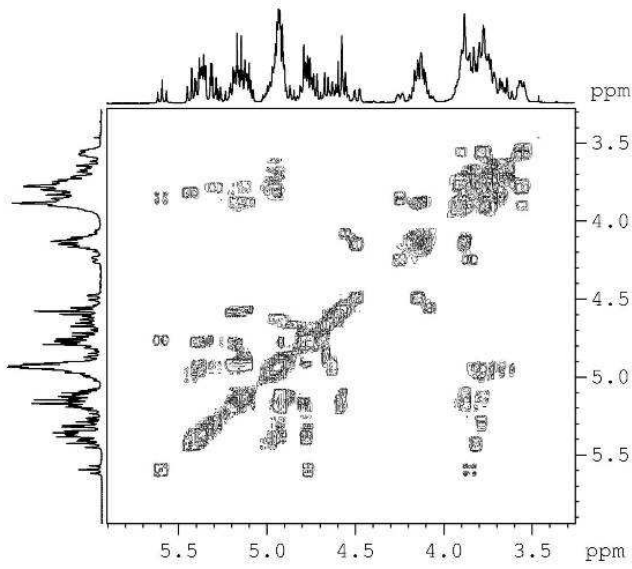
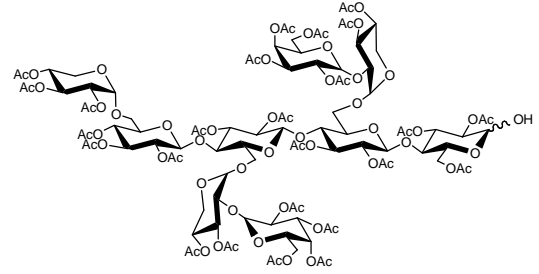
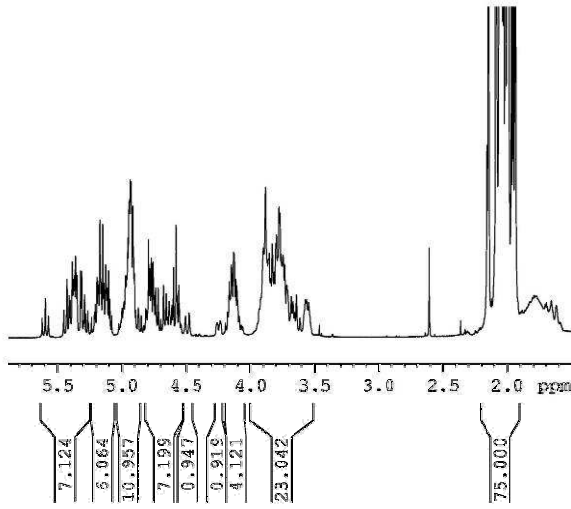
Espèce du milieu	Concentration (g.l ⁻¹)
KCl	0,75
NaNO ₃	0,6
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,122
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	0,108
CaCl ₂	0,057
AlCl ₃ , 6 H ₂ O	5,4.10 ⁻⁵
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,3.10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	0,001
KI	0,1.10 ⁻⁴
MnSO ₄ , H ₂ O	0,75.10 ⁻⁴
NaCl , 6 H ₂ O	0,3.10 ⁻⁴
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,001
FeCl ₃ , 6H ₂ O	0,001
Thiamine, HCl	0,001
Glucose	30

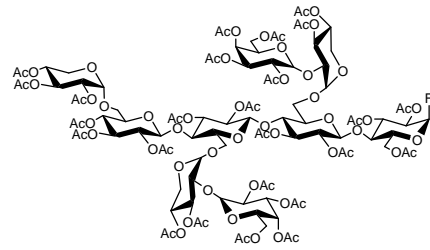
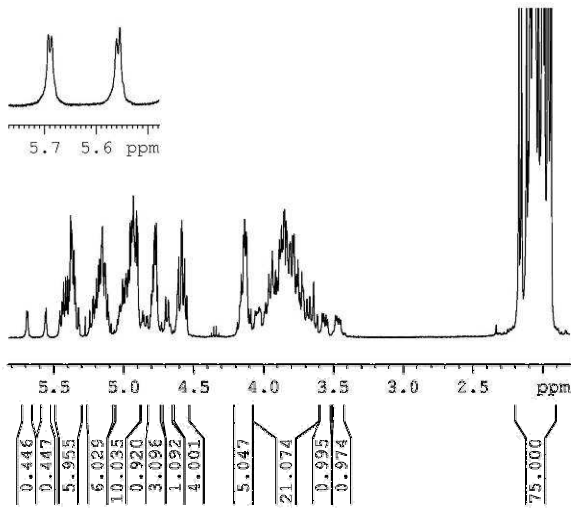
Annexe 6 : Spectre de masse MALDI des fractions XGO_{4/3} et XGO_{1/2}

