

# Modification et dégradation enzymatique de polysaccharides: investigation par imagerie et diffusion de rayonnement

Ilham Mkedder

#### ▶ To cite this version:

Ilham M<br/>kedder. Modification et dégradation enzymatique de polysaccharides: investigation par imagerie et diffusion de rayonnement. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT: 2012 GRENV031. tel-00770180

# HAL Id: tel-00770180 https://theses.hal.science/tel-00770180

Submitted on 4 Jan 2013

**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 DE GRENOBLE

# **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

# DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Chimie des polymères

Arrêté ministériel: 7 août 2006

Présentée par

#### « Ilham MKEDDER »

Thèse dirigée par « **Redouane BORSALI** » Co encadrée par « **Frédéric DUBREUIL**»

Préparée au sein du Centre de Recherches sur Les Macromolécules Végétales (CERMAV), CNRS Dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

# Modification et Dégradation Enzymatique de polysaccharides : Investigation par Imagerie et Diffusion de Rayonnement

Thèse soutenue publiquement le « 15 Novembre 2012 », devant le jury composé de :

#### **Monsieur Laurent BILLON**

Professeur, Université de Pau, Président

**Monsieur Laurent DAVID** 

Professeur, Université de Lyon, Rapporteur

#### **Madame Fouzia BOULMEDAIS**

Chargé de Recherches, ICS, Strasbourg, Rapporteur

#### Monsieur Claude VERDIER

Directeur de Recherches, LIPHY, Grenoble, Examinateur

#### Monsieur Frédéric DUBREUIL

Maitre de Conférences, Université de Grenoble, Invité

#### Monsieur Redouane BORSALI

Directeur de Recherches, CERMAV, Grenoble, Directeur de thèse

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France / Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP



## **Remerciements**

Ce travail a été effectué au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales associé à l'Université Joseph Fourier de Grenoble dirigé par Monsieur Redouane BORSALI, Directeur de Recherche au CNRS. Je tiens à le remercier vivement pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et son équipe « Physico-chimie des glycopolymères ».

Mes vifs remerciements au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien, pour la bourse qui a rendu possible la réalisation de cette thèse.

J'adresse ensuite toute ma reconnaissance à Monsieur Laurent BILLON pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, Monsieur Laurent DAVID ainsi qu'à Madame Fouzia BOULMEDAIS pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Leurs remarques et suggestions m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité de mon rapport. Je remercie également Monsieur Claude VERDIER pour sa participation à mon jury de thèse et ses remarques pertinentes lors de la discussion.

Je remercie Monsieur Abdeslam TALEB, Vice-recteur responsable des formations de postgraduation à l'Université Abou Bekr BELKAID de Tlemcen pour sa présence au cours de ma soutenance.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements et ma reconnaissance à mes directeurs de thèse Messieurs Redouane BORSALI et Frédéric DUBREUIL, qui ont su me faire profiter chacun à leur façon de leurs nombreuses compétences et leur disponibilité dont ils ont pu faire preuve malgré leurs emplois du temps surchargés.

Un grand merci à Madame Sonia ORTEGA, Messieurs Sami HALILA et Christophe TRAVELET pour leurs conseils constructifs et pour leur disponibilité à chaque fois que j'ai eu à solliciter leurs compétences.

Je désire témoigner ma gratitude aux personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce travail de thèse de près ou de loin, notamment Amandine DURAND TERRASSON, Eric BAYMA, Isabelle JEACOMINE, et Laurine BUON.

Tous mes remerciements à Monsieur Kebir BOUCHERIT et Madame Zahia BOUCHERIT, Professeurs à l'Université Abou Bekr BELKAID de Tlemcen pour leurs conseils et encouragements durant mon séjour en France. Merci infiniment.

Je remercie Halima LAIB pour son soutien et son amitié, ainsi que toutes les personnes du CERMAV, chercheurs, ITA, étudiants en particulier les membres de l'équipe « Physicochimie des Glycopolymères », pour leur aide, leurs encouragements et leur bonne humeur de tous les jours.

Je tiens à remercier tous les membres de ma famille, merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi, ainsi que tous mes amis en France et en Algérie sans préciser les noms afin de n'oublier personne pour leurs encouragements, leur participation d'une façon ou d'une autre et pour les moments extraordinaires inoubliables.

#### Résumé

Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans le domaine de la chimie et physico-chimie des polysaccharides. Une étude des propriétés physico-chimiques du xyloglucane en fonction de différentes conditions est d'abord réalisée, elle montre la difficulté d'obtenir des solutions stables à l'échelle moléculaire ainsi que la possibilité d'obtenir des nanoparticules à base de xyloglucane. Le suivi de l'hydrolyse enzymatique du xyloglucane en solution par la diffusion de la lumière a mis en évidence l'agrégation des produits obtenus en solution. L'imagerie par la microscopie à force atomique a révélé l'importance de la surface dans le phénomène de dégradation. Enfin des dérivés de xyloglucane ont été obtenus par oxydation via le système TEMPO/NaOCl/NaBr, et des essais de préparation de conjugués xyloglucane-cytarabine ont été effectués.

#### **ABSTRACT**

The work presented in this manuscript is in the field of chemistry and physical chemistry of polysaccharides. A study of the physicochemical properties of xyloglucan under different conditions is carried around and showing the difficulty of obtaining stable solutions at the molecular level. The study also evidenced the possibility of obtaining nanoparticles based on xyloglucan. Monitoring of the enzymatic hydrolysis of xyloglucan in solution by light scattering indicated the aggregation of the degradation products. Imaging by atomic force microscopy revealed the importance of the surface in the degradation phenomenon. Finally xyloglucan derivatives were obtained by oxidation system TEMPO / NaOCl / NaBr, and test on the coupling of xyloglucan and cytarabine conjugates were made.

# Sommaire

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
Xyloglucane de graines de tamarin	4
I.1.Introduction	4
I.1.1.Paroi primaire	5
a) Pectines	5
b) Cellulose	6
c) Hémicelluloses	6
Les xylanes	6
• Les mannanes	7
• Les β-glucanes	7
• Les xyloglucanes (XG)	7
I.2.les Xyloglucanes	7
I.2.1.Isolation du xyloglucane de <i>Tamarindus indica</i>	8
I.2.2. Structure et propriétés du xyloglucan de tamarin	9
I.2.3. Biosynthèse de xyloglucane	12
I.2.4. Biodégradation de xyloglucane	13
Mécanisme d'action des endoglucanases	15
Mécanisme d'inversion de configuration	15
Mécanisme de rétention de configuration	16
I.2.5. Applications	17
METHODES DE CARACTERISATION DES POLYSACCHARIDES	
II.1.Diffusion de la lumière	21
II.1.1.Principe	21
II.1.2.Diffusion de la lumière élastique ou statique	23
Exploitation des résultats de la diffusion statique de la lumière	24
II.1.3. Diffusion dynamique de la lumière	25

Exploitation des résultats de la diffusion dynamique de la lumière	26
Cas des particules monodisperses	27
Méthode d'analyse des cumulants	27
Méthode d'analyse CONTIN	28
II.2. Microscopie à force atomique (AFM)	30
II.2.1.Principe	30
II.2.2. Les modes de mesures	32
a) Les modes statiques	32
Le mode contact	32
b) Les modes dynamiques	34
Le mode non-contact	34
Le mode tapping ou oscillant	34
II.2.3. La préparation des échantillons	35
II.2.4. Méthodes de dépôt	35
a) Méthode de dépôt par goutte	36
b) Méthode de dépôt par adsorption	36
c) Méthode de dépôt par spin coating	37
II.2.5. AFM en air et en liquide	38
II.2.6. Levier et pointe	39
II.2.7. AFM et polysaccharides	40
II.3. Microscopie électronique à transmission (TEM)	42
II.4. Chromatographie sur gel perméable (GPC)	44
II.5. Viscosimétrie	46
CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU XYLOGLUCANE	
III.1. Caractérisation physico-chimique en fonction de différentes conditions de solu	ubilisation
III.1.1.Configuration expérimentale	52

III.1.2.Les résultats obtenus.	53
III.1.3.Conclusion.	57
III.2.Etude de propriétés physico-chimiques de xyloglucane en présence de nitrit	te de sodium
(0.1M)	
III.2.1.Diffusion statique de la lumière (SLS)	60
III.2.2.Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	61
a) En fonction de la concentration NaNO <sub>2</sub>	61
b) En fonction de la concentration en xyloglucane	62
III.3. Microscopie à force atomique (AFM)	65
III.3.1. Préparation des échantillons et imagerie	65
III.3.2. Les résultats obtenus	66
a) Influence de la concentration	66
b) Influence de la technique de dépôt	69
c) Influence de substrat	69
d) En présence de nitrite de sodium	71
III.4. Microscopie électronique en transmission (TEM)	73
III.4.1. Prétraitement des grilles carbonées	73
III.4.2. La coloration négative	73
III.5.Conclusion	74
HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU XYLOGLUCANE	
IV.1. Etude de l'hydrolyse enzymatique par viscosimétrie capillaire	
IV.2. Diffusion de la lumière	78
IV.2.1. Etude de l'hydrolyse enzymatique en fonction de concentration en XC	G80
IV.2.2. Etude de l'hydrolyse enzymatique en fonction de température	81
IV.3. Microscopie à force atomique	
IV.3.1. Suivi direct de l'hydrolyse enzymatique	83
IV.3.2. Incubation des surfaces avec la cellulase	85
IV.3.3. Incubation des solutions	86
IV.3.4. Hydrolyse enzymatique des NP-XG	88

MODIFICATIONS CHIMIQUES DU XYLOGLUCANE	•••••
V. Oxydation sélective des alcools primaires par TEMPO	92
V.1. Le 2, 2, 6, 6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle (TEMPO)	92
V.2.Mécanisme de l'oxydation	93
V.3. l'oxydation de xyloglucane	95
V.3.1.Caractérisation du xyloglucane oxydé	95
a) spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)	95
b) Résonance magnétique nucléaire (RMN)	96
c) Résultats obtenus	96
V.3.2.Détermination de degré d'oxydation (DO)	98
V.4.Le couplage avec des amines	100
V.4.1. Mécanisme de couplage avec les amines	100
V.4.2. La cytarabine	101
V.4.3. Essai de couplage du xyloglucane avec la cytarabine	103
V.5.Conclusion	105
CONCLUSION GENERALE	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

# Liste des figures

<u>Chapitre I</u>
Figure I -1 : la paroi cellulaire des végétaux
Figure I -2 : Fruits du tamarinier
Figure I -3 : Unité répétitive du xyloglucane issu de graines de tamarin
Figure I -4 : Oligosaccharides du xyloglucane
Figure I -5 : biosynthèse du xyloglucane
Figure I -6 : biodégradation du xyloglucane
Figure I -7 : mécanisme d'inversion de configuration
Figure I -8 : mécanisme de rétention de configuration
Chapitre II
Figure II -1 : Principe de la diffusion de la lumière
Figure II -2 : Principe de la diffusion dynamique de la lumière
Figure II -3 : Principe de fonctionnement d'un AFM
Figure II -4 : Forces d'interaction pointe-échantillon
Figure II-5 : Forces de capillarité existantes entre la pointe et la surface
Figure II -7 : Principe de la méthode de l'adsorption
Figure II -8 : Principe de la méthode d'enduction centrifuge
Figure II -9: Images d'un levier et d'une pointe
Figure II -10 : Image AFM de xanthane déposé sur le mica
Figure II -11 : Images AFM de succinoglucane déposé sur mica
Figure II -12 : Microscope électronique en transmission
Figure II -13 : Représentation schématique d'un appareillage de GPC
Figure II -14 : Principe de la chromatographie de perméation de gel
Figure II -15 : Viscosimètre capillaire (Cannon-Ubblohde)
Chapitre III
Figure III-1 : Fonctions d'autocorrélation C (q, t) et distributions des temps de relaxation A (t) obtenues pour des solutions du xyloglucane préparées dans : DMAc/LiCl et DMSO
Figure III-2 : Fonctions d'autocorrélation C (q, t) et distributions des temps de relaxation A(t) obtenues pour des solutions du xyloglucane préparées dans : NaOH; Eau et NaNO <sub>2</sub>
Figure III-3 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du xyloglucane préparé dans le nitrite de sodium 58
Figure III-4 : Diagramme de Zimm du xyloglucane préparé dans le nitrite de sodium 61

Figure III-5 : Fonctions de distribution des temps de relaxation obtenues pour des analyses de (DLS) pour différentes concentrations en $NaNO_2$
Figure III-6 : Fonctions de distribution des temps de relaxation obtenues pour des analyses de (DLS) pour différentes concentrations en xyloglucane
Figure III-7 : Fréquences de relaxation $(1/\tau)$ en fonctions de $q^2$
Figure III-8 : Evolution du rayon hydrodynamique en fonction de concentration du xyloglucane
Figure III-9 : Image AFM de la topographie de xyloglucane (100 mg/l) déposé sur le mica en utilisant la méthode de la goutte
Figure III-10 : Images AFM de topographie du xyloglucane déposé sur le mica selon la méthode de la goutte
Figure III-11 : Image AFM de topographie du xyloglucane déposé sur le mica selon la méthode d'adsorption
Figure III-12 : Image AFM de topographie du xyloglucane déposé sur le silicium selon la méthode de la goutte
Figure III-13 : Image AFM de topographie du xyloglucane préparé dans NaNO <sub>2</sub> (0.1M) et déposé sur le silicium selon la méthode de la goutte
Figure III-14 : Image TEM obtenue pour le xyloglucane préparé dans le nitrite sodium (0.1M)
<u>Chapitre IV</u>
Figure IV-1 : variations de la viscosité spécifique ( $\eta_{sp}$ ) en fonction de temps d'incubation du
β-1-4-endoglucanase
Figure IV-2 : Chromatogramme représentant la fraction pondérale différentielle en fonction
de la masse molaire
Figure IV-3: Variations de l'intensité de diffusion (I) en fonction de temps d'incubation du xyloglucane avec $\beta$ -1-4-endoglucanese mesurées par (DLS)79
Figure IV-4 : variations de (I/C) en fonction de temps d'incubation en présence de différentes concentrations du xyloglucane
Figure IV-5 : Variations de l'intensité de diffusion (I) en fonction de temps d'incubation (t) mesurées par (DLS) à différentes températures

Figure IV-6 : Images AFM de topographie de la dégradation de XG par la cellulase suivie directement dans l'eau
Figure IV-7 : Images AFM de topographie de XG déposé sur silicium et incubées avec β-1-4-endoglucanase
Figure IV-8 : Images AFM de topographie d'une solution de XG incubées avec β-1-4-endoglucanase
Figure IV-9 : Hydrolyse enzymatique des nanoparticules à base de xyloglucane par la $\beta$ -1-4-endoglucanese
Chapitre V
Figure V-1 : Oxydoréduction du radical nitroxyde TEMPO
Figure V-2 : Mécanisme de l'oxydation par le système TEMPO
Figure V-3 : Spectre infrarouge du xyloglucane non modifié
Figure V-4 : Spectre infrarouge du xyloglucane oxydé
Figure V-5 : Spectre RMN <sup>13</sup> C de xyloglucane : original et oxydé98
Figure V-6 : Courbe de dosage conductimétrique d'un échantillon oxydé
Figure V-7 : Mécanisme de couplage avec les carbodiimides
Figure V-8 : Réarrangement de l'intermédiaire O-acylurée
Figure V-9 : Activation de l'O-acylurée par le N-hydrosuccinimide
Figure V-10 : Structure de la cytarabine
Figure V-11 : Spectre infrarouge obtenu après un essai de couplage
Figure V-12 : Spectre RMN <sup>1</sup> H obtenu après un essai de couplage

## Liste des tableaux

$\alpha$ 1	• ,	TTT
( ha	pitre	111
CIIu	pruc	111

Tableau III-1 : Résultats obtenus en chromatographie de gel de perméation
Tableau III-2 : Variation de rayon hydrodynamique en fonction de la concentration en NaNO <sub>2</sub>
Tableau III-3: Variation de rayon hydrodynamique en fonction de la concentration en xyloglucane
<u>Chapitre IV</u> Tableau IV-1 : Résultats obtenus en chromatographie de gel de perméation avant et après hydrolyse du xyloglucane par la cellulase
Tableau IV-2 : Variations de rayon hydrodynamique au cours de la dégradation enzymatique mesurées par DLS
<u>Chapitre V</u> Tableau V-1 : Attribution des principales bandes observées sur le spectre infrarouge pour le xyloglucane non modifié

#### **ABREVIATIONS**

#### **Produits chimiques**

DMSO Diméthylsulfoxyde

DMAc Diméthylacétamide

D<sub>2</sub>O Oxyde de deutérium

DDC Dicylohexyl-carbodiimide

EDAC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochlorure

EDTA Acide ethylène diamine tétra-acétique

HCl Acide chlorhydrique

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Acide phosphorique

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Acide sulfurique

KOH Hydroxyde de potassium

KBr Bromure de potassium

KCl Chlorure de potassium

LiCl Chlorure de lithium

NaBr Bromure de sodium

NaOCl Sodium hypochlorite

NaNO<sub>2</sub> Nitrite de sodium

NaBH<sub>4</sub> Sodium borohydride

NHS N-hydroxysuccinimide

NaN<sub>3</sub> Sodium azide

NaNO<sub>3</sub> Nitrate de sodium

NaOBr Hypobromite de sodium

NaOH Hydroxyde de sodium

TEMPO 2, 2, 6, 6-Tétraméthylpipéridine-1-Oxyle

#### **Polysaccharides**

Fuc Fucose

Gal Galactose

Glc Glucose

XG Xyloglucane

Xyl Xylose

#### **Techniques**

AFM Atomic Force Microscopy (microscopie à force atomique)

DLS Dynamic Light Scattering (diffusion dynamique de la lumière)

FTIR Spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier

GPC Chromatographie sur gel perméable

MALS Diffusion de la lumière multi-angle

RMN Résonance magnétique nucléaire

SEC Chromatographie d'exclusion stérique

SLS Static Light Scattering (diffusion statique de la lumière)

TEM Transmission Electron Microscopy (microscopie électronique en transmission)

#### Diffusion de la lumière

A<sub>2</sub> Second coefficient du viriel

A (t) Distribution de temps de relaxation

D Coefficient de la diffusion

K<sub>d</sub> Vecteur d'onde diffusée

K<sub>i</sub> Vecteur d'onde incidente

g<sup>(1)</sup> (q, t) Fonction d'autocorrélation du champ électrique

g<sup>(2)</sup> (q, t) Fonction d'autocorrélation de l'intensité

I Intensité de la lumière diffusée

K<sub>B</sub> Constante de Boltzmann

P (q) Facteur de forme

P (S) Facteur de structure

q Vecteur de diffusion

R(q) Facteur de Rayleigh

 $\theta$  Angle de diffusion

Γ Fréquence de relaxation

τ Temps de corrélation inter- et/ou intramoléculaire

# Caractérisation des polymères

C Concentration

dn/dc Accroissement de l'indice de réfraction avec la concentration

DO Degré d'oxydation

m Masse

Mw Masse molaire moyenne

n Nombre de moles

R<sub>h</sub> Rayon hydrodynamique

R<sub>g</sub> Rayon de giration

η Viscosité

 $\eta_{rel}$  Viscosité réelle

 $\eta_{red}$  Viscosité réduite

 $\eta_{sp}$  Viscosité spécifique

# **Divers**

ADN Acide désoxyribonucléique

ARN Acide ribonucléique

Ara C Arabinofuranosyl cytidine

Ara U 1-B- D arabinofuranosyluracile

Eq Nombre d'équivalent

K Constante de raideur

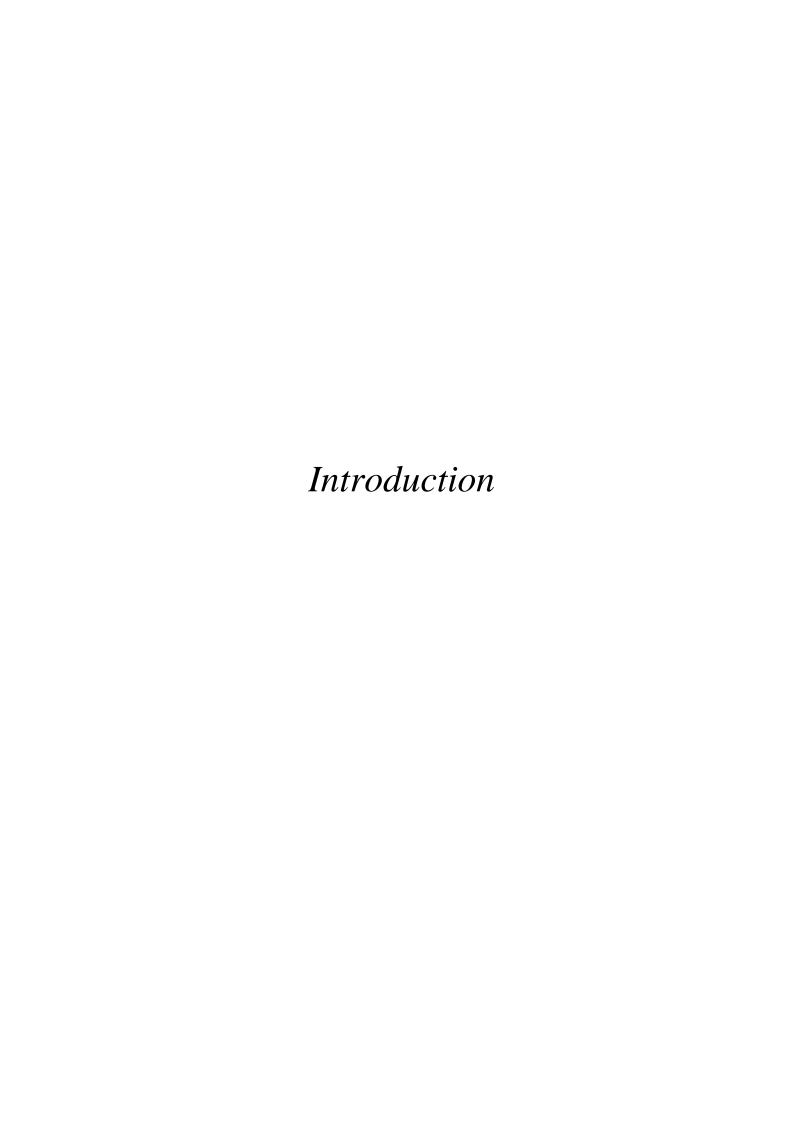
pH Potentiel hydrogène

ppm Parties Par Million

rpm Revolution per minute ( Tour par minute)

T Température

t Temps



## Introduction

Au cours de ces dernières années, l'utilisation des polymères naturels et de leurs dérivés s'accroit dans de très nombreux domaines dans un souci de développement des ressources renouvelables et des procédés de chimie verte. Ils sont regroupés en trois grandes classes : les protéines, les élastomères hydrocarbonés et les polysaccharides.