Annexe 7 : Analyse RMN du composé **3**

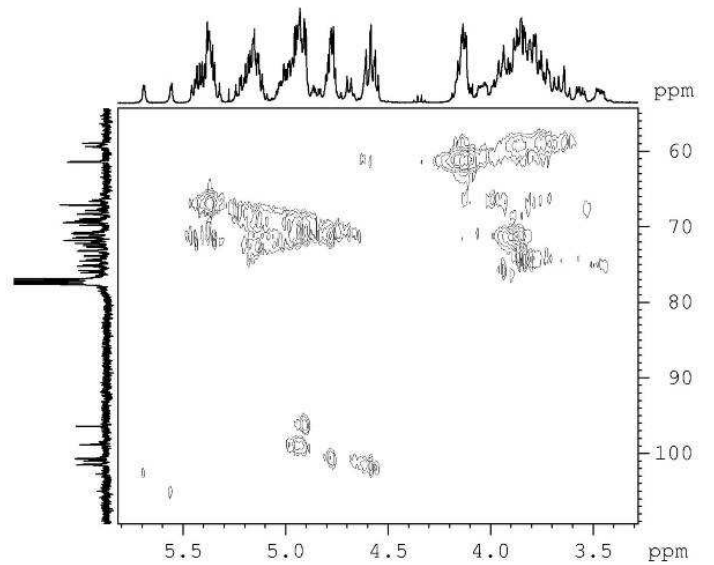
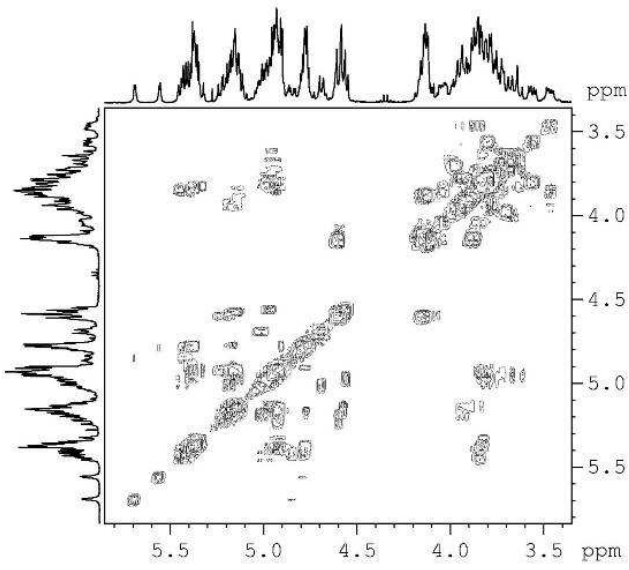
(3)