Ces derniers sont les plus populaires pour la préparation de matériaux (nanoparticules, films, membranes ...). Ils sont biodégradables, biocompatibles, et leur coût de production est généralement faible.

Les polysaccharides sont des polymères constitués d'un enchainement de molécules dont les unités structurales de base sont des monomères de sucres. Ils sont généralement d'origine naturelle, végétale ou animale, les polysaccharides d'origine végétale étant les plus valorisés.

Les polysaccharides peuvent être chargés ou neutres, l'existence de charges leur confère des propriétés physico-chimiques remarquables qui donnent lieu à de nombreuses applications dans les domaines de l'agro-alimentaire, de la médecine, des cosmétiques ...

L'étude des propriétés physico-chimiques de polysaccharides est très importante, et constitue l'une des thématiques de ces travaux de thèse réalisés au sein du Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) à Grenoble, ce laboratoire est bien connu par son intérêt dans l'étude des carbohydrates surtout d'origine végétale (sucres, oligo- et polysaccharides, glycopolymères et glycomatériaux), leur synthèse in vivo et in vitro, l'étude de leur physico-chimie, leurs fonctions et applications dans divers domaines.

Le manuscrit est divisé en 5 chapitres; le premier chapitre est une brève synthèse bibliographique donnant un aperçu des caractéristiques du xyloglucane à savoir ses origines,

# Introduction

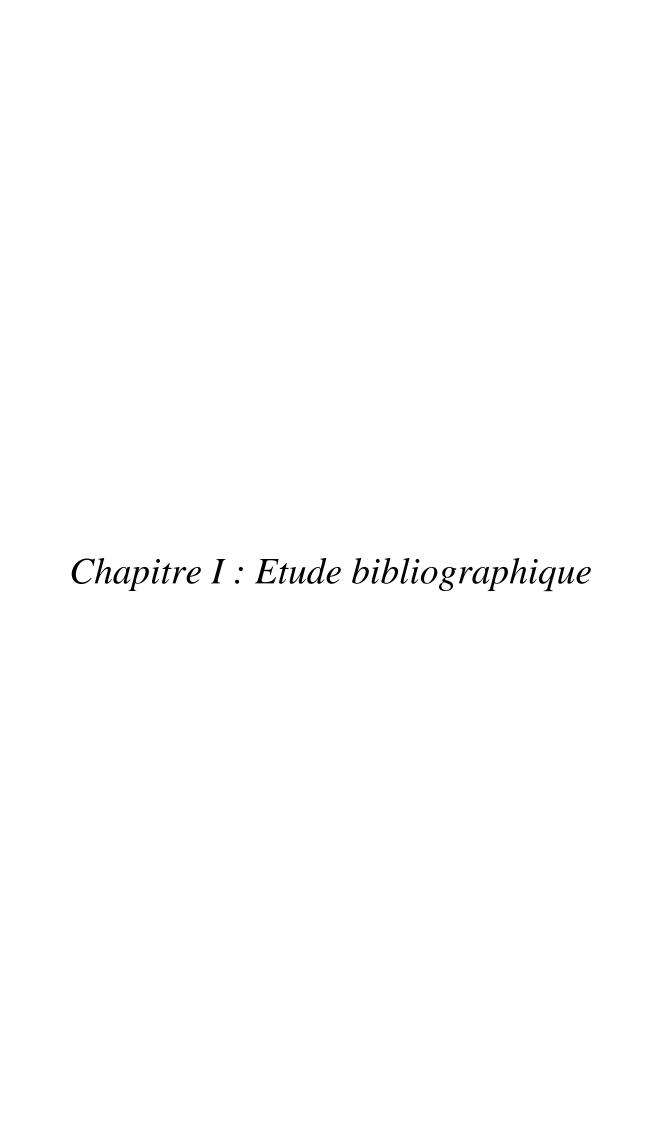
ses propriétés en solution, sa biodégradation et sa biosynthèse, ainsi que ses diverses applications.

Le deuxième chapitre expose les différentes techniques utilisées au cours de ce travail, nous avons utilisé principalement la diffusion dynamique de la lumière (statique et dynamique) et la microscopie à force atomique (AFM), mais nous avons également fait appel à d'autres techniques d'analyse classiques des polymères telles que la viscosimétrie, la chromatographie de perméation sur gel (GPC) et la microscopie électronique en transmission (MET).

Le troisième chapitre est relatif à l'étude des propriétés physico-chimique du polysaccharide en solution mais aussi en surface.

Le quatrième chapitre est consacré au suivi de l'hydrolyse enzymatique du xyloglucane par l'endoglucanase issue de *Trichoderma reesei* par diffusion de la lumière et microscopie à force atomique.

Enfin le dernier chapitre traitera la modification chimique du xyloglucane par oxydation, et les essais de couplage avec la cytarabine.



Dans cette partie nous présentons le polysaccharide utilisé dans ces travaux de thèse.

# Xyloglucane de graines de tamarin

#### I.1. Introduction

Les cellules végétales diffèrent des cellules animales par la présence d'une structure extracellulaire organisée et complexe, semi rigide et dynamique entourant la membrane plasmique appelée la paroi cellulaire.

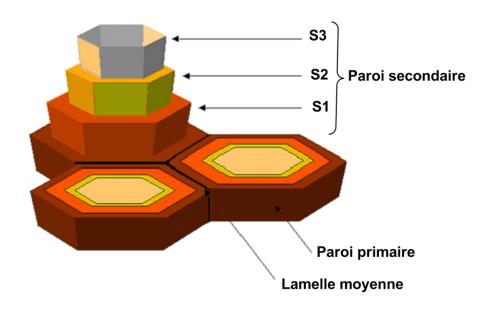


Figure I-1: La paroi cellulaire des végétaux

La paroi joue un rôle structural, elle détermine la forme et les caractéristiques structurales de la cellule, participe à la croissance des tissus et assure un rôle de barrière qui permet aux cellules de résister à la pression osmotique et aux attaques des pathogènes. La paroi se présente sous la forme d'un empilement de couches (**Figure I-1**) dont la plus externe est la lamelle moyenne, de nature amorphe contenant essentiellement de composés pectiques et assure la cohésion

cellulaire. Les couches internes appelées paroi primaire et paroi secondaire, sont composées de polysaccharides variés, de protéines et certaines (parois secondaires) contiennent de la lignine. La paroi secondaire présente trois couches successives, S1, S2 et S3, se distinguant par l'orientation de leurs fibres de cellulose et conférant une grande résistance à la paroi.

#### I.1.1. Paroi primaire

Toutes les cellules comportent une paroi dite primaire, la plupart des plantes contiennent des parois primaires de Type I et certaines espèces végétales de grande importance économique (le mais, le ble, le sorgho, l'orge, le riz,), qui appartiennent a l'ordre des *Poales*, famille des *Poaceae (Gramineae)*, possèdent un type de paroi primaire avec une composition particulière, appelée paroi de Type II, elles diffèrent des parois de Type I par leur contenu élevé en glucuronoarabinoxylanes (une hemicellulose qui n'est habituellement présente que dans les parois secondaires) par leur faible contenu en pectines et par la présence de composés aromatiques <sup>1</sup>.

Les constituants majoritaires de la paroi I sont : les pectines, la cellulose et les hémicelluloses.

#### a) Pectines

Les substances pectiques sont présentes dans tous les végétaux, localisées dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules où elles sont associées à d'autres composants chimiques membranaires tels que cellulose et les hémicelluloses.

La structure chimique consiste en un enchainement linéaire de résidus de l'acide galacturonique liés en  $\alpha$  (1-4) qui peuvent être intercalés par des molécules de rhamnoses. Des ramifications, principalement constituées par de courtes chaînes latérales de sucres neutres (galactanes, arabanes, xylanes...), sont rattachées à la chaîne principale. En raison de leur capacité de s'associer par l'intermédiaire des ions calcium (Ca<sup>2+</sup>), les pectines jouent un rôle capital dans

l'architecture de la paroi ou elles assurent sa rigidité, permettent l'adhésion cellulaire et participent au métabolisme cellulaire <sup>2</sup>.

#### b) Cellulose

La cellulose est la molécule la plus abondante dans la nature  $^3$  c'est le principal constituant de la paroi cellulaire des végétaux où elle s'organise sous la forme des microfibrilles, au niveau de la paroi primaire. Ces microfibrilles n'ont pas d'orientation préférentielle et sont enrobées dans une matrice d'hémicelluloses et de pectines ce qui confère à cette assise une architecture fibrillaire relativement lâche. Chimiquement la cellulose est un homopolysaccharide linéaire formé par l'enchainement des résidus de D-glucose reliés entre eux par des liaisons osidiques de type  $\beta$  (1-4)  $^{4,5}$ .

#### c) Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polymères amorphes, constitués de pentoses ou d'hexoses mixtes de sucres neutres (xylose, arabinose, mannose, galactose, glucose) et d'acides uroniques (l'acide glucuronique et l'acide 4-O-méthyl glucuronique), essentiellement. Elles représentent 15 à 40% de la matière végétale, et peuvent avoir un rôle structural et de réserve<sup>6</sup>.

Structurellement, les hémicelluloses sont définies comme des polysaccharides dont la chaîne principale est généralement constituée par un seul monosaccharide sur lequel vient se greffer d'autres sucres. Les hémicelluloses sont classés en quatre grands groupes :

 Les xylanes: qui sont les hémicelluloses principales des parois secondaires, et regroupent; les glucuronoxylanes où des résidus soit d'acide glucuronique soit de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique sont greffés sur le xylose de la chaine principale.
 Les arabinoxylanes où les résidus xylose sont substitués par des résidus arabinose, les glucuronoarabinoxylanes qui ont un squelette de résidus xylose sur lequel se greffent des résidus arabinose et acide glucuronique <sup>7,8</sup>.

- Les mannanes : qui sont constitués par un squelette de mannopyranose reliés entre eux par des liaisons glycosidiques β (1,4) et qui sont substitués par des résidus de galactopyranose (galactomannane).Dans les glucomannanes les résidus mannose sont intercalés par des résidus glucose<sup>9</sup>.
- Les β-glucanes: qui sont constitués par des résidus glucose reliés par des liaisons β,les
   liaisons peuvent être β 1-3, β 1-4 ou β 1-6.
- Les xyloglucanes (XG): sont les hémicelluloses majeures de la paroi primaire des dicotylédones, des conifères et d'environ la moitié des monocotylédones. En formant un réseau avec la cellulose, ils stabilisent la paroi végétale. Les XG sont formés d'une chaine principale d'unités D-glucopyranose liées en β-1,4 et qui peuvent être substitués par d'autres mono, di ou trisaccharides.

#### I.2. Les xyloglucanes

Les xyloglucanes forment une classe importante de polysaccharides structuraux : ce sont des hétéropolysaccharides hémicellulosiques retrouvés dans la paroi primaire des plantes supérieures. Ils couvrent et relient les microfibrilles de cellulose avec lesquelles ils forment un réseau jouant un rôle clé dans la stabilité des parois.

Ils représentent environ 20-25% du poids sec de la paroi primaire chez les dicotylédones angiospermes, le pourcentage de XG dans la paroi et sa structure varie selon la plante considérée <sup>10, 11</sup>.

Les xyloglucanes sont extraits à partir de différentes sources comme les graines de tamarin, graines de doussié (*Afzelia africana*), graines de courbaril (*Hymenaea courbaril*), parois cellulaires de baie de raisin, coques de graine de colza, fibres de coton, les graines de tamarin (*Tamarindus indica*) <sup>12-21</sup>.

Parmi ces derniers, le xyloglucane obtenu de graines de tamarind (Figure I-2) est le plus étudié pour différentes applications commerciales, industrielles et pharmacologiques. Le tamarinier est un arbre de la famille des Fabacées <sup>22</sup>, il pousse dans plus de 50 pays dont les pays asiatiques (l'Inde, Thaïlande), les pays d'Afrique et l'Amérique, un arbre mature peut atteindre une hauteur de 30 m <sup>23</sup>. En Inde le principal producteur environ 3.10<sup>5</sup> tonnes de fruits de tamarin (présentés sur la figure 2) sont produits annuellement. Les graines constituent environ 30-40% du fruit <sup>24</sup>.

#### I.2.1. Isolation du xyloglucane de Tamarindus indica

Plusieurs méthodes d'isolation du xyloglucane des graines de tamarin ont été décrites dans la littérature, telles que les méthodes décrites par Rao <sup>25,26</sup>, les procédures de Kooiman <sup>27</sup> et Savur –Sreenivasan <sup>28</sup>.

Une méthode d'isolation de polysaccharides de graines de tamarin est brevetée aux Etats- Unis par Teraoka et al(1990), elle permet de produire des grandes quantités de polysaccharides à un faible coût. Le processus consiste à pulvériser les graines de tamarin pour former des particules dont la taille est inférieure à 80 microns; les particules sont ensuite dispersées dans un milieu aqueux constitué essentiellement d'eau et de 5-60% (w/w) d'au moins un solvant organique hydrosoluble, la solution est ensuite placée dans un hydrocyclone, la phase solide contenant les polysaccharides est dirigée vers le fond de l'hydrocyclone d'où elles sont rejetées et les autres composants notamment des protéines sont rejetés au sommet de l'hydrocyclone d'où ils sont rejetés <sup>29</sup>.



Figure I-2: Fruits du tamarinier

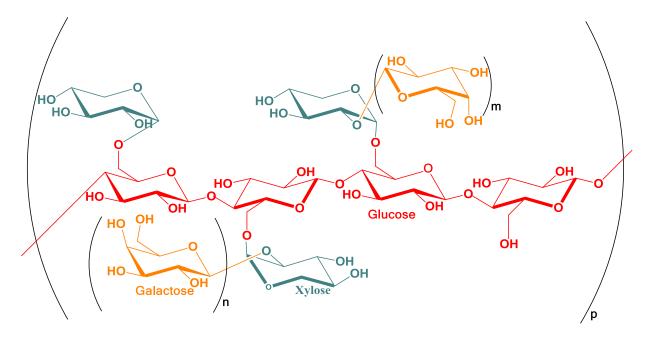
#### I.2.2. Structure et propriétés du xyloglucan de tamarin

Un certain nombre de techniques (FTIR, NMR, XRD, DSC, TGA, SEM, MALDI-TOFMS, test d'ELISA) ont été employées pour déterminer la structure et le comportement des XG issus de graines de Tamarin <sup>30-41</sup>.

La structure de base des xyloglucanes est identique à celle de la cellulose, elle consiste en une chaine principale de résidus D glucopyranosyl liés en  $\beta$  (1-4), celle-ci peut être substituée en position 6 par des mono-, di- ou trisaccharides. La présence de ces ramifications leur confère des propriétés différentes de celle de la cellulose comme l'incapacité à s'organiser en microfibrilles ; les xyloglucanes sont classés selon leur degré de branchement, ainsi on trouve les xyloglucanes de type I ou jusqu'à 75% de résidus glucopyranosyl sont substitués comme le xyloglucane issu de graines de tamarins , les XG de type II contiennent 40-45% de résidus glucopyranosyl substitués et les XG de type III qui ne contiennent que 25-35% de résidus substitués  $^{42}$ .

York et al <sup>43</sup>ont déterminé la structure chimique du xyloglucane de graines de tamarin en obtenant la composition d'un oligosaccharide digéré par une β galactosidase par résonance magnétique nucléaire (NMR) (H¹ et C¹³) et spectrométrie de masse.

Elle consiste en une chaine principale de glucopyranosyl partiellement substitué par des résidus de xylose en position O6, quelques résidus de xylose sont substitués en position O2 par des résidus de D galactose <sup>11</sup> (Figure I-3).



**Figure I-3:** Unité répétitive du xyloglucane issu de graines de tamarin (m = 0 ou 1 ; n = 0 ou 1)

Etant donné la complexité et la variété des molécules de xyloglucanes, Fry et al ont développé une nomenclature pour décrire sans ambiguïté les oligosaccharides des xyloglucanes. Chaque enchainement saccharidique sera ainsi représenté par un code à une lettre : G représente un résidu glucopyranose non substitué de la chaine principale, X représente un résidu glucopyranose substitué en O6 par le xylose, et L représente un résidu glucopyranose substitué en position O6 par une unité xylose elle-même substituée en position O2 par une unité galactose 43-46.

Dans le cas des xyloglucanes fucosylés, F représente un résidu glucopyranose substitué en position O6 par une unité xylose elle-même substituée en position O2 par une unité galactose qui est substitué par le fucose en position O2.

La nature et la substitution des chaines latérales sont variables en fonction de l'espèce considérée, par exemple pour les XG de tamarin qui ne sont pas fucosylés, les différents blocs constitutifs (Figure I-4) sont présents en proportion allant de 9% molaire pour XLXG jusqu'à 50% molaire pour le XLLG, 28% molaire pour XXLG et 13% molaire pour le XXXG 43, 47-49.

Figure I-4: Oligosaccharides du xyloglucane

Le XG est un polysaccharide neutre, soluble dans l'eau, il se caractérise par une viscosité élevée en comparaison à d'autres polysaccharides, sa stabilité à la chaleur, et au pH <sup>50</sup>.

Lang et al ont étudié l'architecture de xyloglucanes issu de graines de tamarin par diffusion de lumière et diffusion aux petits angles des rayons X (SAXS). Les données montrent qu'en solution aqueuse le xyloglucane forme des agrégats, avec un degré de rigidité élevé des particules <sup>34</sup> mais aucune reproductibilité de la masse molaire a été atteint, plusieurs valeurs de masse molaire de xyloglucane issu de tamarin ont été décrites dans la littérature : des valeurs

comprises entre 115 000 et 650 000 g/mole ont été obtenues par GPC <sup>34, 51,52</sup> tandis que des masses allant de 500000 à 880 000 g/mole ont été déterminées en diffusion de la lumière <sup>53</sup>. Ces variations sont due à la force tendance du polysaccharide à l'auto-association en solution.

Il forme un gel à une faible température, en présence d'éthanol, ce ci semble du à l'agrégation aléatoire des chaines de xyloglucane en raison de sa mauvaise solubilité dans l'éthanol <sup>54</sup>. Il peut aussi former des gels en présence d'autres polysaccharides <sup>55</sup>.

La gélation de XG est possible, à des températures élevées lorsque une partie du galactose est éliminée <sup>56</sup>, ainsi la digestion partielle du xyloglucane par une β galactosidase conduit à la formation de gels thermoréversibles, l'élimination d'une grande partie (plus de 35%) des galactoses conduit à une augmentation du degré d'agrégation de polymère en solution et par conséquent à la formation de gels, qui peuvent être employé pour la délivrance des médicaments <sup>57</sup>.

#### I.2.3. Biosynthèse du xyloglucane

Les xyloglucane sont synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi avant d'être déposés sur la paroi cellulaire <sup>58-61</sup>. Les résidus Glc de la chaine principale et les unités Xyl sont assemblés puis les monosaccharides additionnels viennent décorer ces structures <sup>62</sup>. A la sortie de cette chaine d'assemblage les XG sont délivrés au niveau de la membrane par exocytose des vésicules de sécrétion golgiennes pour former une matrice pariétale poreuse assemblée autour des fibres de cellulose.

La synthèse nécessite l'intervention d'un certain nombre d'enzymes (Figure I-5) qui sont des protéines membranaires de type II constituées de trois domaines un domaine N-terminal, un domaine transmembranaire et une extrémité C-terminal comportant le site catalytique de l'enzyme <sup>63</sup>.

La formation de la chaine principale est assurée par une  $\beta$  (1-4) glucane synthase qui catalyse la formation des liaisons osidiques entre des résidus Glc, elle est supposée localisée au niveau de l'appareil de Golgi et spécifique de certaines hémicelluloses <sup>63</sup>. Des résidus Xyl sont ensuite greffés aux résidus Glc par l'intermédiaire des xylosyltransférases. Ces enzymes ont la capacité de former des branchements en  $\alpha(1,6)$  sur le squelette de la chaine linéaire  $\beta(1,4)$  glucane <sup>64</sup>. Les XGs  $\beta$ -galacosyltransférases, permettent ensuite la liaison des résidus Gal sur le Xyl <sup>65</sup> et dans certain type de xyloglucane, des résidus Fuc sont reliés aux résidus Gal sous l'action des XG  $\alpha$  (1,2) fucosyltransférases <sup>61</sup>.

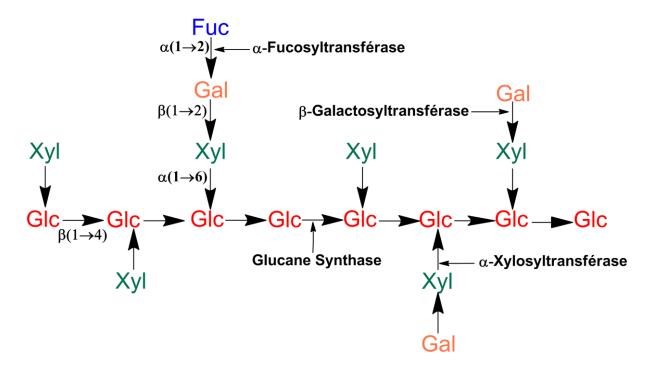


Figure I-5 : Biosynthèse du xyloglucane

#### I.2.4. Biodégradation du xyloglucane

La structure complexe des xyloglucanes leur permet d'être un substrat de choix pour plusieurs enzymes, (Figure I-6). Les modifications enzymatiques peuvent toucher les chaines latérales et /ou la chaine principale <sup>66</sup>. Ces hydrolases agissent principalement sur les xyloglucanes de la paroi primaire, les xyloglucanes sont faiblement présentés au niveau de la paroi secondaire, peu

de données existent sur l'action des enzymes au sein de cette paroi. Les enzymes agissant au niveau des ramifications sont souvent des enzymes spécifiques à chaque résidu monosaccharidique et elles sont toutes localisées au niveau du fluide apoplastique des cellules  $^{67}$ . La  $\beta$ -D-galactosidase hydrolyse les liaisons  $\beta$  (1-2) des résidus Gal terminal d'un  $\beta$  galactoside  $^{68,69}$ , l'élimination des résidus Xyl nécessite l'intervention d'une  $\alpha$ -D-xylosidase, Sampedro *et al.*  $^{70}$  ont identifié le gène codant cette enzyme chez *A. thaliana*.

L'hydrolyse de la chaine principale nécessite l'intervention de la  $\beta$  glucosidase qui catalyse la rupture des liaisons  $\beta$  (1-4) des résidus Glc des XG sans réaliser de transglycosylation, elle n'agit que sur des XGOs ou le Glc terminal non réducteur est libre<sup>71</sup>. Une autre classe d'enzyme est capable d'attaquer la chaine principale des XGs, les endotransglucosylase / hydrolases XTHs qui ont deux activités distinctes : hydrolyse (xyloglucanase ou xyloglucane endo- $\beta$ -(1-4)-glucanase ; XEH) et/ou endo transglycosylation (XET) <sup>72,73</sup>.

Le traitement de xyloglucanes par des cellulases fongiques commerciales, comme celle de *Trichoderma reesei*, permet d'hydrolyser certaines liaisons glucosidiques β- (1,4) et d'obtenir des oligomères dont l'extrémité réductrice est un résidu D-glucosyl non substitué<sup>74</sup>.*Trichoderma reesei* est une véritable usine de production des cellulases, 5 endoglucanases EGs (Cel5A, Cel7B, Cel12A, Cel45A, and Cel61A), et 2 cellubiohydrolases CBHs (Cel6A and Cel7A), ont été identifiées au niveau de ce champignon <sup>75</sup>.

Une nouvelle classe d'enzyme reconnue sous le nom des xyloglucanases spécifiques a été récemment identifiée, les enzymes regroupées dans cette classe sont définies comme étant des enzymes capables d'hydrolyser le xyloglucane au niveau des résidus de glucose substitués, cette famille regroupe la cellulase Cel74A de *Trichoderma reesei* <sup>76</sup>.

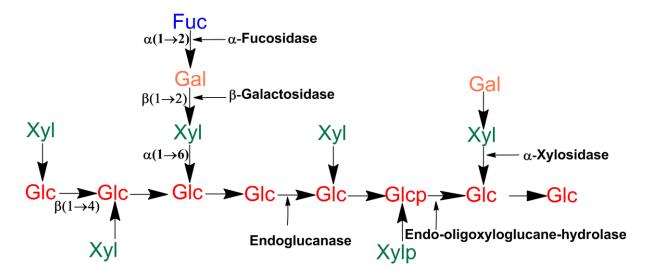


Figure I-6 : Biodégradation de xyloglucane

#### Mécanisme d'action des endoglucanases

Les endoglucanases agissent par coupure des liaisons  $\beta$  (1-4) au niveau des résidus glucose non substitués. L'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques s'effectue selon un mécanisme acide/base <sup>77-79</sup>.la réaction passe par un état de transition du type ion oxocarbenium et elle est gouvernée par deux acides aminés (le plus souvent de type aspartate ou glutamate), l'un jouant le rôle de donneur de proton acide/base, l'autre de nucléophile/base .Les enzymes agissent soit avec un mécanisme de rétention de configuration, en libérant un produit dont la configuration du carbone anomère est identique à celle du substrat, soit avec un mécanisme d'inversion de configuration, en libérant un oligosaccharide de configuration opposée à celle du substrat <sup>80-82</sup>.

#### • Mécanisme d'inversion de configuration

Le mécanisme d'hydrolyse avec inversion de configuration (Figure I-7) se déroule en une seule étape, 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, ce qui conduit donc à un produit de configuration opposée à celle du substrat initial.

Figure I-7: Mécanisme d'inversion de configuration

## • Mécanisme de rétention de configuration

Le mécanisme d'hydrolyse avec rétention ou conservation de configuration (Figure I-8), se déroule en deux étapes, la première consiste en une protonation de l'atome d'oxygène interglycosidique par le résidu acide/base et le départ de l'aglycone assisté par le nucléophile, ce qui conduit à la formation d'un produit intermédiaire un glycosyl-enzyme, ce dernier est hydrolysé par une molécule d'eau lors de la deuxième étape, un produit de même configuration que le substrat initial est ainsi formé.

Si un autre sucre ou une molécule hydroxylée se trouve dans le milieu alors une réaction de transglycosylation entre en compétition avec la réaction d'hydrolyse, pouvant conduire à la formation d'un nouvel oligosaccharide ou d'un glycoside.

Figure I-8 : Mécanisme de rétention de configuration

La différence de deux mécanismes réside dans les modifications structurales au sein du site actif de l'enzyme, notamment au niveau de la distance entre les acides aminés catalytiques, les acides aminés catalytiques d'une enzyme agissant avec rétention de configuration sont distants en moyenne de 5.5Å, alors que ceux d'une enzyme agissant avec inversion de configuration sont distants de 10Å environ. Cette distance plus importante est nécessaire au mécanisme d'inversion, puisqu'une molécule d'eau et le substrat doivent être présents simultanément entre ces deux acides aminés.

Les endoglucanases de *Trichoderma reesei* (Cel5 A, Cel7B, Cel12A) agissent selon le mécanisme de rétention de configuration, Cel45A utilise le mécanisme d'inversion, tandis que le mécanisme d'action de Cel61A reste inconnu pour le moment <sup>83</sup>.

#### I.2.5. Applications

Le xyloglucane dispose d'un large nombre d'applications, que se soit dans le domaine alimentaire ou bien le non alimentaire. Dans les pays asiatiques, le xyloglucane est largement utilisé en tant qu'un agent épaississant, gélifiant ou bien un agent stabilisant :

- a) A des concentrations élevées, le xyloglucane forme des gels comme les pectines, ces gels peuvent être utilisés dans la fabrication des confitures, des gelées, et la production de la mayonnaise <sup>84</sup>. Le xyloglucane assure la stabilité aux chocs thermiques des desserts glacés en évitant la séparation des cristaux de glaces et de sucre sur de longues périodes de conservation, il sert aussi à l'épaississement des sauces <sup>85</sup>.
- b) Il a été largement utilisé dans l'industrie de textile pour modifier les fibres cellulosiques de coton ou de jute (spécialement en Inde) <sup>86-88</sup>, ainsi l'encollage de coton en présence du xyloglucane améliore la résistance du fil pendant le tissage et confère douceur et rigidité au tissu. Ceci peut être le résultat de l'enchevêtrement de la fibre amélioré par les interactions spécifiques xyloglucane-cellulose <sup>85-87</sup>. De plus l'addition de xyloglucane au fils et tissus, suivi par un traitement par les xyloglucanase, avant la teinture permet d'atténuer la couleur et de donner une apparence usée au vêtement <sup>88</sup>.
- c) En papeterie le XG est utilisé comme un agent adhésif, son utilisation pour remplacer l'amidon ou le galactomanane révèle d'une grande importance commerciale en raison de sa disponibilité et son abondance <sup>89</sup>. Le xyloglucane se lie avec une grande affinité aux fibres de la pulpe de papier en suspension aqueuse et améliore la résistance et la répartition des fibres dans la feuille et réduit leur frottement <sup>90-92</sup>.
- **d**) En cosmétique, le xyloglucane est employé en combinaison avec d'autres agents protecteurs comme agent protection contre les irradiations UV. Il offre une bonne hydratation de la peau en association à des aminoacides de type glycine <sup>93-94</sup>, de plus il est utilisé dans la préparation des teintures <sup>95-97</sup>.
- e) Comme tous les polysaccharides, le xyloglucane a attiré l'attention des chercheurs dans les domaines médicaux et pharmacologiques, ses propriétés telles que : haute viscosité, stabilité au pH, la biocompatibilité, caractère muco-adhésif et son caractère hydrophile lui permettent d'avoir de nombreuses applications en ces domaines.

Le XG est un polysaccharide non digestible qui agit comme les fibres diététiques et régule le taux du sucre dans le sang, le xyloglucane a aussi un effet hypolipidemique <sup>98, 99</sup>. Le xyloglucane a des effets antimutagéniques et viraux. Les dérivés sulfatés de xyloglucane inhibent la première étape de cycle viral du virus de la rubéole <sup>100</sup> il inhibe aussi la liaison de virus BK aux cellules <sup>101</sup>.

Des formulations préparées à base de XG ont montré une grande efficacité dans le traitement du syndrome de la sécheresse oculaire, en comparaison à celles préparées à base de l'acide hyaluronique grâce à l'augmentation de la rétention d'eau à la surface oculaire en raison de ses propriétés mucoadhésives élevées <sup>102-111</sup>.

Plusieurs propriétés font du XG un candidat intéressant pour véhiculer des médicaments ophtalmiques <sup>100-104</sup> la capacité de formation de gels thermoréversibles et la non toxicité du Xyloglucane a permis son utilisation pour la libération des médicaments hydrophobes et hydrophiles <sup>105-109</sup>, ces gels thermo- réversibles sont préparés par une digestion partielle par la β galactosidase ont été testés dans la délivrance des médicaments comme la délivrance rectale de l'indométacine, l'administration de la mitomycine C, et des véhicules pour la délivrance orale de l'indométacine, du paracétamol, et d'autres drogues <sup>110-115</sup>.

Récemment, des films transparents de xyloglucane-chitosane et xyloglucane-amidon ont été préparés, ces films sont non toxiques thermostables et flexibles, ce qui permet leur utilisation pour la libération contrôlée de médicaments <sup>116</sup>.

# Chapitre II : Méthodes de caractérisation des polysaccharides

# Chapitre II Méthodes de caractérisation des polysaccharides

Ce chapitre est consacré à la description des différentes techniques utilisées au cours de ce travail à savoir les techniques de diffusion de la lumière, la microscopie à force atomique, la microscopie électronique en transmission en plus de la viscosimétrie et la chromatographie de perméation sur gel.

#### II.1. Diffusion de la lumière

Les techniques de diffusion de rayonnement permettent d'obtenir une caractérisation de la physico-chimie des polymères en solution (conformation, affinité avec le solvant ...) 117-120. L'expérience consiste à envoyer un faisceau monochromatique incident sur l'échantillon à étudier et à analyser le rayonnement diffusé dans toutes les directions. Suivant la nature du rayonnement employé, on distingue trois techniques principales : la diffusion de la lumière, la diffusion des rayons X et la diffusion des neutrons.

Dans notre étude nous nous sommes limités à la diffusion de la lumière qui est disponible au laboratoire, les techniques de diffusion de rayons X et de neutrons nécessitent l'utilisation de grands instruments (ESRF, ILL) et permettent d'avoir des informations à plus petite échelle sur les échantillons.

#### II.1.1. Principe

Le principe de la diffusion de la lumière est illustré sur la figure II-1: lorsqu'un milieu diffusant est éclairé, chaque élément de volume renvoie dans toutes les directions (données par l'angle de diffusion  $\theta$ ) une partie de la lumière incidente, le phénomène de diffusion résulte de l'intéraction entre les constituants du milieu diffusant et le champ électrique de l'onde lumineuse incidente  $\frac{121}{120}$ .

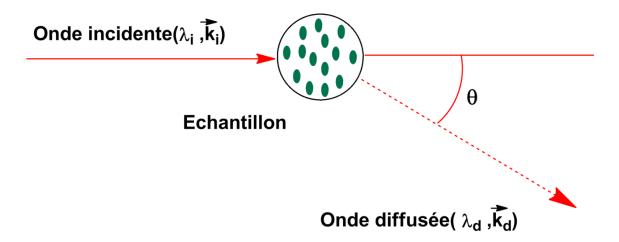


Figure II-1 : Principe de la diffusion de la lumière

L'intensité diffusée dans une direction donnée  $(\theta)$  est définie par le vecteur d'onde de transfert  $\vec{q}$  appelé également le vecteur de diffusion qui est défini par l'équation (1):

$$\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_d \tag{1}$$

où  $\vec{k}_i$  et  $\vec{k}_d$  sont respectivement les vecteurs d'onde incidente et diffusée, leurs modules sont définis par les relations suivantes (2) :

$$\left|\vec{k}_{i}\right| = \frac{2\pi n}{\lambda_{i}} \qquad \left|\vec{k}_{d}\right| = \frac{2\pi n}{\lambda_{d}} \tag{2}$$

Avec  $\lambda_i$  la longueur d'onde incidente,  $\lambda_d$  longueur d'onde diffusée et n est l'indice de réfraction du milieu diffusant. Dans le cas d'une diffusion élastique, les longueurs d'ondes sont égales, et les modules des vecteurs d'onde sont donc égaux.

Nous pouvons écrire le vecteur d'onde de transfert en fonction de l'angle de diffusion  $(\theta)$  dans l'équation (4):

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda_{\rm i}} \sin\frac{\theta}{2} \tag{3}$$

Selon le traitement appliqué à l'intensité diffusée, deux types d'expériences sont possibles :

- -diffusion de la lumière élastique ou statique (SLS)
- -diffusion de la lumière quasi-élastique ou dynamique (DLS)

Ces techniques peuvent être appliquées pour différents systèmes, des solutions de macromolécules, gels, solutions d'électrolytes, des protéines 122, 123.

#### II.1.2. Diffusion de la lumière élastique ou statique

Lors d'une expérience de la diffusion élastique de la lumière, on s'intéresse à la mesure de l'intensité diffusée, ce qui permet de remonter aux propriétés des polymères en solution telles que la masse des particules, la forme, la taille, les interactions intramoléculaires. L'intensité diffusée de la lumière est généralement exprimée en termes de facteur de Rayleigh R (cm<sup>-1</sup>), qui s'exprime (équation 4):

$$R(q) = KcM_w P(q)S(q) (4)$$

ou  $M_w$  représente la masse molaire moyenne en poids des particules, c est la concentration massique en particules en  $g/cm^3$ ,P(q) désigne le facteur de forme de l'objet diffusant et S(q) le facteur de structure, K représente la constante de diffusion et est donnée par (équation 5) :

$$K = \frac{4\pi^2 n^2}{N_A \lambda^4} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \tag{5}$$

avec n l'indice de réfraction du milieu,  $N_A$  le nombre d'Avogadro,  $\lambda$  la longueur d'onde, dn/dc est l'accroissement de l'indice de réfraction du milieu avec la concentration en polymère.

Expérimentalement on obtient la mesure de facteur de Rayleigh d'une façon indirecte en comparant l'intensité diffusée par la solution  $I_S$  à celle diffusée par le liquide de référence

(dans notre cas c'est le toluène)  $I_{ref}$ , mesurée dans les mêmes conditions expérimentales (équation 6) :

$$R(q) = \frac{I_{s} - I_{solvant}}{I_{ref}} \left(\frac{n_{solvant}}{n_{ref}}\right)^{2} R_{ref}(q)$$
 (6)

Ou  $I_{solvant}$  est l'intensité diffusée par le solvant,  $n_{solvant}$  et  $n_{ref}$  sont les indices de réfraction respectivement, du solvant et du liquide de référence  $R_{ref}$  est le facteur de Rayleigh du liquide de référence (R (q) = 1.3522 X  $10^{-5}$  cm<sup>-1</sup> à  $\lambda$  = 632.8 nm pour le toluène). Dans le cas de solution diluée pour lequel q $R_g$  << 1, (régime de Guinier), le facteur de forme le facteur de forme P(q) peut s'écrire suivant l'équation 7:

$$P(q) \approx 1 - \frac{q^2}{3} R_g^2 \tag{7}$$

avec R<sub>g</sub> le rayon de giration du polymère.

#### Exploitation des résultats de la diffusion statique de la lumière (Zimm Plot)

Lors d'une expérience de diffusion élastique de la lumière, on mesure l'intensité diffusée à différentes angles  $\theta$  et à différentes concentrations. Pour l'exploitation des résultats on utilise habituellement le diagramme de Zimm qui permet de représenter sur le même graphique le produit Kc/R(q) en fonction de des deux variables C et q.

Cette méthode valable en régime dilué et dans le cas où les particules sont caractérisées par une taille inférieure à 200 nm, permet à travers une double extrapolation (à C=0 et q=0) d'obtenir la masse molaire moyenne en masse  $M_w$ , le rayon de giration  $R_g$  du polymère et le second coefficient Viriel  $A_2$  (caractérisant la qualité des interactions polymère/solvant). Les extrapolations à  $(\theta=0)$  et (q=0) donnent  $(A_2$  et  $M_w)$  et  $(R_g^2$  et  $M_w)$  respectivement.

La connaissance de l'accroissement de l'indice de réfraction avec la concentration (dn/dc) de la solution est importante, car il intervient dans le calcul de la constante de diffusion. Ce paramètre est déterminé à l'aide d'un réfractomètre différentiel muni d'une source laser opérant à 632.8 nm.

#### II.1.3. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion quasi-élastique ou dynamique de la lumière (DLS) est une technique permettant l'étude de la dynamique des particules dispersées dans un solvant. La diffusion dynamique de la lumière ne se limite pas à des mesures statiques de l'intensité diffusée mais elle s'intéresse à l'étude de ses fluctuations autour de sa valeur moyenne en fonction du temps. Le principe de la diffusion dynamique de la lumière est illustré sur la figure II-2, à gauche, le signal détecté a une échelle d'observation donnée (valeur de q) est montré, les mouvements perpétuels de particules (mouvement brownien) entrainent des fluctuations de l'intensité diffusée en fonction du temps. Ces fluctuations donnent des informations importantes sur la dynamique des particules qui sont définies par les propriétés de ces dernières telle que la taille, la forme, les interactions moléculaire, etc. Le modèle de fluctuation est premièrement transféré en une fonction de corrélation d'intensité en utilisant le schéma suivant : l'intensité diffusée en fonction de temps est multipliée par elle-même décalée dans le temps, ces produits sont moyennés sur la durée de mesure totale.

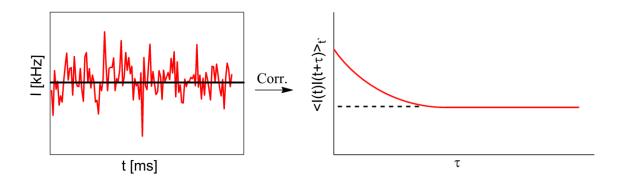


Figure II-2: Principe de la diffusion dynamique de la lumière

Cependant les informations dynamiques ne sont pas mesurées directement, mais c'est la fonction d'autocorrélation temporelle normée de l'intensité diffusée du système étudié qui est mesurée. Elle s'exprime de manière générale par l'équation 8 :

$$g^{(2)}(q,t') = \frac{\langle I(q,t')I(q,t'+\tau)\rangle_{t'}}{\langle I(q,t')\rangle_{t'}^2}$$
(8)

ou t représente le temps, I est l'intensité diffusée. A travers cette fonction il est possible de déterminer les variations de l'intensité diffusée à deux moment différents I(q, t') et  $I(q, t'+\tau)$ .  $g^{(2)}(q, t)$  décroit lorsque t augmente, après un temps suffisamment long la corrélation avec l'instant zéro devient inexistante, ce phénomène est la conséquence du mouvement brownien. Si le champ obéit à une distribution gaussienne, on peut relier la fonction d'autocorrélation de l'intensité  $g^{(2)}(q, t)$  et la fonction de d'autocorrélation du champ électrique  $g^{(1)}(q, t)$  par la relation de Siegert (équation 9):

$$g^{(2)}(q,t) = 1 + \left| g^{(1)}(q,t) \right|^2 \tag{9}$$

Ou g<sup>(1)</sup> représente l'inverse de la transformée de Laplace des temps de relaxation.

#### Exploitations des résultats obtenus en DLS

Une fois les fonctions d'autocorrélation accumulées, il faut extraire le temps caractéristique de la dynamique des objets en solution, ces fonctions sont dépendantes du temps d'échantillonnage. Plusieurs méthodes ont été développées pour analyser les fonctions d'autocorrélation.

#### • Cas des molécules monodisperses

La plus simple pour le cas de particules monodisperses consiste à décrire la fonction d'autocorrélation par une simple exponentielle (équation10) <sup>124</sup>.

$$g^{(1)}(q,t) = Ae^{-\Gamma t} {10}$$

ou A est l'amplitude de l'intensité diffusée,  $\Gamma$  est la fréquence de relaxation

#### • Méthode d'analyse des cumulants

Elle est couramment utilisée pour estimer la polydispersité des particules. La méthode consiste à traiter l'écart-type à une mono-exponentielle en termes de cumulants. g<sup>(1)</sup> s'écrit selon l'équation suivante (équation 11)

$$\ln\left(g^{(1)}(q,t)\right)_{t\to 0} \approx \Gamma_0 - \Gamma_1 t + \Gamma_2 \frac{t^2}{2!} + \cdots$$
 (11)

Les coefficients  $\Gamma$  sont les cumulants, pour une solution idéale contenant des particules monodisperses, le développement s'arrête au terme linéaire du premier cumulant  $\Gamma_1$ . Alors que dans le cas d'une solution polydisperse, le premier cumulant  $\Gamma_1$  donne la valeur moyenne de la fréquence de relaxation tandis que le deuxième cumulant  $\Gamma_2$  donne l'écart –type de la distribution des fréquences de relaxation. Le degré de polydispersité est obtenu par le rapport  $\Gamma_1/\Gamma_2$ . Cette méthode ne permet pas de distinguer entre deux temps de relaxations distincts qui correspondraient à deux populations distinctes, elle n'est utilisée que lorsqu'un seul temps de relaxation caractéristique est présent  $\Gamma_1/\Gamma_2$ .

### • Méthode d'analyse CONTIN 126

Développée par Provencher, c'est devenu la méthode la plus utilisée pour l'analyse des résultats de la diffusion dynamique de la lumière. La méthode d'analyse CONTIN utilise des algorithmes mathématiques pour exécuter l'inverse de la transformée de Laplace pour obtenir la fonction de distribution des temps de relaxation A(t) (équation 12)

$$g^{(1)}(q,t) = \int_0^\infty A(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma$$
 (12)

Cependant, comme de nombreuses méthodes, la méthode " CONTIN " a ses limites, et il faut prendre des précautions lorsqu'on l'utilise.

Cette méthode est très bien appropriée dans le cas où l'on a une solution idéale polydisperse contenant plusieurs types de particules de tailles très différentes. La fonction g<sup>(1)</sup> (q, t) sera donc une somme discrète ou continue d'exponentielles. Le traitement est relativement aisé pour des mélanges de particules bien distinctes (pics bien définis dans la distribution). Dans le cas contraire cette méthode peut donner lieu à des difficultés (recouvrement de pics, épaulements...).

De même, dans le cas où l'une des exponentielles est une exponentielle étirée, le pic de distribution obtenu par cette méthode ne sera pas symétrique .Il faudra donc analyser la fonction avec une autre méthode.

La dernière limite est le cas où la solution contient une seule population très polydisperse, dans ce cas, le pic de distribution obtenu sera très large et l'interprétation sera plus complexe.

Dans le cas des particules diffusives,  $\Gamma$  dépend de  $q^2$ . Le coefficient apparent de la diffusion des objets est alors calculé à partir de l'équation 13 <sup>127</sup>.

$$\Gamma = Dq^2 \tag{13}$$

Ainsi, pour un phénomène diffusif, la variation de  $\Gamma$  en fonction de  $q^2$  est linéaire. Le coefficient de la droite est le coefficient de diffusion D des objets diffusants.

Le coefficient de diffusion D peut être relié au rayon hydrodynamique des objets par la relation de Stokes-Einstein (équation14)

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \eta R_h} \tag{14}$$

où  $\eta$  est la viscosité de la solution, T la température,  $R_h$  le rayon hydrodynamique,  $k_B$  est la constante de Boltzmann.

Différents paramètres physico-chimiques peuvent être obtenus en combinant les deux expériences de la diffusion de la lumière SLS et DLS, il s'agit de :

- La masse molaire moyenne en poids de polymère (M<sub>w</sub>)
- Le rayon de giration (R<sub>g</sub>) du polymère.
- Le second coefficient du viriel (A<sub>2</sub>) caractérisant les interactions polymères/solvant.
- Le rayon hydrodynamique (R<sub>h</sub>) du polymère en solution.