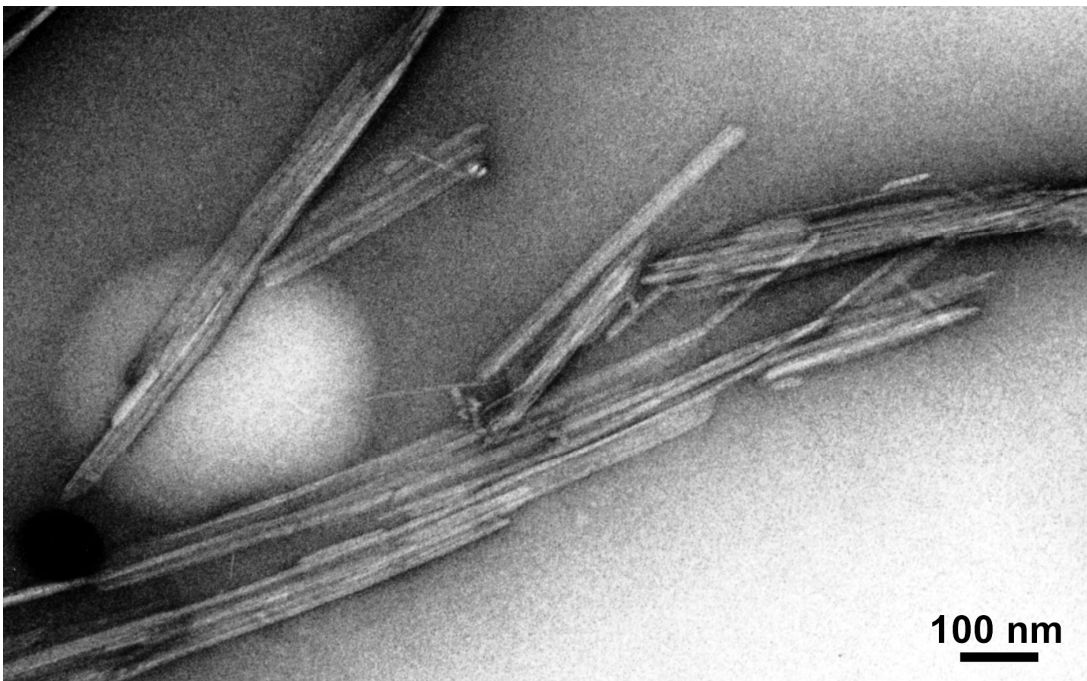
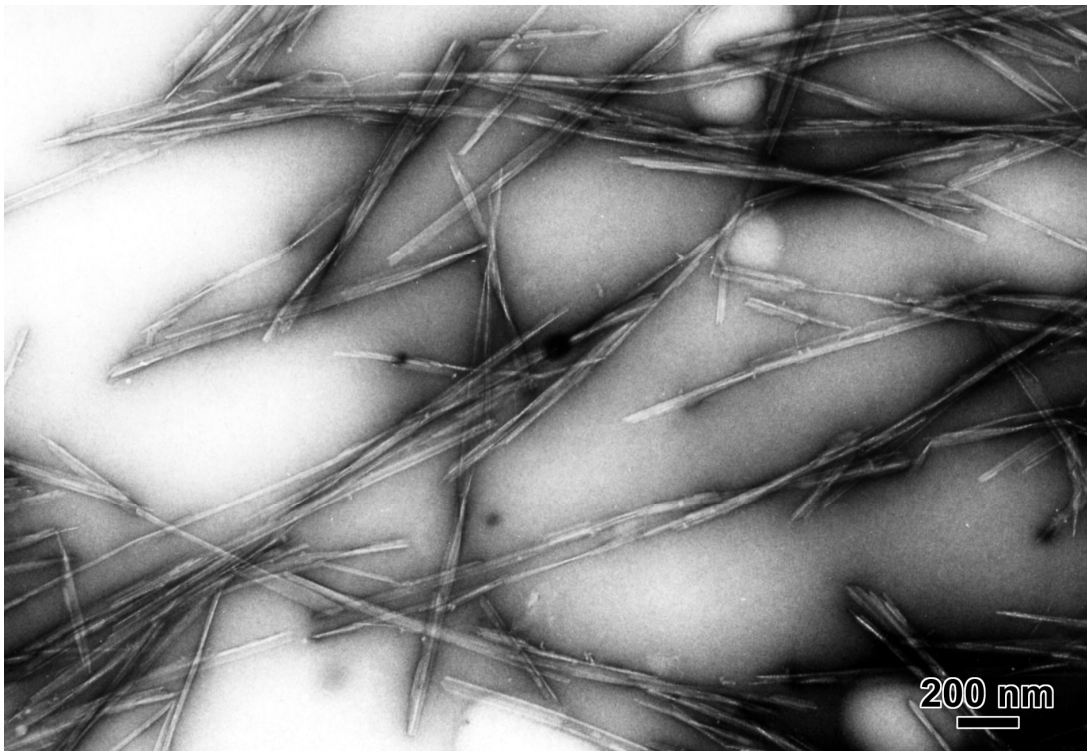
Annexe 8 : Analyse RMN du composé **6**

Annexe 9 : Analyse RMN du composé 12

(11)



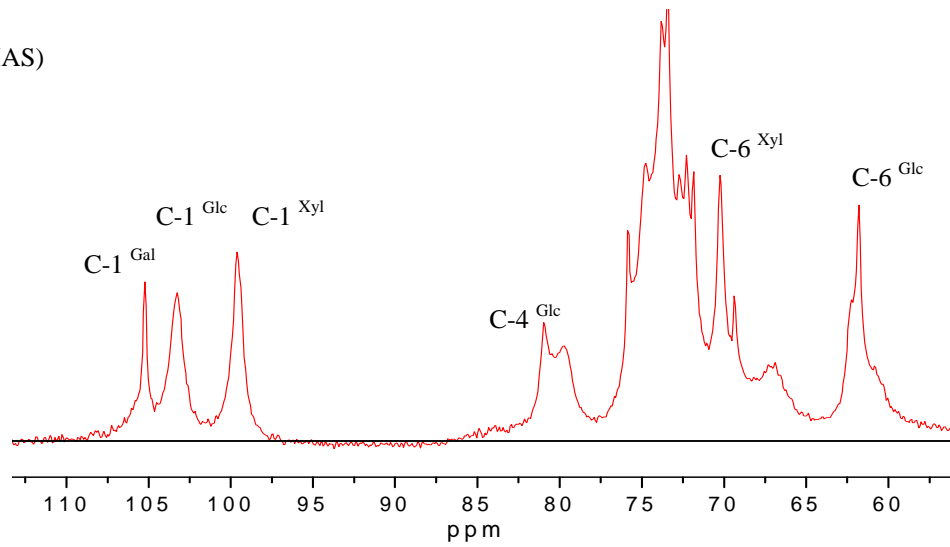
Annexe 10 : Microscopie Electronique en Transmission (MET) de BMCC