Le rapport  $R_g \! / \ R_h$  est aussi utilisé pour caractériser les polymères en solution, les valeurs théoriques de  $R_{\rm g}\!/\ R_{\rm h}$  pour une sphère homogène est 0,779, elle augmente considérablement pour des structures moins denses. Il est proche de 1 pour des structures vésiculaires, alors que pour des structures en pelote statique  $R_g/R_h$  =1,5 (solvant  $\theta$ -) ou  $R_g/R_h$  =1,8 (pour un bon solvant) 128,129.

#### II.2. La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique ou (AFM) <sup>130</sup> fait partie de la famille des microscopies à sonde locale dont le principe repose sur le balayage de la surface d'un échantillon à l'aide d'une sonde constitué d'une pointe portée à l'extrémité d'un levier. Plusieurs raisons expliquent le succès remporté par cette technique : il est possible d'observer divers types d'échantillons : conducteurs, semi-conducteurs, isolants, dans des milieux secs ou bien liquides à différentes températures. L'AFM permet ainsi d'obtenir des informations quantitatives de la surface étudiée à une échelle nanométrique.

#### II.2.1. Principe

Le principe de l'AFM (figure II-3) consiste à observer la topographie d'une surface en utilisant les forces d'interactions entre une pointe (fixée à l'extrémité d'un levier) et cette surface. Selon la situation ces forces peuvent être de type répulsif (forces de contact), ou attractif (forces de Van der Waals, forces capillaires) (figure II-4)

Pendant le balayage, le levier est défléchi de sa position d'équilibre sous l'effet des forces d'interactions pointe-échantillon. La déflexion est mesurée par une méthode optique simple : un faisceau laser est capté par une photodiode à quatre quadrants de façon à décomposer les mouvements verticaux et latéraux de la pointe lors du balayage de l'échantillon.

L'échantillon à étudier ou la pointe sont supportés par un scanner piézoélectrique composé de 03 cales ; deux de ces cales assurent le balayage de l'objet selon les axes X et Y et le troisième permet les mouvements suivant l'axe Z.

Les problèmes liés au scanner résultent de phénomènes d'hystérésis et de non linéarité des cales piézoélectriques, ce qui nécessite un étalonnage du scanner. Cependant tous ces phénomènes varient au cours du temps, ce problème peut être résolu en utilisant des capteurs capacitifs de correction pour les trois cales (X, Y, Z). Ces capteurs détectent les déviations des mouvements de scanner piézoélectrique et corrigent leur non linéarité. Cette conception est

connue sous le nom de « boucle fermée » de l'AFM ou bien close loop, elle assure l'obtention des images avec la plus haute résolution possible.

Lorsque l'échantillon se déplace sous la sonde, les forces d'interactions varient, il existe deux façons pour les mesurer : soit en mesurant la déflexion directement sur la photodiode en fixant la hauteur de l'échantillon, ce mode d'imagerie est appelé le mode force, et donne des informations sur la topographie de la surface, cependant il introduit une limite dans le choix de l'échantillon : il doit être peu rugueux de manière à ce que le levier puisse suivre la surface sans l'endommager.

Le mode le plus utilisé est celui nommé le mode hauteur ou mode à force constante, en tout point de l'échantillon. Un système d'asservissement ajuste la tension appliquée au piézoélectrique Z de façon à maintenir la déflexion du levier constante.

Chaque point mesuré est ensuite représenté en niveau de gris ou selon un code de couleur de façon à former l'image tridimensionnelle de la surface : image de topographie.

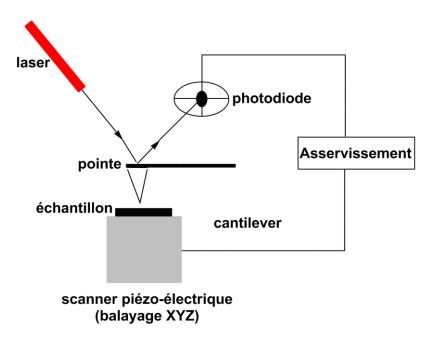


Figure II-3: Principe de fonctionnement d'un AFM

#### II.2.2. Les modes de mesures

Les modes de mesure en AFM peuvent être divisés en deux parties : les modes dits de « contact » et les modes dits « oscillant ».Ces deux modes se réfèrent aux forces d'interaction mises en jeu lors de l'acquisition des images.

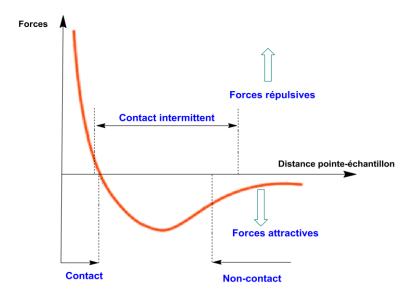


Figure II-4: Forces d'interaction pointe-échantillon

#### a) Les modes statiques

#### • Le mode contact

La pointe est en contact permanent avec l'échantillon, <sup>130,131</sup> le levier utilisé est de faible constante de raideur K (0.01-1 N/m) <sup>132</sup>. La force d'interaction entre la pointe et la surface peut être évaluée en mesurant la déflexion verticale du levier d. Le levier se comporte comme un ressort et la force F est donnée par la loi de Hooke.

$$F = Kd$$

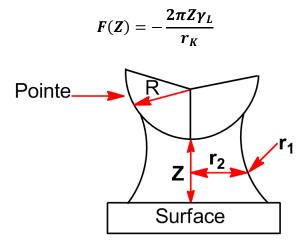
Les forces mesurées sont des forces répulsives de courte portée (quelques nm au maximum).

L'avantage principal de ce mode réside dans la rapidité d'acquisition et la facilité de mise en œuvre, de plus il permet d'obtenir des images stables et de haute résolution <sup>133</sup>.

Toutefois il convient d'utiliser ce mode avec précaution pour imager des objets moux comme les matériaux biologiques. En effet suivant les leviers utilisés la pression exercée par la pointe peut être importante (1GPa) se qui peut déformer ou dégrader l'échantillon. De plus lorsqu'on image à l'ai libre il faut tenir compte des forces de capillarité : elles peuvent avoir beaucoup d'incidence sur les images obtenues en mode contact; et sont suffisantes pour détériorer la pointe ou un échantillon fragile.

En effet les surfaces sont recouvertes d'un film d'eau, ce film peut créer une force attractive due à la formation d'un ménisque d'eau entre les deux objets <sup>134, 135</sup>. Ces forces appelées forces de capillarité, sont fonction du taux d'humidité, de la morphologie des objets, de la nature de la surface et de la pointe (rayon de courbure). Elles sont le résultat de la présence de vapeur d'eau dans l'air qui se condense sur la surface. Lorsque la pointe et la surface sont suffisamment proches, un microménisque se forme, attirant fortement la pointe vers la surface (figure II-5).

La force de capillarité peut être évaluée par la relation suivante :



**Figure II-5 :** Représentation schématique des forces de capillarité existantes entre la pointe et la surface

 $\gamma_L$  étant la tension de surface entre le liquide et l'air et  $r_K$  le rayon de Kelvin qui est égal à  $r_K = [1/r_1 + 1/r_2]^{-1}$ ,  $r_1$  et  $r_2$  étant les rayons représentés sur la figure.5.

# Chapitre II Méthodes de caractérisation des polysaccharides

Suivant le taux d'humidité, la force entre une pointe en silicium et une surface de mica peut atteindre 100 nN <sup>136</sup>.

Cette force s'ajoute à la pression exercée par le contact de la pointe sur l'échantillon et dégrade les images obtenues, ainsi Lyubchenko et al <sup>137</sup>, ont mis en évidence, en comparant les images AFM de brins d'ADN obtenues dans l'air l'eau et le propanol, que la hauteur et l'épaisseur des brins d'ADN dépendait de la force de capillarité.

#### b) Les modes dynamiques

Les modes dynamiques consistent à faire osciller le levier au-dessus de la surface autour de sa fréquence de résonance fondamentale grâce à une céramique piézoélectrique. Deux modes sont utilisés le mode non-contact et le mode tapping. Ces modes sont plus adaptés à l'imagerie des polymères ou des matériaux biologiques.

#### • Le mode non-contact

Le premier mode non contact a été développé en 1987 par Martin et al <sup>138</sup>. L'espacement entre la pointe et la surface est de l'ordre de 1 à 10 nm. La pointe oscille à une fréquence supérieure à la fréquence de résonance du levier (100-400 kHz) et une faible amplitude (inférieure à 10 nm), mais elle ne se trouve jamais en contact avec la surface. Le levier utilisé en mode non-contact doit être rigide ayant une constante de raideur élevée (par exemple 13N/m) <sup>139</sup>.

#### • Le mode tapping ou oscillant

Le mode tapping (TMAFM) a été développé par Digital Instruments (aujourd'hui Bruker) <sup>140,141</sup>. Dans ce mode appelé aussi mode oscillant ou mode de contact intermittent, la pointe oscille à une fréquence légèrement inférieure à la fréquence de résonance (70-300 kHz) et une grande amplitude (100-200 nm) et ne touche la surface qu'en fin de cycle d'oscillation, les forces mesurées généralement sont des forces attractives, les sondes utilisées en mode tapping doivent avoir une constante de raideur importante allant de 30-60 N/m <sup>142</sup> de manière

à pouvoir contrecarrer les forces d'adhésions dues à la couche d'eau adsorbée à la surface de l'échantillon et à pouvoir s'en extraire, les forces de capillarité sont alors minimisées, le fait que la pointe vienne en contact avec la surface d'une façon intermittente, minimise donc les forces de frottement et améliore ainsi la résolution latérale. Les forces de frictions sont négligeables, le mode tapping est donc le plus adapté pour l'imagerie de matériaux faiblement adsorbés sur la surface1<sup>142,143</sup> et les molécules biologiques <sup>144</sup>.

#### II.2.3. La préparation des échantillons

Comme pour la microscopie électronique, l'imagerie par AFM nécessite le dépôt de matériel à observer sur un substrat, un grand choix de substrat existe : le mica, le verre, le graphite, le silicium....

Plusieurs qualités dans le substrat doivent être impérativement requises. La première est plutôt simple à comprendre, il faut qu'il soit parfaitement plan. Ceci signifie qu'il faut que la rugosité de sa surface seule soit inférieure au nanomètre, pour pouvoir faire des images en haute résolution. Il doit également être simple d'utilisation et prêt dès qu'on en a besoin. Enfin, s'il est peu cher, c'est encore mieux.

La propreté du substrat est aussi importance, pour le mica on le clive comme le graphite, pour le Silicium un traitement par une solution Piranha (mélange d'Acide sulfurique/Peroxyde d'hydrogène (70/30 % v/v).

#### II.2.4. Méthodes de dépôt

La méthode de dépôt des solutions sur les substrats à un grand effet sur l'observation des conformations par AFM. Balnois <sup>145</sup> a comparé l'effet de différents types de dépôt de solutions de schizophyullane ou d'acide humique en étudiant trois méthodes différentes (goutte, adsorption et ultracentrifugation).

On décrit quelques méthodes utilisées couramment :

#### a) Méthode de dépôt par goutte

Consiste à déposer une goutte d'une solution contenant le matériel à étudier sur la surface. La goutte est ensuite évaporée sous conditions ambiantes dans une boite avant l'observation à l'AFM (figure II-6). Cette méthode permet de contrôler le volume de la solution à déposer. Pour avoir un dépôt homogène, il est nécessaire que la goutte mouille totalement le substrat.

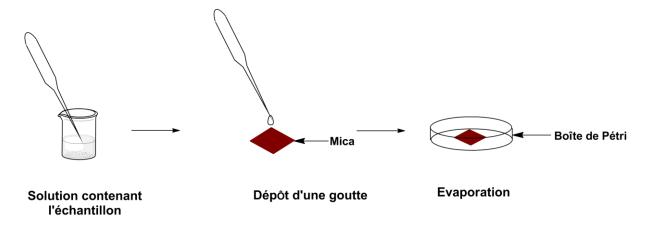


Figure II-6 : Principe de la méthode de la goutte

#### b) Méthode de dépôt par adsorption

Le principe de cette méthode est illustré sur la figure II-7: le substrat est introduit verticalement dans un bécher contenant la solution de matériel à étudier pendant une durée déterminée, le substrat est ensuite retiré et introduit dans un autre bécher contenant une solution de rinçage afin d'éliminer les espèces non adsorbées. L'échantillon est ensuite séché dans une boite de Pétri.

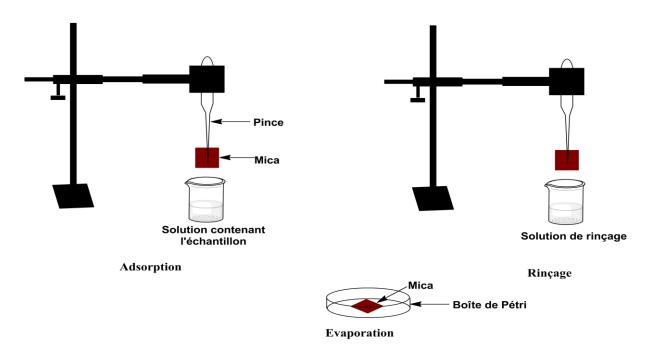


Figure II-7: Principe de la méthode de l'adsorption

#### c) Méthode de dépôt par spin coating

L'enduction centrifuge (plus connue sous son nom anglais de *spin coating*) est une procédure employée pour déposer des couches minces uniformes sur des substrats plats. Cette méthode a été décrite pour la première fois par Emslie et al (1958) <sup>146</sup>, la machine utilisée est appelée une tournette ou tout simplement spinner.

En bref, un excès d'une solution est placé sur le substrat qui est ensuite mis en rotation à grande vitesse (autour de 3000 tours/minute) dans le but de répartir le liquide sur tout le substrat de façon uniforme par la force centrifuge (figure II-8). L'épaisseur de la couche déposée dépend de plusieurs facteurs: des facteurs liés au spinner tel que la vitesse de rotation (plus elle est grande plus l'épaisseur sera fine), le temps de réalisation et des facteurs liés à la solution déposée : quantité déposée (en général une ou quelques gouttes), concentration, masse molaire de polymère déposé, viscosité, solvant utilisé etc.

La technique d'enduction centrifuge est particulièrement utilisée en microfabrication, afin de créer des couches d'une épaisseur inférieure à 10 µm. Elle sert tout particulièrement dans le

processus de photolithographie à déposer la couche de résine photosensible sur le wafer, avec une épaisseur d'environ un micromètre <sup>147-149</sup>.

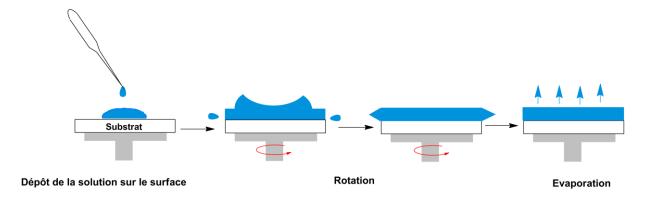


Figure II-8: Principe de la méthode d'enduction centrifuge (spin-coating)

#### II.2.5. AFM à l'air et en liquide

Parmi les possibilités offertes par l'AFM on retrouve l'imagerie de tous types d'échantillons aussi bien à l'air qu'en liquide, dans les deux cas, il est nécessaire de prévoir une bonne isolation du son et des vibrations <sup>150</sup>.

L'imagerie à l'air n'est pas généralement le bon choix pour observer des matériaux biologiques, il existe un certain nombre d'inconvénients, par exemple, le processus de séchage peut induire une dénaturation des biomolécules, en outre les forces d'intéraction entre la pointe et l'échantillon provoquent une dégradation des biomolécules ou bien un changement dans leur structure. De plus l'imagerie en air ne permet pas d'observer les échantillons dans des conditions physiologiques qui maintiennent leur activité biologique, une observation en liquide permet de minimiser les forces de capillarité, et d'empêcher la formation des agrégats lors du séchage... L'utilisation d'une cellule liquide est indispensable, elle assure trois fonctions : contenir l'échantillon, le liquide et fournir un chemin optique stable pour le faisceau laser qui est réfléchi par le levier 132, 150,151.

Le levier est très sensible à la température, pour cela un bon équilibre thermique est crucial lors de l'imagerie. Il est possible de réaliser l'imagerie en liquide avec tous les modes de

# Chapitre II Méthodes de caractérisation des polysaccharides

l'AFM, en mode tapping opéré en liquide, les leviers utilisés doivent être très doux en raison de la diminution de la fréquence de résonance dans un liquide. La constante de ressort est typiquement de 0,1 N / m dans un liquide par rapport à mode de percussion dans l'air lorsque le levier peut être dans la gamme de 1-100 N /m.

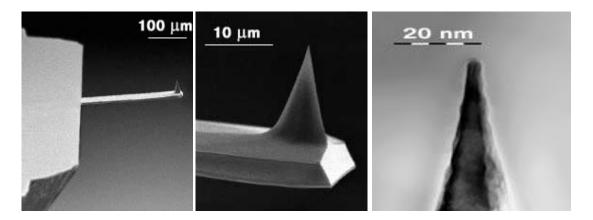
#### II.2.6. Levier et pointe

Les leviers commerciaux sont en silicium ou nitrure de silicium, et souvent recouverts par d'autres matériaux (Aluminium). Ils peuvent être rectangulaires ou bien en forme triangulaire. Les dimensions typiques pour un levier sont de 100-300µm en longueur, 10-50 µm en largeur et 1-2 µm en épaisseur.

La constante de raideur K peut aller de quelques dixièmes à quelques dizaines de N/m et dépend de la forme du levier, les leviers les plus épais et les plus courts sont les plus rigides. La fréquence de résonance varie de quelques dizaines à quelques centaines de kHz, les leviers les plus épais et les plus courts sont ceux aussi dont la fréquence de résonance est plus élevée. Les pointes éléments clés de l'AFM sont intégrées dans les leviers, leurs paramètres sont très important pour une imagerie en AFM, la pointe doit être la plus fine possible afin d'obtenir une meilleure résolution d'images, le rayon de courbure à son extrémité doit être le plus petit possible, peuvent être de forme conique ou pyramidale (figure II-9)

Certaines sont longues (10µm) et pointues et permettent une imagerie bien résolue mais elles se cassent facilement, puisqu'elles sont à base de silicium <sup>151-156</sup>. Les autres pointes, en nitrure silicium <sup>157</sup>, sont moins longues (4µm) et leur rayon de courbure plus important <sup>132, 149</sup>.

Il a été montré récemment que les pointes AFM peuvent être fonctionnalisées par revêtement avec certains matériels, par conséquence les forces d'interactions pointe-échantillons peuvent être variées <sup>158-163</sup>.

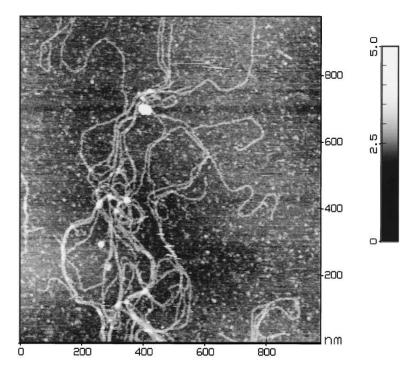


**Figure II-9:** Images de microscopie électronique à balayage : (a) d'un exemple de levier utilisé en mode contact intermittent ; (b) et (c) de la poutre à l'extrémité de la pointe.

#### II.2.7. AFM et polysaccharides

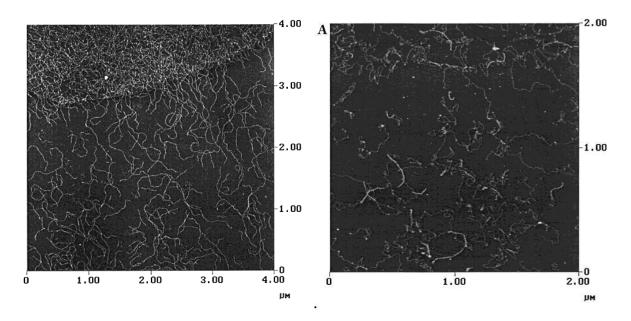
Depuis son invention l'AFM a contribué efficacement à l'étude des molécules biologiques (acides nucléiques, protéines, polysaccharides).

Plusieurs polysaccharides adsorbés sur des surfaces ont été imagés directement par AFM : l'amylose, le galactomannane, le hyaluronane, l'arabinoxylane, le xanthane <sup>164</sup> (figure II-10), le succinoglucane, et des longues chaines branchées d'amylose ont été aussi observées <sup>165</sup>.



**Figure II-10:** Image AFM de molécules de xanthane préparé dans NaCl (0,01 M) déposé sur le mica et observés dans l'isopropanol <sup>164</sup>

Le changement de conformations des polysaccharides en fonctions de différents paramètres a été étudié, l'effet de changement de pH et de la force ionique sur la conformation du succinoglucane <sup>166</sup> (figure II-11) la conformation du xanthane <sup>167</sup>. Différentes conformations du hyaluronane ont été observées en changeant ou en modifiant le substrat <sup>168</sup>.



**Figure II-11:** Images AFM de succinoglucane (10mg/l) déposé sur mica : a) dans l'eau b) dans KCl (0.01 M) <sup>166</sup>

En outre, il est possible d'effectuer une étude quantitative sur les polysaccharides, Balnois et al ont réalisé une étude quantitative sur des chaines de schizophyullane en mesurant quelques paramètres tels que la hauteur des molécules adsorbées sur la surface, leurs dimensions latérales et la polydispersité <sup>169</sup>.

La capacité à visualiser les interactions des polysaccharides avec les autres biomolécules comme les protéines par AFM a conduit à la découverte de nouveaux complexes polysaccharides- protéines formés par les polysaccharides de la paroi cellulaire ce qui a permet de comprendre leurs propriétés : la propriété d'agir comme des émulsifiants de pectines et des arabinoxylanes <sup>170</sup> de la betterave sucrière est inhabituelle, celle-ci est due à la

présence des résidus des protéines attachés aux polysaccharides, ces protéines sont difficiles à enlever.

L'AFM peut être employée pour analyser le mode d'action des enzymes sur les polysaccharides, dans certains cas les complexes formés entre les polysaccharides et les enzymes fournissent des informations sur le mode d'action de ces dernières, un complexe en forme d'anneau formés entre l'amylose, et le domaine de fixation de d'amidon (SBD) de la glucoamylase, a suggéré un nouveau mécanisme moléculaire montrant le rôle de SBD dans l'hydrolyse d'amidon cristallin par les glucoamylases <sup>171</sup>.

#### II.3. La microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique en transmission est une technique d'imagerie largement appliquée dans le domaine des matériaux et la biologie, elle permet l'observation des échantillons à une échelle nanométrique pour donner des informations sur leur morphologie. Le principe du microscope électronique à été mis au point en 1931 par l'Allemand Ernst Ruska, un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très fin, les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image.

Un microscope électronique en transmission (figure II-12) se compose principalement d'un système de pompes à vide ; un canon à électron composé d'une source d'électrons, d'un système de focalisation et d'un accélérateur d'électrons ; une colonne optique électronique contenant les lentilles électromagnétiques et les diaphragmes ; un porte échantillon équipé d'un système de refroidissement à l'azote ; un détecteur d'électrons ; éventuellement d'autres éléments électroniques de mesure.

Les électrons émis par le canon sont focalisés à l'aide de plusieurs lentilles condenseurs sur l'objet. Un diaphragme condenseur permet de limiter l'ouverture angulaire du faisceau au niveau de la source, les électrons qui ont traversé l'échantillon sont focalisés au niveau du plan image de l'objectif grâce à la lentille objectif. Un diaphragme de contraste situé juste

après la lentille objectif permet de sélectionner le ou les faisceaux diffractés qui vont contribuer à l'image. Il est ainsi possible de réaliser un champ clair en sélectionnant le faisceau central ou un champ sombre en sélectionnant un ou plusieurs faisceaux diffractés.

Enfin, des lentilles intermédiaires et des lentilles projecteurs permettent d'agrandir l'image obtenue pour la rendre visible à l'œil humain. L'image obtenue qui est en relation avec la densité électronique de la matière traversée, plus la matière est dense, moins les électrons peuvent la traverser est projetée sur l'écran du microscope ou sur une caméra située sous la colonne. Un dernier diaphragme, appelé diaphragme de sélection d'aire, est situé au niveau de la première image intermédiaire et permet de délimiter une zone de l'échantillon.

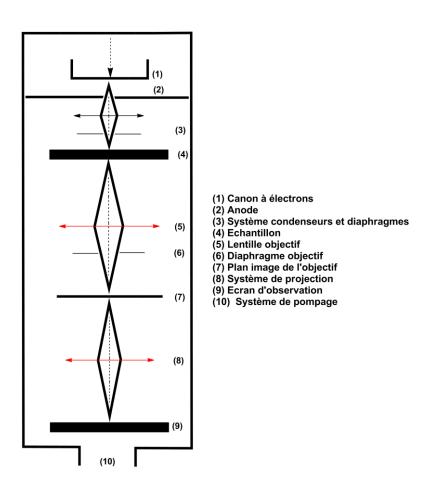


Figure II-12: Représentation schématique d'un microscope électronique en transmission

#### II.4. Chromatographie sur gel perméable

Décrite en 1963 par Moore <sup>172</sup>, la chromatographie sur gel perméable (GPC) ou chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une méthode de routine capable de fournir des informations précises sur la distribution en masse molaire des polymères (synthétiques ou bien naturels).

La GPC est une technique rapide et facile à mettre en œuvre, son principe est basé sur la partition par interactions physiques entre deux phases, l'une est appelée la phase stationnaire constituée par exemple d'un gel polystyrène réticulé, l'autre est la phase mobile (solvant) selon le principe de tamis moléculaire. L'appareillage nécessaire (figure II-13) est d'une relative simplicité, outre un réservoir de solvant, l'équipement est constitué d'une pompe capable de pousser la phase mobile, un injecteur à travers lequel est introduit une solution diluée de polymère, les colonnes contenant la phase stationnaire. A la sortie des colonnes, on trouve un détecteur, deux types de détecteurs sont existants :

- des détecteurs sensibles à la concentration dont le plus couramment utilisé est le réfractomètre différentiel (IDR) qui donne des informations sur l'indice de réfraction dn/dc. Certains appareils sont équipés d'un détecteur l'absorption (UV) ou (IR).l'appareil est équipé d'un détecteur de viscosimétrie capable de fournir des informations sur la viscosité intrinsèque. La détection viscosimétrique est ainsi essentielle pour l'étude des ramifications longues dans les polymères.
- Des détecteurs sensibles au poids moléculaire. Le détecteur de la diffusion de la lumière multiangle (MALS) mesure simultanément la lumière diffusée suivant des angles différents (typiquement entre 20 ° et 150 °), après extrapolation à angle nul, à l'aide d'un logiciel approprié, il est possible d'avoir les informations de masse moléculaire, comme l'appareil fonctionne à plusieurs angles, il donne, en plus, une mesure absolue du rayon de giration.

La phase mobile est injectée en tête de la colonne en même temps que la solution de polymère, le solvant passe à travers la colonne à une vitesse d'écoulement constante, engendrant un gradient de pression au sein de la colonne, sous l'effet de cette pression, les molécules constitutives de l'échantillon, passent aussi à travers la colonne. Cependant les molécules parcourent des chemins plus ou moins long en fonction de leur capacité à pénétrer les pores (de volume  $V_p$ ) pendant leurs parcours colonne, les petites et moyennes molécules diffusent librement dans les pores de toutes tailles , quant aux molécules les plus grosses, leur volume peut les empêcher de pénétrer les pores voire les maintenir dans le volume interstitiel ou d'exclusion ( $V_0$ ), la séparation des molécules a ainsi lieu entre  $V_0$  et  $V_0+V_p$  qui correspond à la somme du volume d'exclusion et de celui des pores, les petites molécules sont éluées plus tardivement à un volume  $V_0+V_p$   $^{172,173}$  (figure II-14)

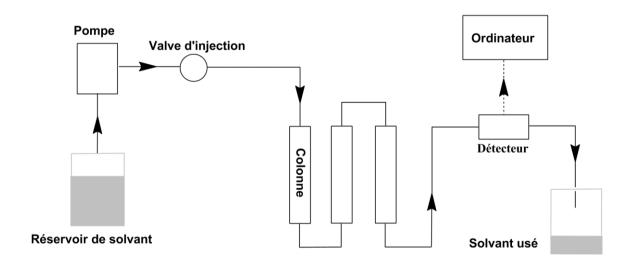


Figure II-13: Représentation schématique d'un appareillage de GPC

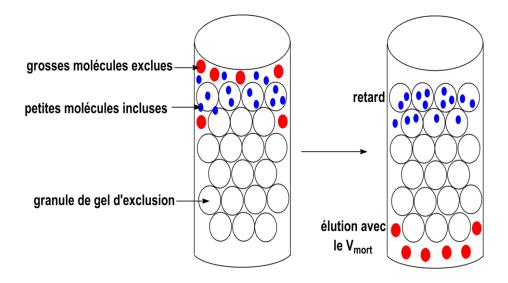


Figure II-14: Principe de la chromatographie de perméation de gel

## II.5. Viscosimétrie capillaire

La détermination expérimentale de la viscosité constitue actuellement l'une des techniques les plus répandues en chimie macromoléculaire depuis qu'en 1926 Staudinger montra son utilité dans la caractérisation des polymères. Les données expérimentales sont, de plus, très rapidement exploitables. La mise en solution d'un échantillon de polymère s'accompagne, en effet, d'un accroissement très important de la viscosité du solvant, même lorsque le soluté se trouve en faible quantité, la viscosité ainsi obtenue permet de caractériser le polymère en solution.

Si  $\eta$  est la viscosité de la solution macromoléculaire, et si  $\eta_0$  est la viscosité du solvant, on définit la viscosité relative, notée  $\eta_{rel}$  par l'équation15 :

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \tag{15}$$

# Chapitre II Méthodes de caractérisation des polysaccharides

Pour des solutions suffisamment diluées, la viscosité relative est donnée directement par la relation suivante (équation 16) :

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$$
(16)

où t = durée d'écoulement d'un volume donné de solution au travers d'un capillaire,

 $t_0$  = durée d'écoulement d'un même volume de solvant pur.

L'équation 17 définit la viscosité réduite  $\eta_{red}$  (elle caractérise la capacité propre à un polymère d'accroître la viscosité relative)

$$\eta_{red} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C} \tag{17}$$

avec c la concentration massique de la solution.

La viscosité intrinsèque  $[\eta]$  correspond au cas idéal où les molécules de soluté sont indépendantes les unes des autres ; cela se produit pour des solutions infiniment diluées. Pour accéder à la valeur de la viscosité intrinsèque, on détermine ainsi graphiquement la limite vers laquelle tend le rapport  $[\eta]$  lorsque la concentration c tend vers zéro (équation 18)

$$[\eta] = \lim_{C \to 0} \eta_{red} \tag{18}$$

La mesure manuelle du temps d'écoulement en utilisant un viscosimètre capillaire (le plus utilisé est celui dénommé le Cannon-Ubbelohde) est suffisante pour déterminer la viscosité d'une solution (figure II-15).

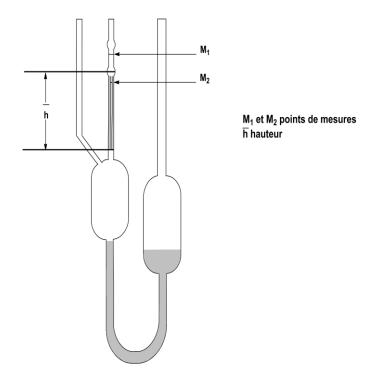


Figure II-15: Viscosimètre capillaire (Cannon-Ubbelohde)

La viscosité intrinsèque est une fonction du poids moléculaire du polymère en solution, du solvant, du polymère et de la température. Si les mesures s'effectuent à température constante en utilisant un solvant spécifique à un polymère particulier alors on peut relier quantitativement la masse moléculaire du polymère à ces mesures.

Une relation est proposée par Huggins (équation 19) qui lie la viscosité réduite et la concentration pour des solutions diluées de polymères.

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k'[\eta]^2 c \tag{19}$$

Ou k' est la constante de Huggins

La mesure de la viscosité permet de calculer la masse molaire de polymère, en utilisant la relation de Mark, Houwink, Sakurada

$$[\eta] = KM^a \tag{20}$$

# Chapitre II Méthodes de caractérisation des polysaccharides

où K et a sont les constantes caractéristiques du couple polymère-solvant à une température donnée, et leurs valeurs sont répertoriées dans le Polymer Handbook,  $0.5 \le a \le 0.8$  augmente avec le pouvoir de solvatation de solvant  $^{172-178}$ .

# Chapitre III Caractérisation physico-chimiques du xyloglucane

# Chapitre III Caractérisation physico-chimique du xyloglucane

Au cours de ce chapitre, nous allons présenter et discuter les différents résultats obtenus sur la caractérisation physico-chimique de solutions de xyloglucane en utilisant principalement les techniques de :

- diffusion statique de la lumière (SLS).
- diffusion dynamique de la lumière (DLS).

La morphologie de XG a été examinée par des techniques de microscopie :

- microscopie à force atomique (AFM).
- microscopie électronique en transmission (TEM).

D'autres techniques ont été aussi utilisées :

- chromatographie de perméation de gel (GPC).
- résonance magnétique nucléaire (RMN).

# III.1. Caractérisation physico-chimique en fonction de différentes conditions de solubilisation :

Le xyloglucane issu de graines de tamarin est donné comme étant soluble dans l'eau. Cependant les différentes macromolécules ont tendance à ne pas s'hydrater totalement et par conséquent des espèces supramoléculaires agrégées restent présentes même dans des solutions très diluées.

Nous commencerons par l'étude des propriétés du xyloglucane en solution par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Différentes conditions expérimentales ont été utilisées afin de déterminer les meilleures conditions de solubilité.

Une étude complémentaire a été réalisée en utilisant ces conditions expérimentales de mise en solution par les méthodes citées ci dessus (diffusion de la lumière, microscopie à force atomique, microscopie électronique en transmission, chromatographie de gel de perméation).

#### III.1.1.Configuration expérimentale

Le matériel végétal de départ (xyloglucane) provient de la société Rhodia. Il a été purifié au sein du laboratoire selon le mode opératoire suivant : 1 g de xyloglucane est solubilisé dans 1L d'eau, après 24 heures d'agitation, la solution est chauffée à 100°C afin de dénaturer les protéines, puis centrifugée (7000 rpm, 20 min), et filtrée sur des membranes SARTORIUS (nitrate de cellulose) dont la porosité est de 12 µm de manière à éliminer les impuretés résiduelles non dissoutes. La solution est ensuite lyophilisée et gardée dans un endroit sec, le rendement est de l'ordre de 40%. On peut déjà noter le faible rendement de cette purification, en comparaison avec d'autres travaux cités dans la littérature où des rendements plus élevés (55-65%) sont obtenus <sup>179</sup>.

5 solvants ont été utilisés pour dissoudre le xyloglucane pour étudier ses propriétés en solution. La concentration en polymère est fixée à Cp=1mg/ml (0.1%).

Les échantillons sont préparés dans les conditions suivantes :

- 1. XG est dissous dans DMAc/LiCl (5%).
- 2. XG est dissous dans DMSO.
- 3. XG est solubilisé dans l'eau pure (MilliQ ,18MΩcm<sup>-1</sup>).
- 4. XG est solubilisé dans NaOH (1M).
- 5. XG est solubilisé dans NaNO<sub>2</sub> (0.1M).

Les solutions sont agitées pendant une nuit à température ambiante, les solutions aqueuses sont ensuite chauffées à 80° pendant 2h.

Les mesures de la diffusion de la lumière ont été effectuées à l'aide d'un appareil de diffusion de la lumière de haute performance de type ALV/CGS-8F S/N 069, équipé d'un laser rouge hélium-néon (JDSU) opérant à une longueur d'onde de 632,8 nm et à une puissance d'au plus 35 mW. L'angle de diffusion accessible de cet équipement varie de 20 à 150 °. Le porte échantillon (cuve) contient du toluène, son indice de réfraction est égal à 1,49 c'est-à-dire le

même que celui du verre. Le toluène sert à l'adaptation de l'indice de réfraction et minimise ainsi les réfractions parasites à l'interface verre-liquide. Il sert également de bain thermostaté. Toutes les mesures sont effectuées à l'angle de diffusion  $\theta$ =90° à T =25°C.

Afin d'éliminer le plus possible d'impuretés résiduelles, les solutions sont filtrées sur des filtres  $0.4\mu m$  puis sur  $0.2\mu m$ (nous avons utilisé des filtres à base d'acétate de cellulose pour les solutions aqueuse et des filtres PTFE pour les solutions préparées dans les solvants organiques), elles sont transférées dans des cellules en verre et le volume de l'échantillon minimum requis pour chaque expérience est de 1 ml, les manipulations ont été répétées 3 fois afin de garantir une meilleure précision et la reproductibilité des résultats. L'acquisition des données a été réalisée avec le logiciel de contrôle ALV-corrélateur, le temps de comptage pour chaque échantillon était de 300 s. Les distributions de temps de relaxation, A  $(\tau)$  sont obtenues en utilisant la méthode CONTIN pour ajuster la fonction d'autocorrélation, et le rayon hydrodynamique est calculé selon la relation de Stockes-Einstein  $R_H = k_B.T/6\pi\eta D$ .

#### III.1.2.les résultats obtenus

Le but de notre étude était de déterminer les meilleures conditions de solubilité du xyloglucane en étudiant ses propriétés par diffusion de la lumière dans différents solvants.

Ces solvants sont connus dans la littérature pour l'étude des polysaccharides en particulier la cellulose et l'amidon dont les structures sont proches de celle du XG.

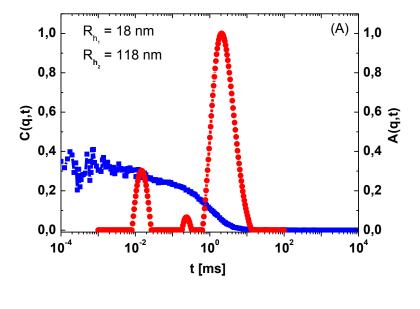
• DMAc/LiCl: ce système présente un bon solvant pour nombreux polysaccharides, tel que la cellulose <sup>180,181</sup> le mécanisme de solubilisation été largement étudié, en effet les protons des hydroxyles des unités d'anhydroglucose s'associent par des liaisons hydrogènes aux ions chloride (Cl<sup>-</sup>) qui sont associés au complexe (Li<sup>+</sup>)/DMAc. Les répulsions des charges résultantes tendraient à laisser le solvant pénétrer dans la structure du polymère. Le taux de dissolution de polymère dépend du nombre de liaisons hydrogène existantes dans la molécule initiale, la rupture des liaisons

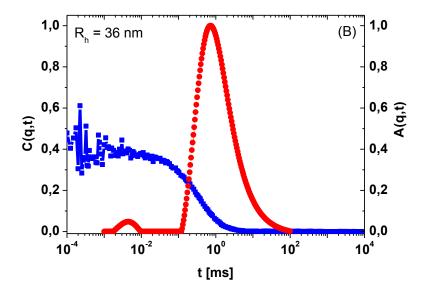
hydrogène augmente nettement le taux de dissolution<sup>182</sup>. Nous avons utilisé deux concentrations de LiCl (5%) en suivant les conditions optimales de la littérature <sup>183</sup>.

- Le diméthylsulfoxide (DMSO): est capable de dissoudre de nombreux polysaccharides, le DMSO disperse l'amidon en agissant en tant qu'accepteur de liaison hydrogène, perturbant les liaisons hydrogène inter et intramoléculaires d'amidon-amidon et d'eau-amidon, et remplaçant la liaison hydrogène des interactions entre les hydroxyles par la liaison hydrogène amidon-DMSO 184,185.
- NaOH: la solubilisation des polysaccharides en conditions alcalines peut réduire le taux d'agrégation en solution, la soude agit comme un agent chaotropique capable d'interférer avec des interactions moléculaires non-covalentes comme les liaisons hydrogène et provoque leur déstabilisation.

Le pH élevé ionise les groupes OH des polysaccharides, de telle sorte que les molécules d'hémicellulose se chargent négativement ce qui permet la réduction de taux d'interactions intermoléculaires et donc la réduction de taux d'agrégation du xyloglucane et des autres hémicelluloses <sup>186, 187</sup>.

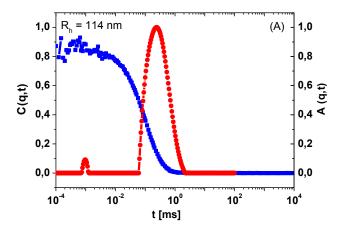
Les résultats de mesures de diffusion de la lumière pour les solutions de XG dans le DMSO et DMAc/LiCl sont présentées sur la figure III-1A et III-1B qui montrent les fonctions d'autocorrélation C (q, t) et de distribution de temps de relaxation A (t) mesurée à 90 ° obtenus en utilisant la méthode CONTIN pour les solutions de xyloglucane préparée à 1mg/ml dans le DMAc/LiCl (5%) et DMSO respectivement. Les fonctions d'autocorrélation obtenues ne sont pas parfaites et des fluctuations importantes sont présentes aux temps courts mêmes après des durées d'expérimentation suffisamment longues indiquant la présence des molécules de différentes tailles en solution, ceci montre clairement la non stabilité de XG à l'échelle moléculaire en présence de ces deux solvants.

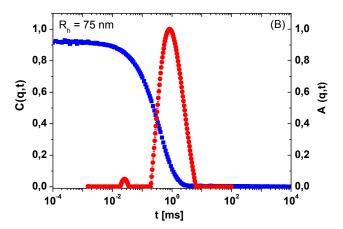


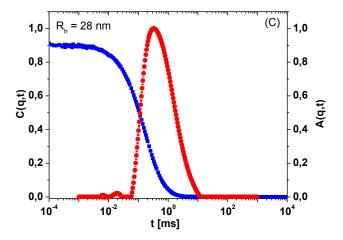


**Figure III-1:** Fonctions d'autocorrélation C (q, t) et distributions des temps de relaxation A (t) mesurée à 90° (méthode CONTIN), pour une solution du xyloglucane (Cp=1mg/ml) préparé dans : (A) DMAc/LiCl (5%) ; (B) DMSO.

Pour l'étude des solutions aqueuses, les fonctions d'autocorrélation obtenues sont beaucoup plus propres, débarrassées des fluctuations importantes au temps courts (figure III-2). On note sur la figure III-2A la présence d'une distribution de temps de relaxation large asymétrique qui montre le non homogénéité de la solution du XG préparée dans la soude (NaOH 0.1M).







**Figure III-2**: Fonctions d'autocorrélation C (q, t) et distributions des temps de relaxation A(t) mesurées à 90° ((méthode CONTIN), pour une solution du xyloglucane (Cp=1mg/ml) préparée dans : (A) NaOH (0.1M) ; (B) Eau et (C) NaNO<sub>2</sub> (0.1M).

La figure III-2B montre que pour les solutions préparées dans l'eau, la distribution de temps de relaxation obtenue suivant la méthode de CONTIN est unimodale et dont le rayon hydrodynamique vaut 75 nm, le traitement thermique de la solution n'a pas abouti à minimiser l'agrégation du XG en solution. En effet, des valeurs similaires ( $R_H = 71$  nm) ont été obtenues par Gidley et al  $^{188}$  en étudiant des solutions de xyloglucane de tamarin non chauffées par DLS.

La figure III-2C montre la fonction d'autocorrélation C (q, t) et de distribution de temps de relaxation mesurée à 90 ° obtenus en utilisant la méthode CONTIN, pour une solution de XG préparée dans nitrite de sodium (0.1M) présente une seule distribution avec un rayon hydrodynamique de 28,0 nm , des études similaires de diffusion de la lumière de solution de xyloglucane préparées dans le nitrite de sodium (0.1M) ont été effectuées pour l'étude des autres paramètres <sup>189</sup>.

Il est à noter que les petits pics qui apparaissent aux temps bas de relaxation ne peuvent pas correspondre à des particules. En effet, les tailles obtenues caractéristiques seraient plus petites que la longueur de la liaison carbone-carbone et peuvent être attribués à des artefacts de mesure dans la fonction d'autocorrélation du signal de diffusion de la lumière.

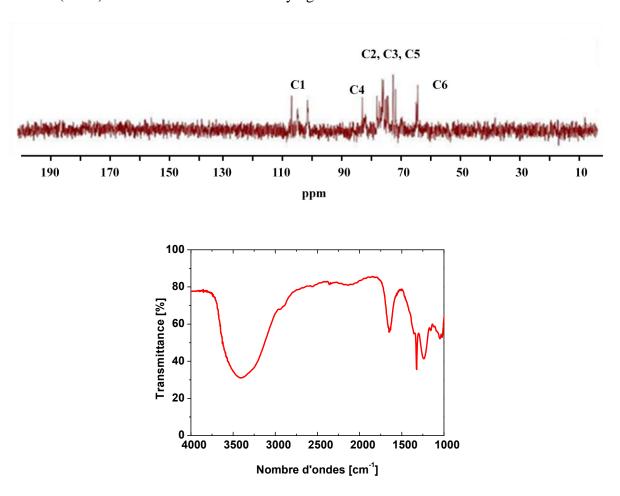
#### III.1.3.Conclusion

Nous avons étudié le comportement de xyloglucane en solution, et montré qu'il s'autoassocie en solution pour des diverses conditions.

Les meilleurs résultats sont obtenus en préparant le XG dans une solution de NaNO<sub>2</sub> (0.1M), ce résultat montre clairement l'effet de sels sur les propriétés des polysaccharides en solution. Il est décrit dans la littérature que le nitrite de sodium est largement utilisé pour l'obtention de nouveaux dérivés de polysaccharides <sup>190</sup>. Ainsi une série de D glucurono-D-glucane ayant des poids moléculaires différents a été obtenue par addition de nitrite de sodium à des solutions

d'amylose préparées dans l'acide orthophosphorique 85% <sup>191</sup> par oxydation des C3 des résidus glucoses.