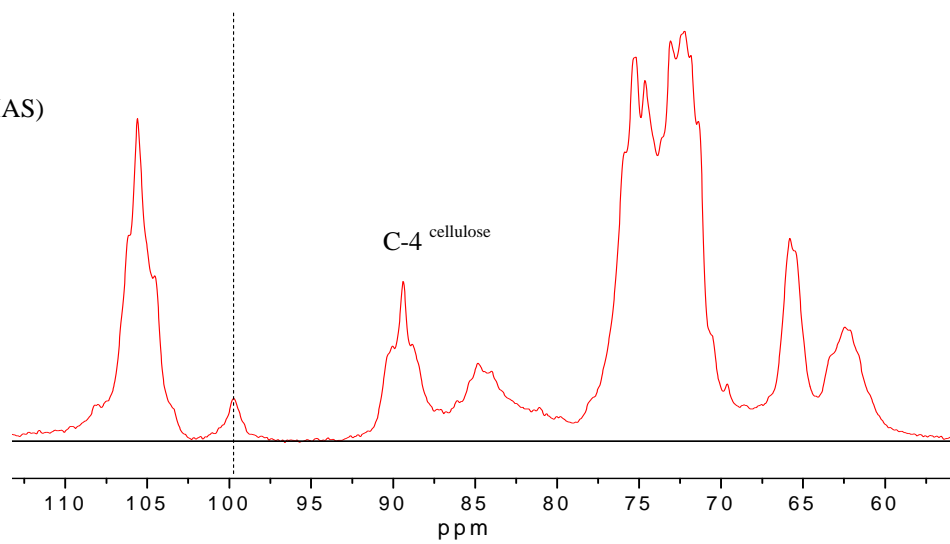
BMCC - MET coloration négative – Jean-Luc Putaux (CERMAV, Grenoble)

Annexe 11 : Spectre RMN¹³C (CP-MAS) des composites XG_{T700}/CB et XG_{T700}/CB ¹²C

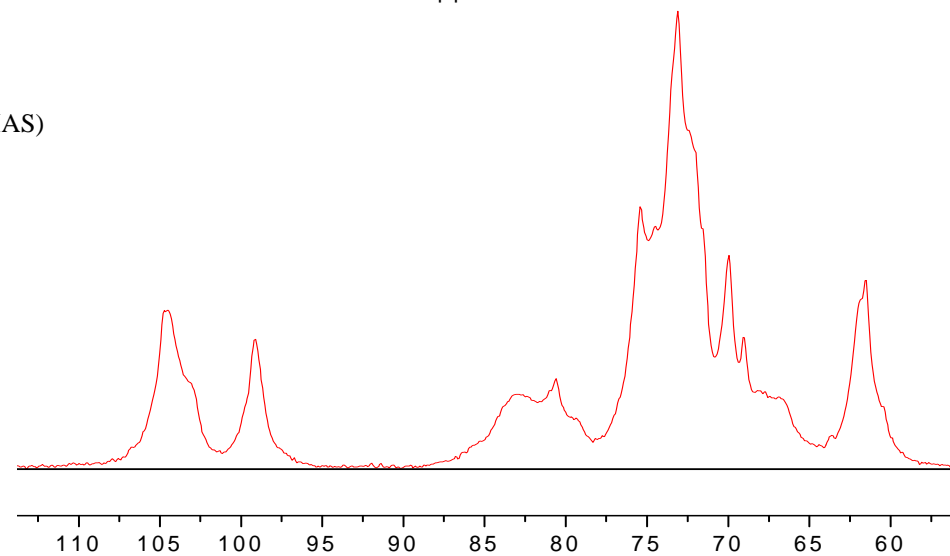
Spectre RMN (CP-MAS)