Nous avons donc vérifié l'effet oxydant de NaNO<sub>2</sub> sur le XG par RMN <sup>13</sup>C liquide e pour une solution de XG (30mg) dans 500µl NaNO<sub>2</sub> deuterré (0,1M); les résultats obtenus sont présentés sur la figure III-3, le spectre RMN montre clairement l'absence de déplacement chimique caractéristique des groupements carbonyles (ppm=175), il semble donc que le XG n'était pas oxydé par NaNO<sub>2</sub> seul. Ce résultat a été confirmé par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) KBr, ou la bande caractéristique des acides carboxyliques pour l'oxydation n'est pas présentes (environ 1700 cm<sup>-1</sup>). Ce résultat montre que le nitrite sodium (0.1M) a amélioré la solubilité du xyloglucane sans modifier sa structure.



**Figure III-3** : Spectre RMN <sup>13</sup>C du xyloglucane préparé dans NaNO<sub>2</sub> (0.1M) ; Spectre d'infrarouge pour la même solution

## III.2. Etude des propriétés physico-chimiques du xyloglucane en présence de nitrite de sodium (0.1M)

La masse molaire moyenne en poids de xyloglucane a été déterminée par chromatographie de perméation sur gel en utilisant un chromatographe Waters Alliance 2000 GPCV (Etats-Unis) équipé de trois détecteurs en ligne: un réfractomètre différentiel, un détecteur viscosimétrique, et un détecteur de diffusion de la lumière (MALLS) de Wyatt (Etats-Unis), des colonnes de Shodex OHpak SB-805 HQ colonne (8mm et 300 mm); 4x ) ont été utilisées , l'éluant utilisé est une solution aqueuse contenant du nitrate de sodium NaNO<sub>3</sub> (0,1 M), l'acide éthylène diamine tétra acétique EDTA (10 mM) et de l'azoture de sodium NaN<sub>3</sub> (0,02% w/v), deux injections à une concentrations 1 x 10<sup>-3</sup> g/l d'une solution XG préparée dans le nitrite de sodium (0.1M) ont été effectuées. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus pour une solution de xyloglucane préparée dans l'éluant. (tableau III-1)

L'EDTA sert à complexer de façon préférentielle d'éventuels cations résiduels et l'azoture de sodium prévient le développement de bactéries en solution.

Solvant	Traitement	M <sub>w</sub> (x10 <sup>3</sup> g/mole)	[η] (ml/g)	R <sub>g</sub> (nm)	R <sub>h</sub> (nm)
Eluant	80°C, 2h	167	195	32	24
	_	334	354	51	25
$NaNO_2$	80°C, 2h	359	394	53	37
(0.1M)	_	459	470	42	30

**Tableau III-1:** Résultats obtenus en chromatographie de gel de perméation

Dans le cas de la solution préparée dans l'éluant, on ne note pas une grande différence entre les valeurs de masse molaire moyenne ( $M_w$ ) et rayon de giration ( $R_g$ ) obtenues en chauffant avant l'injection ou pas, les masses obtenues sont très grandes et variables, de plus les  $R_h$  obtenus diffèrent notablement de ceux obtenus en DLS .En NaNO $_2$  la masse mesurée est plus petite et le  $R_h$  conforme à celui déterminé par DLS (28~nm) Dans le cas de la solution préparée dans le nitrite de sodium, une différence au niveau de la masse molaire est notée, le

### Chapitre III Caractérisation physico-chimique du xyloglucane

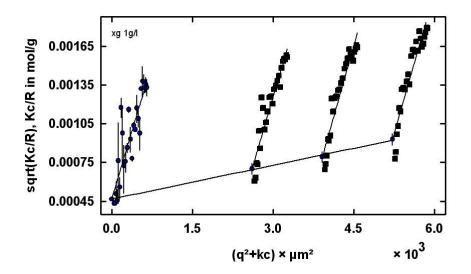
problème de non reproductibilité de la masse molaire a été largement discuté dans la littérature<sup>2</sup> il semble que le polysaccharide s'autoassocie en solution, et différentes molécules avec différentes tailles sont présentes et contribuent à la non stabilité de la solution à l'échelle moléculaire.

#### III.2.1.Diffusion statique de la lumière

Nous avons mené des expériences de diffusion statique de la lumière de solutions de xyloglucane en présence de  $NaNO_2$  (0.1M) afin d'extraire les paramètres tels que le rayon de giration ( $R_g$ ), la masse molaire moyenne en masse ( $M_w$ ) et le second coefficient du Viriel ( $A_2$ ) en utilisant le diagramme de Berry (le plus adapté pour les polysaccharides) et de comparer les données obtenues par la GPC. Les solutions préparées sont la solution (1g/l) préparée dans les mêmes conditions citées en diffusion dynamique (III.1.1) et une série de dilution (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 g/l).

Les mesures sont effectuées à différentes angles 30-140° par un pas de 5° d'une durée de 10s, le dn/dc choisi (dn/dc=0.153 ml/g) est déterminé à l'aide un refractomètre (Optilabr EXE3288) <sup>192</sup>.

Les valeurs de masse moléculaire ( $M_w$ = 4,5.10<sup>6</sup> g/mole), le rayon de giration ( $R_g$  = 133nm), et le second coefficient viriel  $A_2$  (2,659.10<sup>-7</sup> dm<sup>3</sup>/g<sup>2</sup>) sont fortement différents de ceux obtenus en GPC (figure III-4). Ceci montre la difficulté d'obtenir des données reproductibles et fiables. En effet, les agrégats présents au niveau de la solution peuvent causer des distorsions dans la dépendance angulaire de rayonnement diffusé, mener ainsi aux erreurs dans la détermination dans l'intersection avec l'axe (Kc/R) ce qui conduit a une évaluation fausse et non reproductible de  $M_w$  et  $R_g$ .



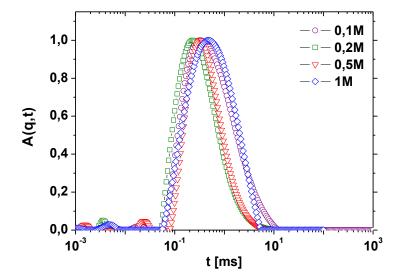
**Figure III-4:** Diagramme de Berry du xyloglucane préparé dans le nitrite de sodium (0.1M)

#### III.2.2.Diffusion dynamique de la lumière

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière réalisées sur nos systèmes préparés selon le protocole décrit en (II.1.1) à différentes concentrations en polymères mais aussi avec différents taux de sel ajouté, ont permis de mettre en évidence l'existence d'un seul mode de relaxation .

#### a) En fonction de la concentration en nitrite de sodium NaNO2

La figure III-5 montre les fonctions de distribution des temps de relaxation A(t) de solutions de xyloglucane (1mg/ml) préparées avec différentes concentrations en nitrite de sodium et mesurées à l'angle de diffusion 90° à température ambiante. Une seule distribution large de temps de relaxation est obtenue pour tous les échantillons, et les rayons hydrodynamiques caractéristiques sont présentés dans le tableau III-2, on note ici que l'augmentation de force ionique en variant les concentrations de NaNO<sub>2</sub> n'a pas d'effet significatif et une légère variation des valeurs de rayon hydrodynamique est observée.

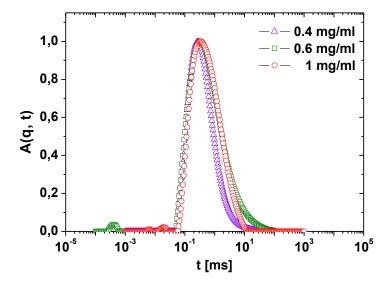


NaNO <sub>2</sub> [M]	R <sub>h</sub> [nm]
0.1	28
0.2	19
0.5	27
1	39

**FigureIII-5 :** Fonctions de distribution des temps de relaxation obtenues par l'analyse des fonctions de corrélations (méthode CONTIN) obtenues à  $90^{\circ}$  en fonction de la concentration en NaNO<sub>2</sub> pour xyloglucane à Cp=1mg/ml. **Tableau III-2:** Variations du rayon hydrodynamique en fonction de la concentration en NaNO<sub>2</sub>, C<sub>p</sub>=1mg/ml.

#### b) En fonction de la concentration en xyloglucane

La figure III-6 montre les fonctions de distribution des temps de relaxation A(t) de solutions de xyloglucane préparées à différentes concentrations dans le NaNO<sub>2</sub> (0.1M) mesurées à l'angle de diffusion de 90° à température ambiante. Des distributions larges de temps de relaxation ont été obtenues, avec un mode dominant correspondant au mouvement diffusif du xyloglucane dans la solution. Les rayons hydrodynamiques caractéristiques sont donnés dans le tableau III-3.

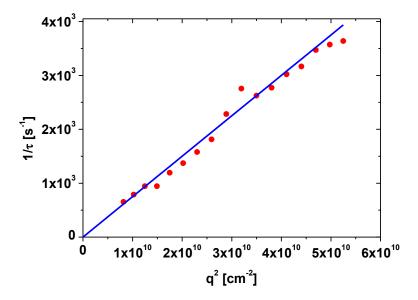


XG [mg/ml]	R <sub>h</sub> [nm]
0.4	22
0.6	27
1	28

**Figure III-6:** Fonctions de distribution des temps de relaxation obtenues par analyse des fonctions de corrélations mesurées à 90° ((méthode CONTIN) pour différentes concentrations en xyloglucane.

**Tableau III-3**: Variation de rayon hydrodynamique en fonction de la concentration en xyloglucane, [NaNO<sub>2</sub>]=0.1M.

Pour chaque concentration en polymère, les fréquences de relaxation  $(1/\tau)$  ont été déterminées par la méthode CONTIN à plusieurs angles de diffusion. Un exemple typique de l'évolution de  $\Gamma$  en fonction de  $q^2$  pour la solution de xyloglucane (1mg/ml) est représenté sur la figure III-7. Les variations proportionnelles de la fréquence de relaxation  $(1/\tau)$  avec le carré du module du vecteur d'onde  $(q^2)$  prouvent le mouvement brownien de diffusion des nanoparticules de xyloglucane, de la pente (c'est-à-dire du coefficient de diffusion des nanoparticules) de cette courbe, on peut déterminer le rayon hydrodynamique en utilisant la relation de Stokes-Einstein Rh = 32,7 nm. Le rayon hydrodynamique apparent à un angle d'observation donnée ne doit pas être confondu avec le rayon hydrodynamique obtenu à partir de la dépendance angulaire. Les deux valeurs sont proches l'un de l'autre dans le cas de nanoparticules monodisperses ce qui n'est pas le cas ici.



**Figure III-7 :** Fréquences de relaxation  $(1/\tau)$  en fonctions de  $q^2$ , Cp=1mg/ml.

En traçant les valeurs de  $R_h$  en fonction de la concentration en polymère puis, en extrapolant à concentration nulle, nous déterminons finalement la valeur du rayon hydrodynamique réel  $(R_h)$  de xyloglucane en solution et qui vaut  $R_h^{\ 0}$ =28 nm (figure III-8).

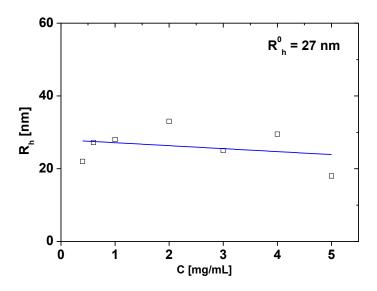


Figure III-8: Evolution du rayon hydrodynamique de xyloglucane en fonction de Cp

#### III.3.Microscopie à force atomique (AFM)

Pour compléter le travail nous avons réalisé des observations du xyloglucane en microscopie à force atomique (AFM) dans le but de visualiser des chaines individuelles du xyloglucane, et de pouvoir suivre leur hydrolyse enzymatique plus tard.

Plusieurs travaux ont montré l'importance de certains paramètres permettant l'observation des molécules individuelles de polysaccharides. Ces paramètres incluent principalement : le type de substrat utilisé, la méthode de dépôt de l'échantillon, la concentration... etc.

Nous avons donc essayé de déterminer les bonnes conditions permettant l'observation des chaines individuelles du xyloglucane en testant l'effet des paramètres cités au dessus.

#### III.3.1.Préparation des échantillons et imagerie

Pour les premières manipulations de l'AFM nous avons choisi de travailler avec des surfaces de mica puisqu'il est très facile d'utilisation, un simple clivage permet d'obtenir des surfaces planes à l'échelle moléculaire.

Nous avons testé trois techniques de préparation de l'échantillon préparé dans l'eau :

- l'évaporation d'une goutte : environ 20 μl de la suspension a été déposé sur le substrat, la goutte est ensuite évaporée dans une boite de pétri sous conditions ambiantes mais protégée de la poussière.
- -le spin coating : une goutte d'environ 100μl de solution de polymère est déposée sur le substrat, ce dernier est mis en rotation à une vitesse V=3000 rpm pendant 3 minutes, l'échantillon est ensuite gardé sous température ambiante avant de l'imager.
- -la méthode de l'adsorption : le substrat est introduit dans un bécher contenant 5ml d'une solution de xyloglucane, le temps d'adsorption est fixé pour 5-20 min, le substrat est ensuite introduit dans un bécher contenant de l'eau pure, la durée de rinçage est de 30s à quelques minutes (environ 5 min).

Les images présentées dans ce travail sont obtenues avec un AFM Pico plus (Molecular Imaging, Phoenix, USA) en utilisant un scanner piézoélectrique 100 μm x 100 μm. Nous avons travaillé en mode tapping puisque les objets observés sont des biomolécules. Les pointes que nous avons utilisées sont des pointes de tapping en silicium (VISTAprobes). Elles sont fixées sur des leviers longs de 225μm ayant une constante de raideur k= 48N.m<sup>-1</sup>, de fréquence de résonance (190 kHz). Les pointes ont une taille de 14 μm et un faible rayon de courbure (< 10 nm). Avant de commencer le balayage, il faut déterminer la fréquence de résonance du levier avec précision et de connaître la qualité de la pointe. Une bonne pointe est une pointe dont le spectre d'oscillation est relativement symétrique, on choisit une fréquence de travail proche de la fréquence de résonance.

Il est aussi important d'ajuster d'autres paramètres (excitation du levier, amplitude de travail, le gain de la boucle d'asservissement et la fréquence de balayage) et qui doivent être contrôlés durant la réalisation des images afin d'avoir des images de bonne qualité et d'éviter les artéfacts d'imagerie. Le traitement et la présentation des images (topographie, phase et amplitude) ont été réalisés à l'aide du logiciel Gwyddion. Le traitement des images a été volontairement limité à une correction du linge de base.

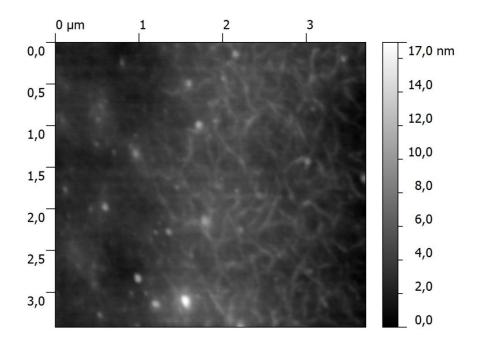
#### III.3.2.Résultats obtenus

#### a) Influence de la concentration

Il est connu qu'à de fortes concentrations, des agrégats de polysaccharides tendent à se former ce problème peut être résolu en utilisant des solutions ayant des faibles concentrations.

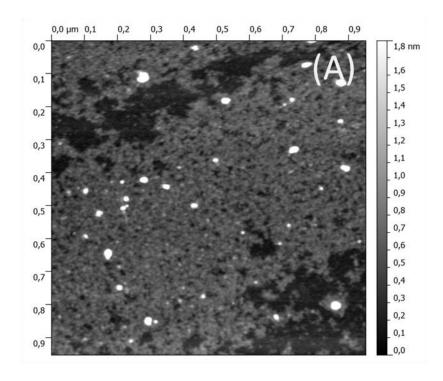
Sur la figure III-9 l'image de topographie obtenue dans l'air en mode tapping de xyloglucane déposé sur le mica à une la concentration de la solution est de 100 mg/l est présentée. A cette concentration, la surface est recouverte par des chaines de xyloglucane qui sont reliées entre elles. Les objets observés sont de part leurs dimensions (longueur de l'ordre de micromètre,

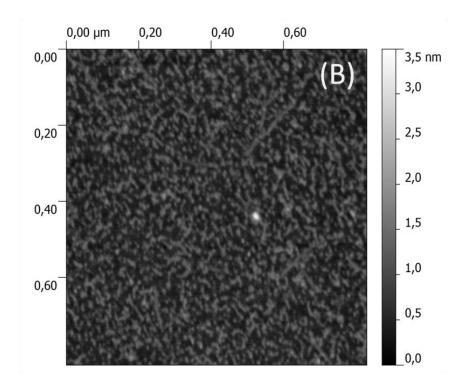
hauteur une dizaine de nanomètres) des assemblages plus ou moins fibrillaires de chaine de polysaccharides.



**Figure III-9:** Image AFM de la topographie de xyloglucane (100 mg/l) déposé sur le mica en utilisant la méthode de la goutte.

Pour essayer d'obtenir des images de chaines individualisées, des images ont été réalisées à des concentrations beaucoup plus faibles (0.25mg/l et 1µg/l) pour lesquelles des résultats ont été obtenus sur d'autres polysaccharides <sup>193</sup> comme le montre la figure **III-10** (A et B). Les résultats ne sont pas satisfaisants ; nous n'observons pas de chaines individuelles mais des zones recouvertes par des couches de XG (A), les variations de hauteur sont compatibles (de l'ordre de nm) avec une molécule adsorbée sur la surface. La surface reste malgré tout relativement inhomogène avec de grandes portions non recouvertes par le XG.





**Figure III-10 :** Images AFM de topographie du xyloglucane déposé sur le mica selon la méthode de la goutte : A) à partir d'une solution de concentration 0.25mg/l ; B) à partir d'une solution de concentration 1µg/l.

#### b) Influence de la technique de dépôt

La nature de l'échantillon a étudier est d'une grande importance pour le choix de la technique de dépôt, Balnois et al 194 ont montré que pour des polymères présentant des agrégats en solution comme le schizophyllane, la méthode de l'adsorption est la plus appropriée pour observer des molécules individuelles, en appliquant cette méthode de dépôt, nous avons réussi à observer des molécules uniques individualisées et dont les tailles s'avèrent de l'ordre d'une taille d'une chaine (figure III-11). Cependant ce résultat n'est pas reproductible même en faisant varier les différents paramètres (la durée d'adsorption et celle de rinçage).

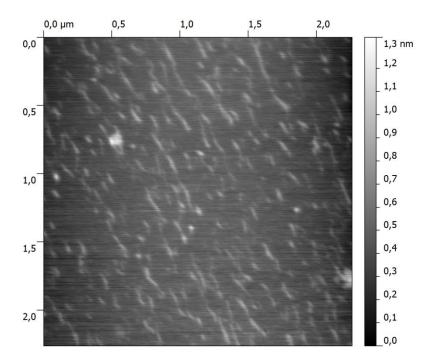


Figure III-11: Image AFM de topographie du xyloglucane déposé sur le mica selon la méthode d'adsorption.

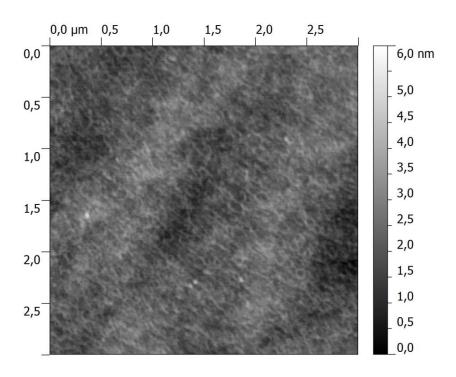
Dans le cas de dépôt par spin-coating, il n'a pas permis d'identifier la présence du polysaccharide à la surface du mica.

#### c) Influence du substrat

Nous avons aussi testé l'effet de substrat, les mêmes expériences ont été réalisées dans le cas de dépôt par goutte ou par spin-coating en utilisant le silicium comme substrat.

Ce substrat est coupé en morceaux de dimensions de l'ordre de 1cm x 1cm et sont parfaitement nettoyés en utilisant un mélange d'acide sulfurique concentré  $H_2SO_4$  et de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  ( $H_2SO_4/H_2O_2$ ; 70-30 v / v) à 80 ° C pendant une heure, suivi par rinçage intensif avec de l'eau pure, le substrat est ensuite séché par l'azote  $N_2$ .

La figure III-12 montre un exemple d'image AFM de topographie obtenue dans l'air en mode tapping pour une solution de xyloglucane préparé dans l'eau (100 mg/l) déposé sur le silicium. A cette concentration les couches de surface de silicium présente une topographie plutôt compacte et assez homogène et sont entièrement recouvertes du xyloglucane.



**Figure III-12 :** Image AFM de topographie du xyloglucane déposé sur le silicium selon la méthode de la goutte.

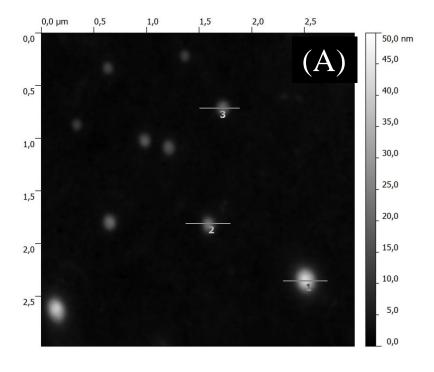
Malgré ce résultat promoteur, nous ne sommes pas parvenus (quelques que soient les conditions expérimentales utilisées : surface, concentration en polymère, méthode de dépôt), à former des films homogènes de XG avec des chaines bien individualisées sur le substrat.

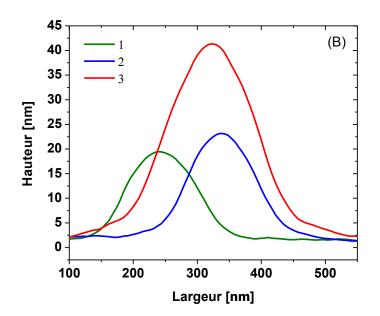
#### d) En présence de nitrite de sodium

Les résultats de diffusion dynamique de la lumière montrent que les meilleures solutions de xyloglucane sont celles qui ont été préparées en nitrite de sodium (0.1M), nous avons donc réalisé l'imagerie de ces échantillons. Une goutte de polymère est déposé sur le substrat (mica ou silicium) puis rincée avant séchage afin d'éviter la formation de cristaux de sel qui se forme en cas de séchage rapide.