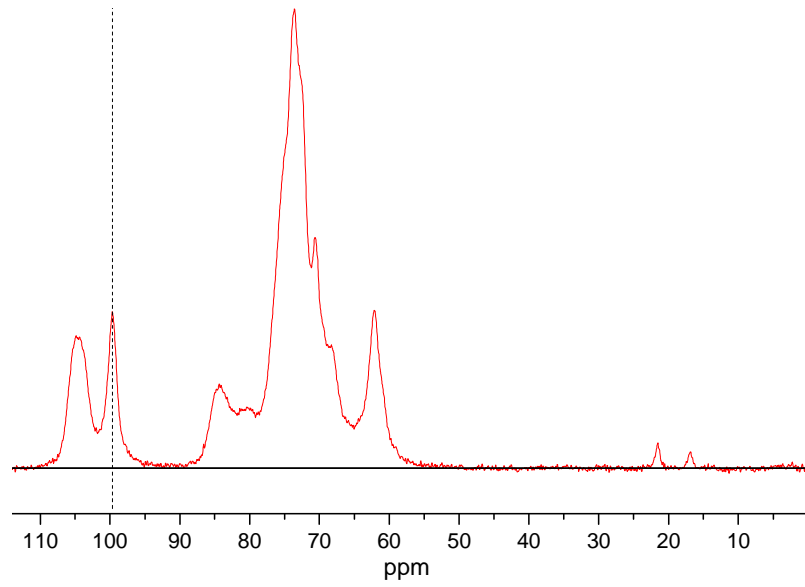
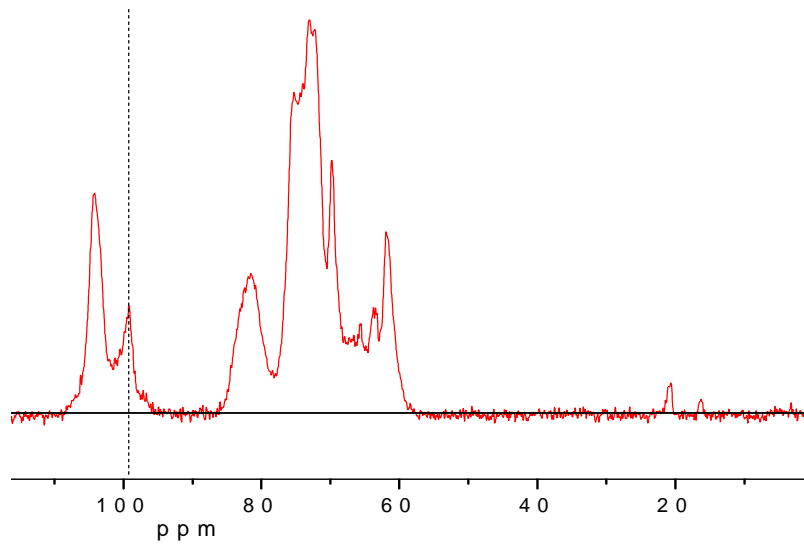
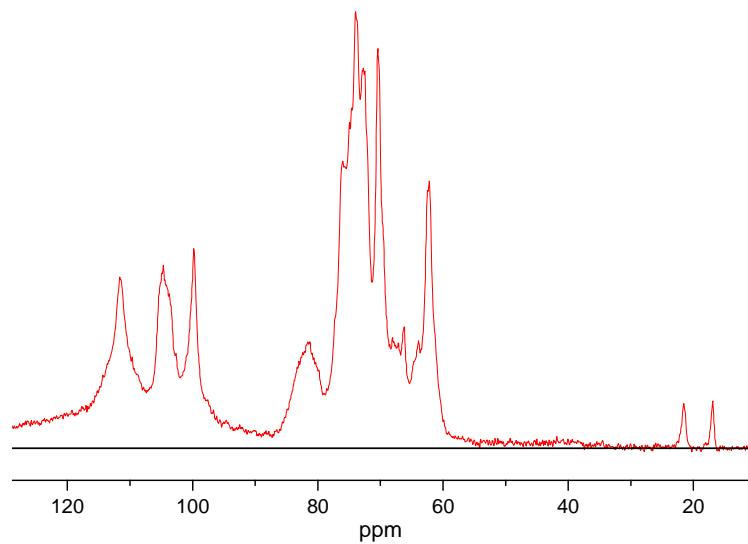
XG_{T700}

Spectre RMN (CP-MAS)

XG_{T700}/CB

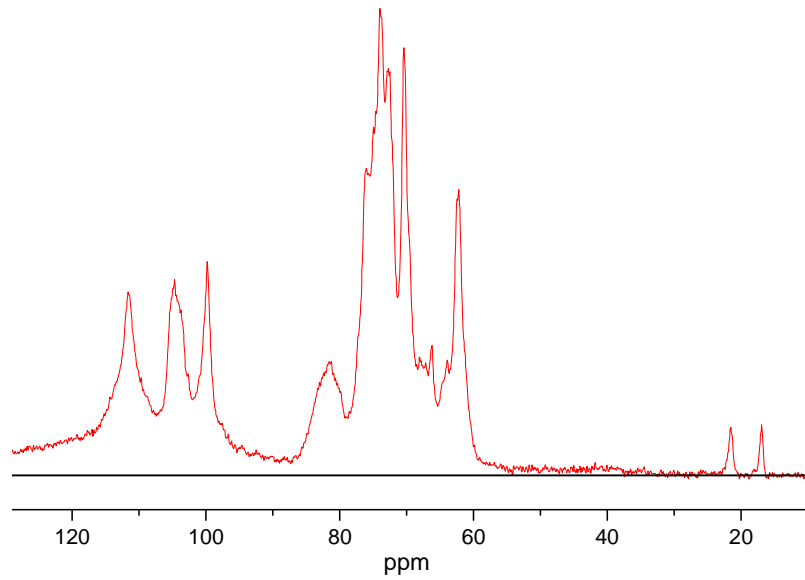
Spectre RMN (CP-MAS)