La figure III-13 représente l'image AFM de topographie de xyloglucane (1mg/ml) préparé dans le nitrite de sodium (0.1M) déposé sur le silicium par la méthode de la goutte, dans ces conditions le polymère s'organise en objets sphériques ayant une hauteur comprise entre 20 et 40 nm. On peut noter de plus que la taille latérale des objets est relativement grande (100 nm). Ces résultats ne sont toutefois pas incompatibles avec les résultats obtenus par DLS : les informations obtenues par DLS sont données en diamètre qui est de 60 nm. Les nanoparticules sont aplaties lors du séchage, ceci explique leur hauteur obtenu.

La taille latérale de ces nanoparticules est aussi augmentée par le séchage et un effet de dilatation lié à la forme de la pointe (rayon de la pointe d'environ 20 nm). Les nanoparticules ne sont pas éliminées par rinçage en raison de leur forte affinité à la surface.





**Figure III-13 :** (A) Image AFM de topographie du xyloglucane préparé dans NaNO<sub>2</sub> (0.1M) et déposé sur le silicium selon la méthode de la goutte ; (B) sections correspondantes sur l'image AFM.

#### III.4.Microscopie électronique en transmission (TEM)

La morphologie des nanoparticules de xyloglucane a été examinée par la microscopie électronique en transmission (TEM).

#### III.4.1.Prétraitement des grilles carbonées

Les grilles utilisées sont en cuivre recouvertes d'un mince film-support de carbone rendues hydrophiles par effluvage (décharge plasma), qui consiste à placer les grilles carbonées entre 2 électrodes dans une enceinte en présence d'une très faible pression d'air. Une haute tension est appliquée entre deux électrodes. L'air est ionisé et les ions "décapent" la surface du film, laissant des charges résiduelles. L'effluvage dure environ 30 secondes.

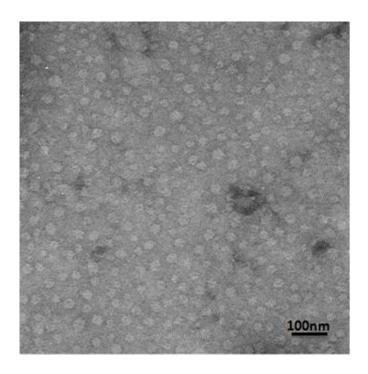
#### III.4.2.Coloration négative

Quelques gouttes de suspension de xyloglucane préparée dans le NaNO<sub>2</sub> (0.1M) sont tout d'abord déposées sur la grille de MET préalablement rendue hydrophile, après 3 minutes, l'excès de liquide est absorbé lentement avec du papier filtre. Avant séchage, on dépose une goutte de colorant (acétate d'uranyle 2% p/v), l'excès de colorant est absorbé après 3 min et on laisse l'échantillon sécher. Un mince dépôt de colorant s'est formé sur le carbone et vient souligner les contours des objets. Ceux-ci apparaissent donc en clair sur un fond plus foncé et la coloration est dite "négative".

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope Philips CM200 (FEI Company, Hillsboro, Etats-Unis) fonctionnant à une tension de 120 kV. Les images ont été enregistrées sur des plaques photo Kodak SO163.

L'image TEM de xyloglucane préparé dans NaNO<sub>2</sub> (0.1M) est présentée sur la figure III-14, il est à noter que le polysaccharide forme des nanoparticules qui ne sont pas agrégées et dont le diamètre caractéristique est 56 nm (valeur moyenne obtenue pour plus de 130 nanoparticules).

Cette mesure est compatible avec le diamètre  $2R_h = 65$  nm obtenus en diffusion de la lumière, en raison d'une compensation entre l'aplatissement des nanoparticules lors du séchage et leur rétraction causée par le colorant (l'acétate d'uranyle).



**Figure III-14**: Image TEM obtenue pour le xyloglucane préparé dans le nitrite sodium (0.1M), déposé sur des grilles carbonées et coloré négativement par l'acétate d'uranyle 2% (w/v)

#### **III.5.Conclusion**

Dans ce chapitre, nous avons réalisé une caractérisation du xyloglucane en utilisant différentes méthodes : diffusion dynamique de la lumière (DLS), diffusion statique de la lumière (SLS), chromatographie sur gel perméable (GPC), microscopie à force atomique (AFM), et la microscopie électronique en transmission (TEM). Les meilleures solutions obtenues sont celles préparées en présence de nitrite de sodium (0.1M). Nous avons montré qu'en présence de ce solvant, le xyloglucane forme des nano-objets dont le diamètre est de l'ordre de 60 nm mesuré en DLS, et leur morphologie a été examinée par AFM et TEM.

# Chapitre IV Hydrolyse enzymatique du xyloglucane

Nous avons suivi l'hydrolyse enzymatique du xyloglucane suivant différentes méthodes, celles-ci incluent principalement la viscosimétrie capillaire ainsi que d'autres techniques devenues de plus en plus utilisées pour suivre la dégradation enzymatique des biopolymères. Il s'agit de la diffusion de la lumière et de la microscopie à force atomique (AFM).

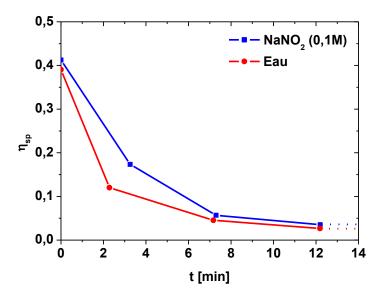
#### IV.1. Etude de l'hydrolyse enzymatique par viscosimétrie capillaire

L'action hydrolytique de la cellulase a été suivie par la mesure des changements de viscosité spécifique d'une solution de XG en fonction du temps d'incubation en utilisant un viscosimètre capillaire. Les expériences de dégradation enzymatique ont été réalisées à 25°C, avec 15 ml d'une solution de xyloglucane (1mg/ml) préparée dans NaNO₂ (0.1M) ou dans l'eau, la solution de la cellulase commerciale de *Trichoderma reesei* ayant une grande activité (≥700 U/g), elle a été diluée 10 fois dans le solvant approprié et 10 µl sont ajoutés au milieu. Le temps d'écoulement du mélange réactionnel contenant l'enzyme est mesuré durant l'hydrolyse et la viscosité spécifique est calculée selon

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

Ou t et  $t_0$  sont respectivement les temps d'écoulement de solvant et du mélange réactionnel contenant l'enzyme.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure IV-1, la viscosité spécifique diminue rapidement d'un facteur 12 et selon un temps caractéristique d'environ 4,5 min. Cette diminution est due à une décroissance en masse molaire du polymère prouvant l'activité de la cellulase. Aucun changement n'est observé après 12 min de réaction, indiquant la fin de la dégradation enzymatique dans les deux cas.

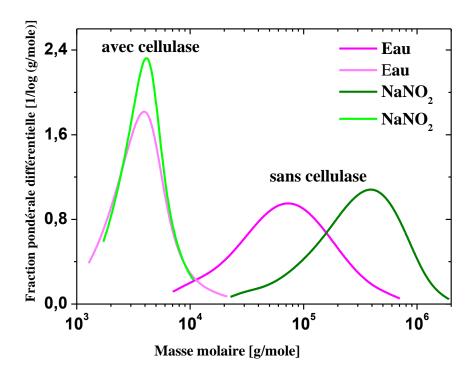


**Figure IV-1**: Variations de la viscosité spécifique ( $\Pi_{sp}$ ) en fonction de temps d'incubation pour une solution du xyloglucane préparée (1mg/ml) dans le NaNO<sub>2</sub> 0.1M ou dans l'eau incubée avec β-1-4-endoglucanase.

Les masses molaires des échantillons avant et après (1h) de traitement enzymatique ont été analysées par SEC/MALS/RI, le xyloglucane intact a été dissous à une concentration (1g/ml) dans le solvant (eau ou NaNO<sub>2</sub>), les hydrolysats sont analysés directement après la fin de suivi de la réaction par viscosimétrie.

Les données sont traitées à l'aide du logiciel ASTRA (ASTRA V 5.3.4.14 de Technology Cor et l'incrément d'indice de réfraction dn/dc = 0,153 ml/g utilisé pour les calculs a été déterminé par un refractomètre rEX d'Optilab (technologie de Wyatt). Cette analyse nous permet de suivre non seulement le poids moléculaire mais également le rayon de giration et le rayon hydrodynamique du XG. On montre que le xyloglucane a été effectivement hydrolysé par l'endoglucanase, la masse molaire du produit final atteint 4000 g/mole, i.e : 2 x la longueur de l'unité de répétition donnée en Chapitre I (figure IV-2 et tableau IV-2)

Il faut aussi noter que la distribution en taille obtenue par SEC pour le produit final nous donne une masse moyenne assez large allant de 2000g/mol à trois fois cette masse.



**Figure IV-2** : Chromatogramme représentant la fraction pondérale différentielle en fonction de la masse molaire

solvant	Cellulase	M <sub>w</sub> (x10³ g/mole)	R <sub>g</sub> (nm)	R <sub>h</sub> (nm)
Eau	+	167	32	24
	_	4.1	12	1.6
$NaNO_2$	+	359	53	37
(0.1M)	_	4.1	12	1.6

**Tableau IV-1**: Résultats de chromatographie d'exclusion stérique pour des échantillons du xyloglucan analysés avant et après traitement par la cellulase. ( $M_w$  app: masse moléculaire apparente;  $R_g$ : rayon de giration;  $R_h$ : rayon hydrodynamique).

#### IV.2. Diffusion de la lumière

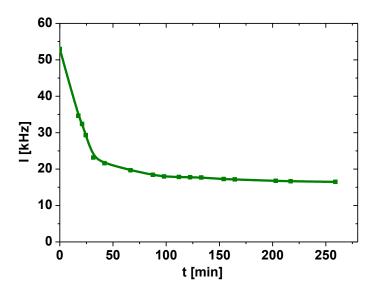
Les changements subits au cours de la digestion enzymatique du xyloglucane ont été analysés par la diffusion de la lumière. Cette technique (DLS) a montré qu'elle est un outil puissant pour élucider le processus de digestion enzymatique des polymères biologiques <sup>195, 196</sup>.

1μl de la cellulase de *Trichoderma reesei* diluée 10 fois dans le NaNO<sub>2</sub> (0.1M) est ajouté à 1 ml de la solution de XG préparée dans le même solvant à une concentration de 1mg/ml, et le

phénomène de digestion est suivi en temps réel à 25°C à l'angle 90° en analysant le comportement du polysaccharide.

La figure IV-3 montre les variations de l'intensité de la lumière diffusée en fonction de temps d'incubation du xyloglucane avec la cellulase. Dans les premières 20 minutes de l'hydrolyse, l'intensité diminue nettement quand le temps d'incubation augmente, après 100 minutes on assiste à la formation de plateau indiquant la fin de l'hydrolyse. Nous remarquons que le temps caractéristique de la réaction calculé (environ 25 min) est plus élevé que celui obtenu en mesurant les variations de la viscosité au cours de l'hydrolyse.

Les variations de rayon hydrodynamique sont présentées dans le tableau IV-2, on note la diminution en taille des nanoparticules de 28 nm à 18 nm durant les premières étapes de l'hydrolyse, puis une augmentation à une valeur de R<sub>h</sub>=43nm, cette valeur demeure stable pour le reste de temps de réaction. La fin de l'expérience est marquée par l'apparition de la distribution caractéristique de l'enzyme (R<sub>h</sub>=4nm) mesurée avant le suivi de processus.



**Figure IV-3** : Variations de l'intensité de diffusion (I) en fonction de temps d'incubation (t) mesurées par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à 90  $^{\circ}$  à 25  $^{\circ}$ C pour la suspension du xyloglucane (1mg/ml) préparé dans NaNO2 (0,1 M) incubées avec β-1-4-endoglucanase.

Temps [min]	Rayon hydrodynamique [nm]
0	28
20	18
30	26
60	32
90	41
200	43

**Tableau IV-2** : Variations de rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) en fonction de temps d'incubation (t) mesurées par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à 90 ° à 25°C pour la suspension du xyloglucane (1mg/ml) préparé dans NaNO2 (0,1 M) incubées avec  $\beta$ -1-4-endoglucanase.

Il est connu qu'une hydrolyse du xyloglucane par les cellulases de *Trichoderma reesei* en coupant des liaisons  $\beta$ -1-4 reliant les résidus glucosidiques non substitués au niveau de la chaîne principale conduit à la formation des oligo-xyloglucanes de tailles différentes.

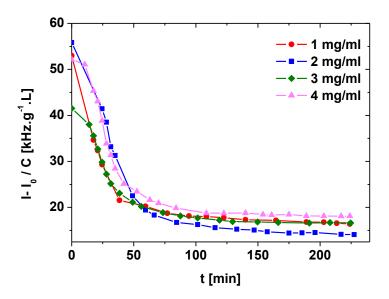
La formation des XGO entraine une décroissance de masse molaire et par conséquent la diminution de l'intensité de la lumière diffusée (I) telle que nous le constatons sur la figure IV-3. L'analyse dynamique de la lumière nous permet de mettre en évidence l'apparition d'agrégats de taille supérieure au XG initial, pour des durées supérieures à 20 min. Ces objets diffusants de grande taille diffusent certes plus la lumière que les oligomères mais la diminution globale de l'intensité nous montre bien la dégradation du polymère et une faible agrégation des produits de dégradation

### IV.2.1. Etude de l'hydrolyse enzymatique en fonction de la concentration en xyloglucane

La figure IV-4 représente les variations de (I/C) en fonction du temps d'incubation pour différentes concentrations du xyloglucane allant de 1 à 4 g/l. L'enzyme a été diluée 10 fois

avant de l'ajouter au milieu réactionnel, les expériences sont réalisées à 25°C à l'angle de diffusion 90° pour une période de 5h. Il ressort que quelle que soit la concentration en polymère utilisée, les variations de la courbe I/C sont similaires : on assiste à une diminution de l'intensité de la lumière diffusée avec le temps avec un temps caractéristique compris entre 20 et 50 minutes. Les graphiques ne sont pas complètement superposés, ce ci est peut être du à des incertitudes de mesures (homogénéité de la solution).

Cependant on peut voir que la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration initiale en xyloglucane comme attendu pour une dégradation enzymatique.



**Figure IV-4** : variations de (I/C) en fonction de temps d'incubation en présence de différentes concentrations du xyloglucane.

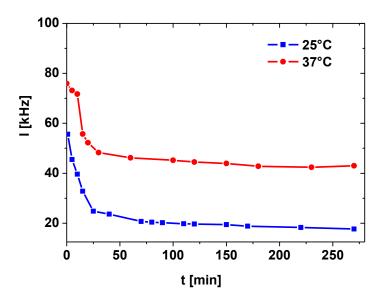
#### IV.2.2. Etude de l'hydrolyse enzymatique en fonction de température

Comme la plupart des réactions chimiques, la vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme augmente à mesure que la température est élevée. Une hausse de température contribue à renforcer l'intéraction de l'enzyme à son substrat et donc à une accélération de la vitesse de la réaction. La vitesse de l'hydrolyse augmente d'une façon exponentielle avec la température à jusqu'à une température optimale puis diminue pour atteindre une activité nulle à des grandes

températures, en effet les températures élevées affectent brusquement la structure de l'enzyme et donc son activité est modifiée.

La température optimale change d'une enzyme à une autre, pour les cellulases elle est comprise entre 40 et 50°C.

Les mesures de la diffusion dynamique de la lumière ont été effectuées à l'angle 90° à 25°C et 37°C. Il s'avère que l'augmentation de la température accélère la réaction, l'intensité diminue plus rapidement en travaillant à 37°C qu'à 25°C, les temps caractéristiques de la réaction sont  $\tau_{25^{\circ}C}$ = 33 min et  $\tau_{37^{\circ}C}$ =18 min (figure IV-5). Ce résultat prouve le caractère enzymatique de la réaction. Si l'on avait travaillé à température plus élevée la réaction aurait vraisemblablement été trop rapide pour être mesurée.



**Figure IV-5**: Variations de l'intensité de diffusion (I) en fonction de temps d'incubation (t) mesurées par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à 90 ° à 25°C et 37°C.

#### IV.3. Microscopie à force atomique

Nous avons montré dans le chapitre précédent que le xyloglucane s'est organisé en films en présence d'eau tandis qu'en présence de NaNO<sub>2</sub> (0.1M) il s'organise en objets nano-organisés dont la taille est de 60 nm.

#### IV.3.1. Suivi direct de l'hydrolyse enzymatique

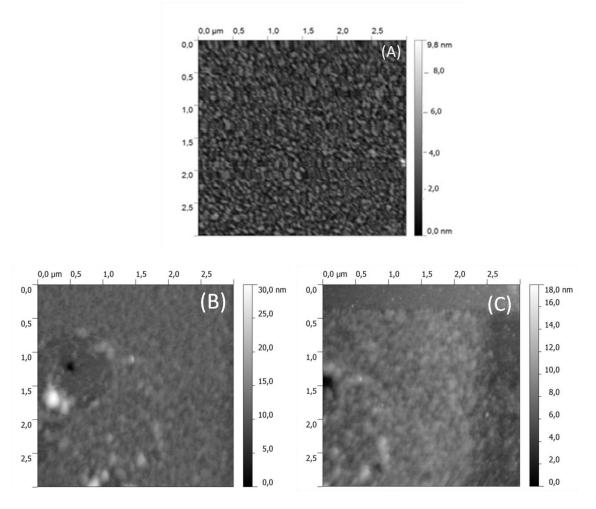
Nous avons essayé de suivre à l'aide de la microscopie à force atomique le phénomène de l'hydrolyse du xyloglucane par la cellulase pour les films et pour les nanoparticules.

Pour les films, le suivi a été réalisé en temps réel par imagerie en solution . Le XG (0.1 mg/l) déposé sur le mica est d'abord imagé sous l'eau, avant d'injecter un volume d'environ 20 μl de la cellulase concentrée, au milieu réactionnel à l'aide de l'une des ouvertures de la cellule liquide. L'imagerie est réalisée en tapping mode et un grand nombre de scan a été effectué. Les résultats sont apportés sur la figure IV-6. La figure IV-6A présente l'image AFM de topographie obtenue pour XG observé dans l'eau, l'aspect obtenu est similaire à celui obtenu en imageant dans l'air. On peut noter que les chaines semblent plus gonflées que dans l'air. Obtenir une image de l'action de l'enzyme s'est avéré une tache compliquée : en effet les dimensions de l'enzyme (R<sub>h</sub>=4nm) doivent permettre une identification de celle-ci à la surface de l'échantillon. Cependant elle semble s'adsorber sur la surface de la pointe de l'AFM nous empêchant ainsi de suivre son action : au cours des expériences la pointe AFM subit un changement brutal ne permettant plus d'image correctement la surface du substrat,

Pour résoudre ce problème une protection de la pointe a été réalisée en adsorbant une couche de PEG à sa surface <sup>197</sup>. La figure IV-6B pu ainsi être réalisée, elle présente l'image AFM de topographie obtenue après 1h d'imagerie, nous pouvons remarquer la présence d'une zone sombre découverte de polysaccharide (peut être due à une hydrolyse enzymatique du xyloglucane) bordée de protubérances qui peuvent être liées à la présence d'enzymes sur la

surface. En continuant l'imagerie en déplaçant légèrement l'échantillon, nous nous retrouvons dans la situation présentée dans la figure IV-5C sur laquelle on peut remarquer dans le bord supérieur de l'image une différence entre la zone nouvellement imagée et l'observation précédente : les chaines de XG ont été comme partiellement désorbées ; la surface est plus rugueuse, Il est possible que les chaines de PEG présentes à la surface de la pointe soient à l'origine de ce problème.

La contamination de la pointe ainsi que la difficulté de visualiser des chaines individuelles constituent un obstacle à l'achèvement de l'observation directe de la dégradation enzymatique. Ceci nous a obligés de passer à des observations indirectes.



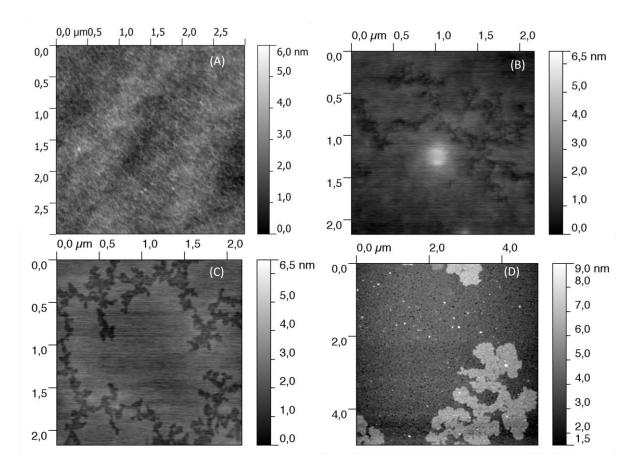
**Figure IV-6**: Images AFM de topographie de la dégradation de XG par la cellulase imagerie directe dans l'eau : A) sans l'enzyme  $(t_0)$ , B) 1h, C) fin.

#### IV.3.2. Incubation des surfaces avec la cellulase

peut plus être hydrolysée par l'enzyme.

Des surfaces (mica ou silicium) sur lesquelles le XG est déposé sont incubées avec l'enzyme pour différentes périodes (1h, 4h, et 12h), et sont rincés abondamment à l'eau avant l'imagerie à l'air. La figure IV-7 montre les images AFM de topographie obtenues dans le cas d'incubation des surfaces de silicium avec la cellulase, la concentration en xyloglucane est de l'ordre de 100 mg/l. La figure IV-7B est obtenue après 1h d'incubation et marquée par l'apparition des zones ayant un contraste différent, ressemblant à des lignes de fracture dans la couche de xyloglucane, la hauteur de cette couche est d'environ 3 nm, ce qui correspond à l'épaisseur d'une couche seule de xyloglucane.

Plus on laisse l'échantillon incuber plus il y a une grande surface qui est digérée ces zones s'agrandissent au fur et a mesure avec l'augmentation du temps d'incubation, au bout de 4h (figure IV-7C). A la fin (figure IV-7D), les zones sont beaucoup plus grandes et la surface n'est plus que partiellement recouverte par le xyloglucane. Le temps d'action de l'enzyme sur une surface est très notablement plus grand que sur l'échantillon en solution, ce ci est probablement du au fait que le xyloglucane doit se désorber de la surface pour être dégradé. Dans le cas d'utilisation du mica comme substrat, les résultats obtenus montrent clairement l'inexistence d'une différence de structure entre les images obtenues pour différentes périodes et l'état t<sub>0</sub>. II semble donc que le mica conduit à une adsorption forte du xyloglucane qui ne



**Figure IV-7**: Images AFM de topographie obtenu pour une solution de XG préparée dans l'eau (100mg/l), déposé sur silicium et incubées avec  $\beta$ -1-4-endoglucanase A) avant B) après 1h, C) pendant 4 h, et D) après 12h.

#### IV.3.3. Incubation des solutions

Des solutions du xyloglucane (0.1mg/ml) sont incubées avec 20 µl de la cellulase pour différentes périodes, la réaction est stoppée par chauffage à 100°C (dénaturation de l'enzyme) et une goutte (2 µl) de chaque solution a été déposée sur le mica. L'imagerie est réalisée en mode tapping à l'air.