XG_{T700}/CB ¹²C

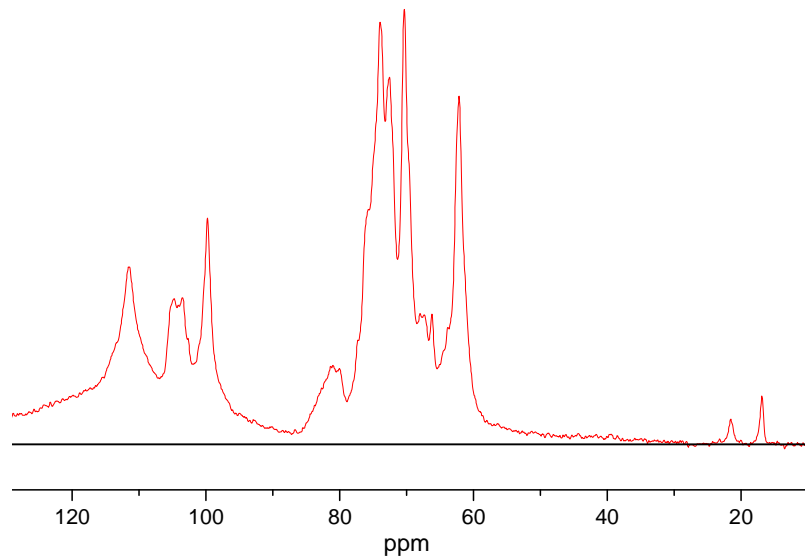
Annexe 12 : Spectre RMN¹³C de XG_{REC}¹³C et du composite XG_{REC}¹³C/CB¹²CSpectre RMN (CP-MAS)
XG_{REC}¹³CSpectre RMN (CP-MAS)
XG_{REC}¹³C/CB¹²CSpectre RMN (SPE-MAS)
XG_{REC}¹³C/CB¹²C

Annexe 13 : RMN¹³C (SEP-MAS) du composite XG_{REC}¹³C/CB¹²C

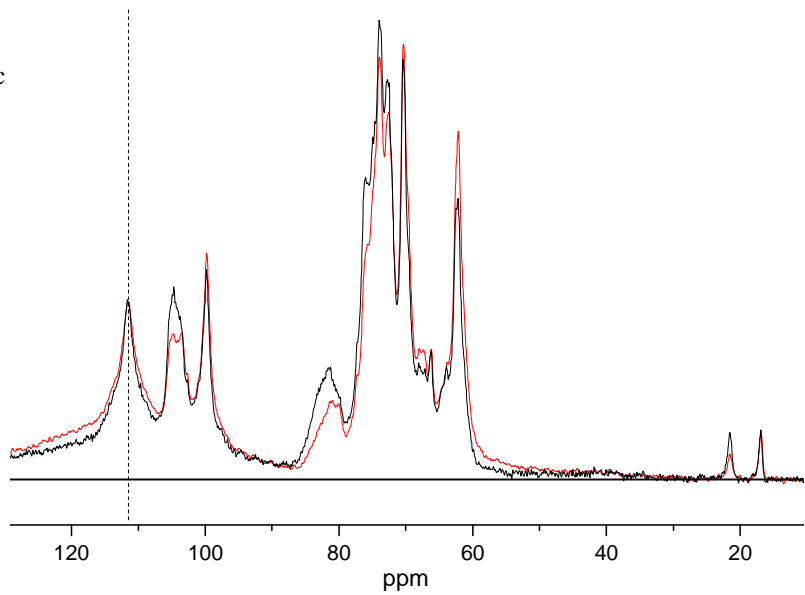
Spectre RMN (SEP-MAS)

XG_{REC}¹³C/CB¹²CT₁ = 2 s

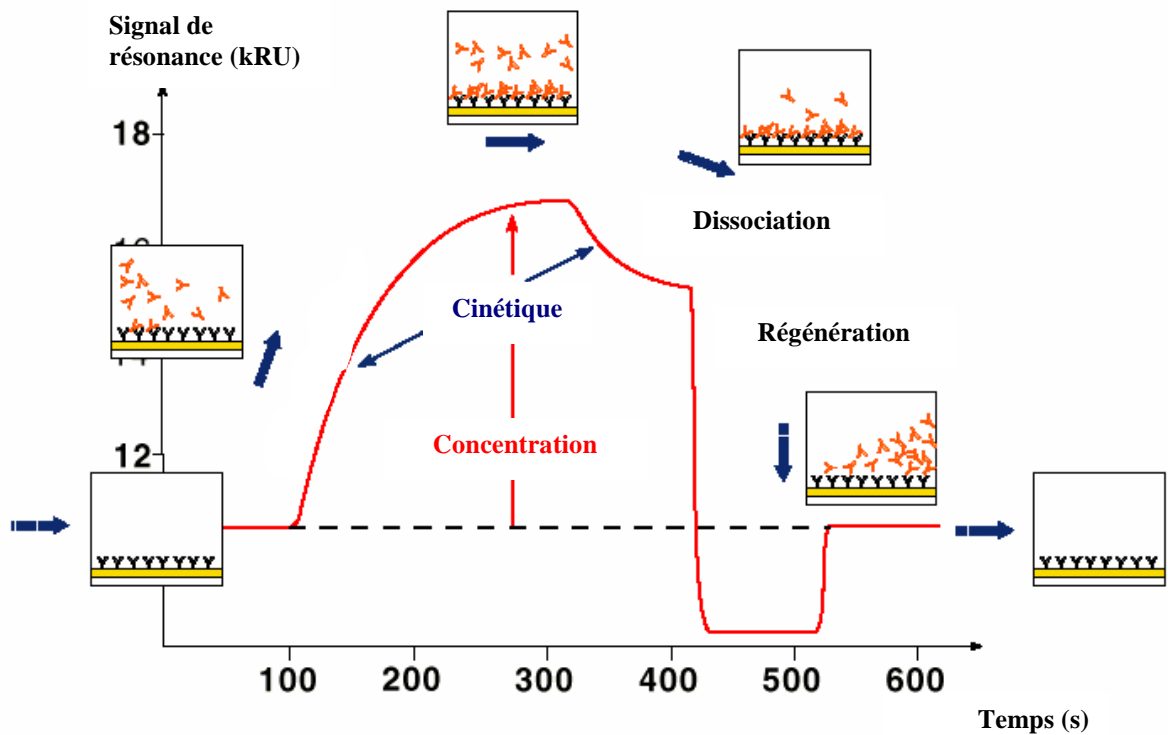
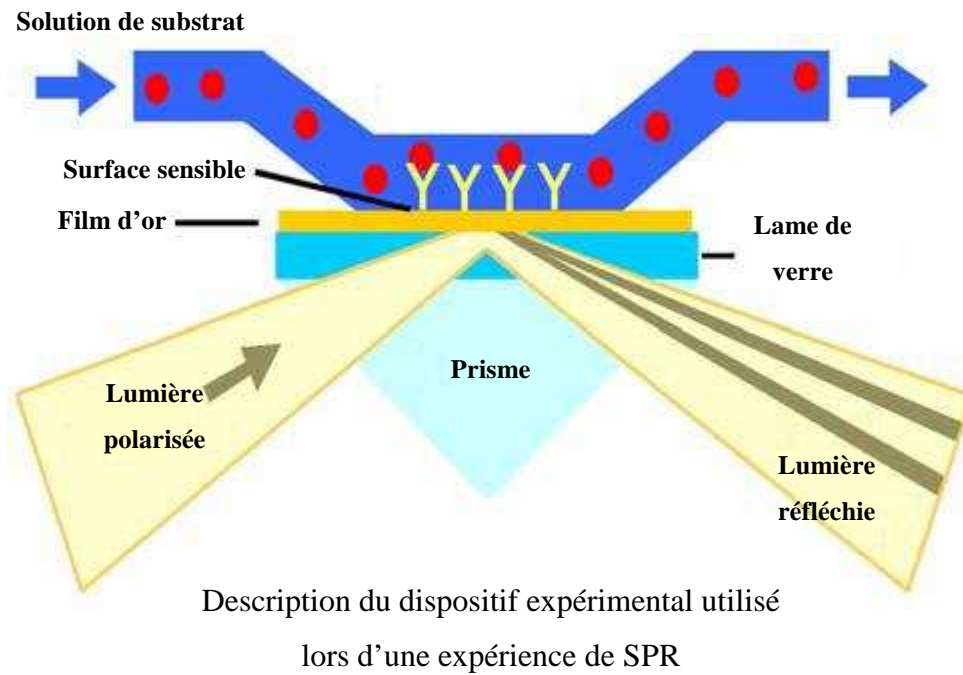
Spectre RMN (SEP-MAS)

XG_{REC}¹³C/CB¹²CT₁ = 0,5 s

Superposition de spectres obtenus avec

T₁ = 2 s (noir) et T₁ = 0,5 s (rouge)

Annexe 14 : Principe de la Résonance Plasmonique de Surface (SPR)



Expérience de SPR montrant la réponse optique en fonction du temps

Je n'ai pas cru bon de vous faire part de cette citation en exergue, afin de ne pas décourager le potentiel lecteur dès la première page. Ne pouvant néanmoins pas passer outre, c'est donc pour récompenser le lecteur courageux que je vous fais part de cette savoureuse réflexion :

" La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! "

Albert Einstein

Hydrolyses et Synthèse chimio-enzymatiques appliquées à la préparation de xylogluco-oligosaccharides pour l'étude des interactions xyloglucanes-cellulose

Le réseau xyloglucanes-cellulose est la structure portante de la paroi primaire des cellules végétales chez les plantes supérieures. Les interactions entre ces deux polysaccharides ont été examinées lors de travaux antérieurs, mais le manque de substrats parfaitement caractérisés limite ces études.

La préparation d'une gamme de xylogluco-oligosaccharides branchés complexes par synthèse chimio-enzymatique, utilisant la glycosynthase Cel7B E197A, associée à des xyloglucanes naturels obtenus par extraction et hydrolyse enzymatique, a permis l'étude de l'influence de nombreuses caractéristiques structurales de ces hémicelluloses, sur leur capacité d'interaction avec la cellulose.

Afin d'évaluer l'impact de ces paramètres, plusieurs techniques ont été mise en œuvre. La détermination d'isothermes d'adsorption a illustré une amélioration de la capacité d'adsorption par augmentation de la masse molaire et une taille critique, à partir de laquelle l'adsorption est significative. Les résidus galactosyle et xylosyle n'ont pas montré de conséquences majeures sur ces interactions contrairement aux résidus fucosyle qui semblent favorables, bien que la variation de répartition des ramifications puisse également être en jeu. La titration calorimétrique isotherme a montré la présence de deux types de sites identifiés comme : (i) site de surface exothermique et (ii) site endothermique localisé au niveau des rainures de la cellulose, dans le cas des substrats de faible masse molaire ou à l'auto-association dans le cas des xyloglucanes natifs. Enfin, une analyse RMN du solide de composites xyloglucanes-cellulose de contraste isotopique variable a mis en évidence la conservation de la grande mobilité des chaînes latérales après adsorption ainsi qu'une absence de modification conformationnelle des signaux relatifs aux chaînes de surface de la cellulose.

Mots clés : xyloglucanes, cellulose, interactions, synthèse chimio-enzymatique, glycosynthase, isothermes d'adsorption, ITC, RMN

Hydrolysis and chemo-enzymatic Synthesis to prepare xylogluco-oligosaccharides for study of xyloglucans-cellulose interactions

Xyloglucans-cellulose network is the load-bearing structure of the high plant primary cell wall. Physical chemistry studies of their interactions require well characterized substrates which remain a challenge.

Preparation of a range of well defined complex branched xylogluco-oligosaccharides was carried out by chemo-enzymatic synthesis including the use of the glycosynthase Cel7B E197A. Together with xyloglucans obtained by extraction and hydrolysis, these substrates enabled to examine the influence of different structural parameters of these hemicelluloses on their interaction capacity toward cellulose.

In order to evaluate impact of these parameters, several techniques were used. Determination of adsorption isotherms illustrated the improvement of adsorption capacity with larger molecular weight chains, prone to loop formation, and a critical size, from which adsorption is significant. Moreover, when short flexible side chains extended from simple xylosyl residue to longer xylosyl- β -1,2-galactosyl branches no significant changes were observed while further fucosylation did correlate with an improved affinity as far as the branches distribution did not interfere.

Based on an isothermal titration calorimetry approach two affinity sites with minor thermal effects were tentatively identified as: (i) readily accessible exothermal surface sites and (ii) endothermal sites of lower accessibility in slit porosity of cellulose for lower molecular weight substrates, and as self association for native fractions.

In addition, a solid state NMR investigation, taking advantage of enrichment or depletion in ^{13}C , underlined the conserved higher mobility of longer side chains even after adsorption. Optimal length of XGs adsorbed train was also determined. Any barely detectable changes in cellulosic surface chains conformations were observed.

Key words: xyloglucan, cellulose, interactions, chemo-enzymatic synthesis, glycosynthase, adsorption isotherm, ITC, NMR