La figure IV-8 représente une série d'images AFM de topographie obtenues après le traitement enzymatique des solutions de XG par la cellulase. Ces images doivent être comparées à la figure IV-8A déjà obtenue en chapitre précédent et qui présente l'état initial t<sub>0</sub> où aucun traitement enzymatique n'a été effectué. Après 10 min d'incubation (figure IV-8B), on peut remarquer que la surface devient moins dense en chaînes et que le nombre de chaînes

0,0

0,5

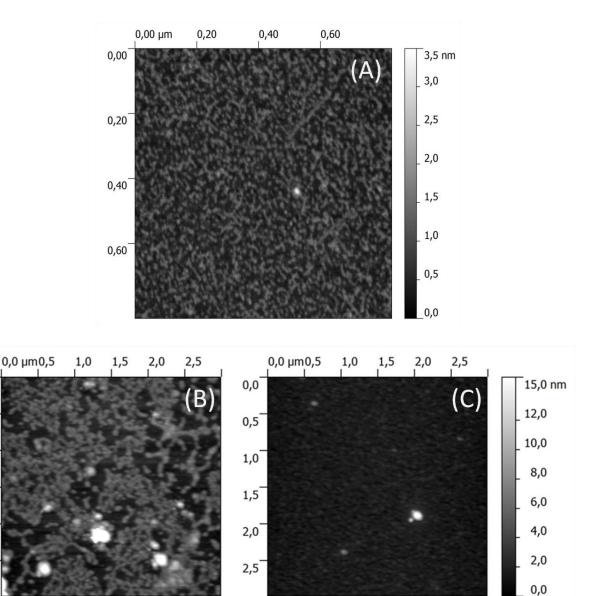
1,0

1,5

2,0

2,5

diminue en comparaison avec la première image (t<sub>0</sub>), les chaines sont dispersées et des petits agrégats sont présents à la surface. Après un temps suffisamment long, la surface présente un aspect granuleux (figure IV-8C), et qui ne peut pas être comparable avec l'état t<sub>0</sub>.



**Figure IV-8 :** Images AFM de topographie obtenue pour une solution de XG (0.1 mg/ml) incubées avec  $\beta$ -1-4-endoglucanase A) sans enzyme, B) après 10 min, et C) après 2h.

#### IV.3.4. Hydrolyse enzymatique des nanoparticules à base de xyloglucane (NP-XG)

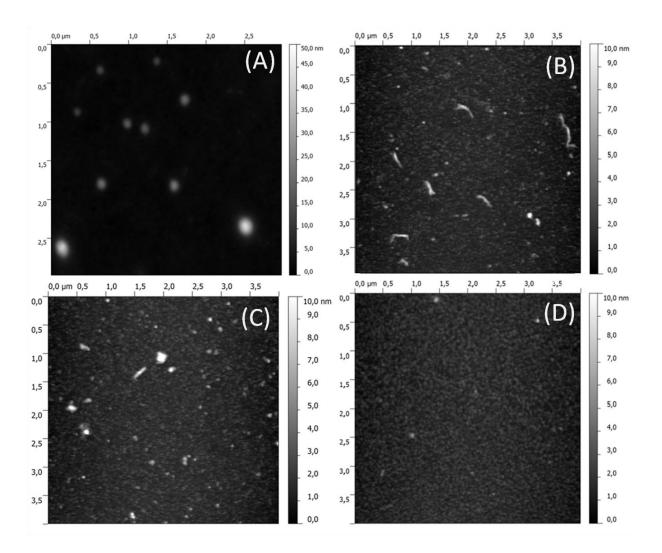
Les nanoparticules séchées sur silicium sont incubées avec l'enzyme pour différentes périodes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau et laissés à sécher sous conditions ambiantes.

La figure IV-9 montre les images de topographie obtenues après traitement pour différentes périodes d'incubation.

Ces images doivent être comparées avec l'image obtenu en chapitre III et qui a été obtenue avant l'ajout de l'enzyme et peut donc être défini comme l'état initial, cette image reflète clairement la présence xyloglucane sous la forme de nanoparticules seulement. (figure IV-9A) Après une incubation des nanoparticules avec l'enzyme pendant 30 min, les chaînes sont visibles dans l'image (figure IV-9B), et un peu de nanoparticules d'un diamètre de 5 à 12 nm sont présentes.

L'image AFM dans la Figure IV-9C a été obtenue après incubation avec l'enzyme pendant 1 heure, et révèle que la plupart des chaînes courtes ont été dégradées, mais quelques petites particules (5 à 12 nm) existent encore.

L'image finale (figure IV-9D) obtenu après 4 h d'incubation montre qu'après un temps d'incubation suffisamment long nous n'arrivons pas à trouver les nanoparticules, malgré des recherches étendues sur la surface. Cela confirme que l'enzyme peut exercer une activité sur les nanoparticules à base du xyloglucane adsorbées sur une surface. Les images montrent également que la microscopie à force atomique peut être utilisée pour investiguer le processus de l'hydrolyse enzymatique de nanoparticules. En outre, le mécanisme d'action de la cellulase sur les nanoparticules à base de xyloglucane peut être deviné: Avant de couper le  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4), l'enzyme déroule les nanoparticules (figure IV-9B). L'image indique également que la durée de dégradation est plus lente que celle obtenue par diffusion de lumière. Nous pensons que cela est lié à un effet de surface.



**Figure IV-9**: Hydrolyse enzymatique des nanoparticules à base de xyloglucane (1mg/ml) par la  $\beta$ -1-4-endoglucanase : A) avant l'ajout de l'enzyme, B) après 30min, C) après 1h, et D) après 4h.

# Chapitre V Modifications chimiques du xyloglucane

plus particulièrement de nanoparticules est devenu très important pour la délivrance de médicaments. Ces systèmes biocompatibles et biodégradables assurent différentes fonctions : amélioration l'activité des médicaments, diminution de ses effets secondaires, protection contre la dégradation in vivo, stabilité et capacité de contrôler la libération des médicaments. Différents polymères ont été utilisés pour la préparation des nanoparticules : l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), la polycaprolactone, les protéines et les

Au cours des dernières décennies, le développement de systèmes à base de biopolymères et

En plus de leur diversité, stabilités, biocompatibilité, et biodégradabilité, les polysaccharides possèdent des groupements réactifs (les hydroxyles) qui peuvent être modifiés par différentes voies chimiques (estérification, éthérification, oxydation...), Ils permettent ainsi la création de nouveaux dérivés capables d'être conjugués à des médicaments améliorant ainsi les propriétés des médicaments (activité améliorée et réduction des effets secondaires...), la protection contre la dégradation enzymatique et assurant une libération contrôlée et ciblée.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la préparation de conjugués xyloglucanecytarabine via une réaction de couplage peptidique.

# Modifications chimiques du xyloglucane

polysaccharides. Ces derniers sont les plus couramment utilisés.

Les hydroxyles présents sur les chaines de polysaccharides peuvent être modifiés par des réactions chimiques différentes (estérification, éthérification, oxydation...) Nous nous sommes intéressés au dernier type de réaction l'oxydation et plus particulièrement à l'oxydation des alcools primaires. L'oxydation permet de modifier la réactivité chimique des polysaccharides et la création d'un site réactif : un groupement carboxyle en position C6 et qui peut être couplé à des principes actifs contenant des groupements amines dans leurs structures.

Différentes stratégies d'oxydation sont décrites dans la littérature :

## • Oxydation par nitrite/nitrate :

En présence d'acide phosphorique(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ou d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré, cette méthode permet l'oxydation des hydroxyles primaires avec un rendement supérieur à 80% et un degré d'oxydation de l'ordre de 80 à 90%. Cependant la réaction n'est pas spécifique et une oxydation peut se réaliser au niveau des alcools secondaires (C2 et C3) <sup>198</sup>.

## • Oxydation catalysée par des radicaux nitroxydes :

Le plus utilisé est le 2, 2, 6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle (TEMPO), en présence d'hypochlorite de sodium (NaOCl) et de bromure de sodium (NaBr). Ce système permet d'oxyder les alcools primaires sans affecter les alcools secondaires. En plus de sa sélectivité, cette stratégie est plus rapide, bien contrôlée et les rendements sont élevés (jusqu'à 95%) <sup>199-202</sup>

## V. Oxydation sélective des alcools primaires par TEMPO

## V.1. Le 2, 2, 6, 6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle (TEMPO)

C'est un radical nitroxyde remarquable connu sous le nom de TEMPO reporté pour la première fois par Lebedev et Kazarnovskii en 1960 <sup>203</sup> obtenu par oxydation de la 2, 2, 6,6-tétraméthylpipéridine. Il est caractérisé par la délocalisation d'un électron célibataire entre l'atome d'azote et l'atome d'oxygène qui lui confère une stabilité relative. Le TEMPO (1) peut être oxydé en sel d'oxoammonium (2) ou bien réduit en hydroxylamine (3) (figure V-1).

**Figure V-1 :** Oxydoréduction du radical nitroxyde TEMPO

L'oxydation sélective des alcools primaires par le système TEMPO/NaOCl/NaBr a été proposée en premier temps pour les polysaccharides solubles, l'amidon, l'inuline, l'amylodextrine, le pullulane, l'amylopectine, le chitosane et le galactomannane, 199-202,204 avant d'être appliquée pour améliorer la solubilité des polysaccharides insolubles dans l'eau tels que la cellulose, l'amylose et la chitine pour élargir leurs domaines d'applications 202,204-208

## V.2. Mécanisme de l'oxydation

L'hypochlorite de sodium (NaOCl) oxyde le bromure de sodium pour donner l'hypobromite de sodium (NaOBr). Ce dernier oxyde le radical TEMPO (1) en ion oxoammonium (2). Cet ion va, à son tour, oxyder les hydroxyles primaires des polysaccharides en aldéhydes en libérant une molécule d'hydroxylamine (3). Ensuite, les aldéhydes se transforment en acides carboxyliques par le même principe d'oxydation (Figure V-2).

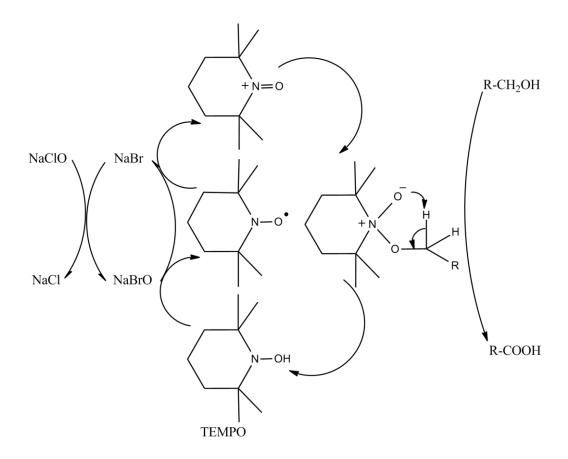


Figure V-2: Mécanisme de l'oxydation par le système TEMPO/NaOCl/NaBr

Pendant la réaction, les paramètres ajustables sont la concentration des réactifs, le pH et la température. L'augmentation de la température peut causer une dégradation du polymère, des températures 0-5°C sont préférables. A pH élevés (supérieur à 9) des réactions de dégradation comme la β élimination peuvent avoir lieu, Ainsi à des pH inférieur à 9 seule des oxydations des alcools secondaires peuvent avoir lieu <sup>209, 210</sup>, le pH est maintenu par ajout d'une solution alcaline comme NaOH ou KOH.

Le bromure de sodium est utilisé pour régénérer l'oxydant qui est l'ion oxoammonium, luimême régénéré par l'hypochlorite de sodium <sup>211</sup>.

Dans ce type d'oxydation, le véritable oxydant est en fait l'ion oxoammonium (2), qui est obtenu à partir du radical TEMPO (1). Au cours de l'oxydation, l'ion oxoammonium (2) est réduit en hydroxylamine (3) qui est immédiatement transformée en radical (1) <sup>211,212</sup>.

#### V.3. Oxydation de xyloglucane

Le xyloglucane (1g) est solubilisé dans 300 ml d'eau pendant une nuit. La solution a ensuite été traitée avec le TEMPO (2, 2, 6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle) (0,003g ou 0,002 mmole), NaBr (0,015 g ou 0,14 mmole), et l'hypochlorite de sodium (6 ml ou 12.5 mmoles à 15%), et est laissée en agitation sous l'azote à 3 ° C pendant (4h) <sup>196</sup>. Le pH de la solution est ajusté à 9.3 et maintenu au cours de la réaction par une solution de NaOH (0.1M). A la fin du processus, 21.5 mg de NaBH<sub>4</sub> et 3 ml d'éthanol sont utilisés pour arrêter la réaction <sup>199, 200,204</sup> en agitant la solution pendant 45 min.

A la fin du processus, le pH est ajusté à 8 par ajout de HCl 0.1M avant une précipitation de la solution par 2 volumes d'éthanol, le produit est centrifugé (7000 g, 20 min), filtré et séché à 30°C.

## V.3.1. Caractérisation du xyloglucane oxydé

## a) Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Afin d'effectuer les analyses FTIR, l'échantillon est préparé sous forme acide oxydé en faisant passer la solution à travers une résine cationique (H <sup>+</sup>). Ceci permet d'éviter la superposition de la bande (C=O) avec la bande de la liaison hydrogène vers 1650 cm<sup>-1</sup>.

Les analyses ont été effectuées en utilisant un spectromètre ET-IR Perkin-Elmer 1720X, avec du KBr comme support sur une gamme allant de 400 à 4000 cm<sup>-1</sup>, 20 scans ont été accumulés avec une résolution de 2 cm<sup>-1</sup>.

## b) Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses de résonance magnétique nucléaire RMN  $C^{13}$  ont été effectuées à 60°C à l'aide d'un spectromètre Bruker Advance 400, les échantillons de xyloglucane (20 mg) avant et après l'oxydation ont été dissous dans 500 $\mu$ l de  $D_2O$ .

## c) Résultats obtenus

La figure V-3 montre les spectres de FTIR obtenus pour les échantillons de XG sans modification chimique. Il présente les bandes caractéristiques des polysaccharides (tableau V-1)

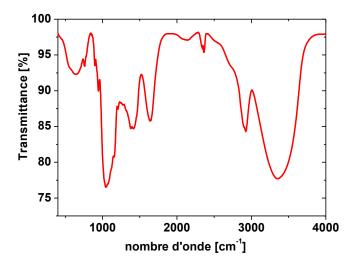


Figure V-3 : Spectre infrarouge du xyloglucane non modifié

Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Liaison	Intensité
3700-3000	ОН	Forte
2920-2887	С-Н	faible
1200-1000	C-O ; C-C	forte
900-800	C-O ; C-C	moyenne

Tableau V-1: Attribution des principales bandes observées sur le spectre infrarouge

Le spectre de xyloglucane oxydé (figure V-4) est caractérisé par l'apparition d'une bande vers 1738 cm<sup>-1</sup> et qui correspond à la présence d'un groupe carboxyle, la bande vers 1646 cm<sup>-1</sup> corresponds à l'eau adsorbée. Ce résultat confirme qu'une oxydation a eu lieu <sup>214</sup>.

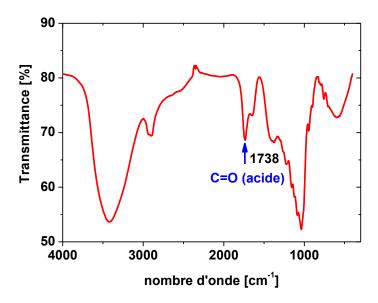


Figure V-4 : Spectre infrarouge du xyloglucane oxydé

La figure V-5 présente les spectres RMN <sup>13</sup>C obtenus à 60°C pour le xyloglucane avant et après oxydation, le spectre correspondant au XG non modifié montre la présence des déplacements chimiques caractéristiques cités dans la littérature.

Le signal qui apparait vers 62 ppm correspond au carbone C6, les signaux qui apparaissent entre 70 et 80 ppm sont attribuées aux carbones C2, C3 et C5. Le carbone C4 est identifié vers 81 ppm, enfin le signal qui apparait vers 105.6 ppm correspond au carbone C1<sup>215</sup>.

Sur le spectre correspondant au xyloglucane oxydé, nous remarquons une diminution de l'intensité du pic (62 ppm) attribué au carbone C6 ce qui témoigne d'une modification de l'environnement chimique de ce carbone. Au niveau de la région C1, on note une diminution de l'intensité du pic à 105.6 ppm et l'émergence d'un nouveau pic vers 104.6 ppm et qui pourrait être liée aux résidus β-D-galacturoniques des unités acide <sup>216</sup>. Enfin

nous assistons à l'apparition d'un nouveau pic vers 175.7 ppm qui correspond aux groupes carboxyles en C6 formés au cours de l'oxydation par le système TEMPO/NaOCl/NaBr <sup>214</sup>.

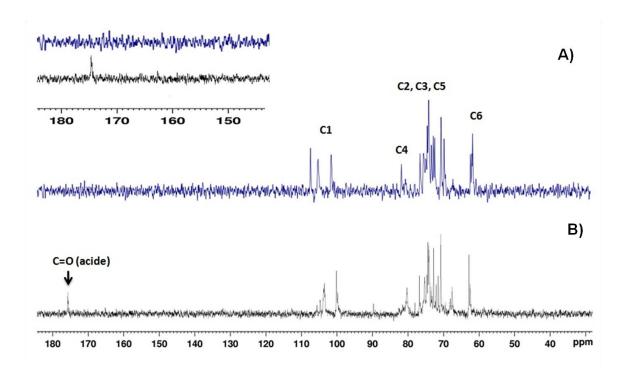


Figure V-5: Spectre RMN <sup>13</sup>C de xyloglucane: A) original; B) oxydé

#### V.3.2. Détermination du degré d'oxydation (DO)

Le degré d'oxydation des échantillons oxydés a été déterminé par dosage conductimétrique. Cette méthode est très fiable, rapide, non destructive et donne des résultats reproductibles mais elle nécessite un minimum de produit (30 – 50 mg). 30 mg de xyloglucane non modifié (XGT) et le xyloglucane oxydé (XGT<sub>0</sub>) ont été dispersés dans 15 ml d'une solution HCl (0.01M). Après 10 min d'agitation, les solutions sont titrées par une solution de NaOH (0.01M) en utilisant un conductimètre CDM 210 équipé d'une électrode CDM 614T.

On obtient une courbe qui, après interprétation permettra de déterminer le DO du nouveau produit. La courbe obtenue présente trois parties et deux points d'équivalence  $V_1$  et  $V_2$  (figure  $V_2$ -6)

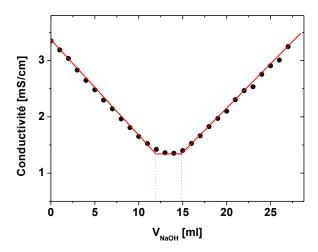


Figure V-6 : Courbe de dosage conductimétrique d'un échantillon oxydé

La première partie correspond à la neutralisation de l'excès de  $H^+$ . La deuxième partie correspond à la neutralisation des groupes carboxyles de notre échantillon. Enfin, la troisième partie correspond à un excès d' $OH^-$ .  $V_1$  est le point d'équivalence entre la première et la deuxième partie,  $V_2$  est celui entre la deuxième et la troisième partie. La différence  $(V_2-V_1)$  correspond donc au volume de soude nécessaire pour neutraliser les groupes carboxyles présents dans l'échantillon. Le (DO) est calculé selon l'équation donnée par Da Silva Perez et al  $^{214}$ :

$$DO = \frac{1261xnCOONa}{m - (36 - nCOONa)}$$

Avec  $n_{COONa} = (V_2-V_1) \times [NaOH]$ , m est la masse en gramme d'échantillon dosé.

1261 correspond à la masse molaire moyenne d'une unité répétitive du XG.

36 = 198 – 162 où 198 est la masse molaire d'une unité de glucose oxydé sous forme sel de sodium.

162 est la masse molaire d'une unité glucose engagé dans une liaison osidique.

Avec cette méthode nous avons obtenu un degré d'oxydation DO=40 %.

#### V.4. Le couplage avec des amines.

## V.4.1. Mécanisme de couplage avec les amines

La création d'une liaison amide entre un groupement carboxylique et une amine nécessite une activation, le plus souvent c'est celle de l'acide carboxylique. Les techniques de conjugaison les plus populaires couramment utilisées dans le cas des polysaccharides sont celles qui utilisent les carbodiimides comme agent de couplage <sup>217, 218</sup>.

Le premier carbodiimide utilisé pour les réactions de couplage a été le dicylohexyl-carbodiimide DDC ( $R_1=R_2=$  cyclohexane), cependant son insolubilité dans l'eau a limité son utilisation et il a été remplacé par d'autres agents, parmi lesquels on cite Le 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochlorure (l'EDAC;  $R_1=$  éthyl;  $R_2=$  3-diméthylaminopropyl). Cet agent est soluble dans l'eau.

La réaction de couplage est une réaction nucléophile rapide, qui se fait sans aucune modification du polysaccharide <sup>219</sup>. Le carbodiimide réagit avec l'acide carboxylique pour former un intermédiaire instable l'O-acylurée. Cet intermédiaire réagit avec l'amine pour donner un dérivé amide du polysaccharide dans lequel le groupe carboxylique est lié à une autre amine (figure V-7).

RCOOH 
$$+R_1N=C=NR_2$$

RCOOH  $+R_1N=C=NR_2$ 

Figure V-7 : Mécanisme de couplage avec les carbodiimides

Au cours de couplage, des réactions secondaires peuvent avoir lieu, l'intermédiaire instable (l'O-acylurée) se réarrange en un produit stable le N-acylurée (figure V-8).

$$R = R_{1/2}$$
 $R = R_{1/2}$ 
 $R = R_{1/2}$ 

Figure V-8 : Réarrangement de l'intermédiaire O-acylurée

Afin d'éviter ce réarrangement et d'augmenter l'efficacité de l'EDAC, des agents d'activations ont été associés aux carbodiimides, parmi lesquelles on trouve le N-hydroxysuccinimide (NHS) <sup>220</sup> qui forme un ester stable plus réactif ou aucun réarrangement n'est possible (figure V-9). Le rendement de la réaction ne dépend pas de la quantité de NHS ajouté, cependant il est a noté qu'aucun couplage n'aura lieu en son absence <sup>221</sup>.

Figure V-9 : Activation de l'O-acylurée par le N-hydrosuccinimide

## V.4.2. La cytarabine

La cytarabine (figure V-10), ou la cytosine arabinoside, est un agent chimio-thérapeutique efficace utilisé principalement pour le traitement des cancers de globules blancs tels que la leucémie aiguë myéloblastique (LMA) et les lymphomes non hodgkiniens <sup>222, 223</sup>.

Il appartient à la famille des analogues de nucléosides, c'est un analogue de pyrimidines. La cytarabine appelée aussi L'araC, aracytine, 1-β-D-arabinofuranosylcytosine diffère de la cytidine au niveau du sucre.

Les analogues de nucléosides sont des médicaments inactifs qui traversent la membrane cellulaire par le biais de transporteurs spécifiques. Ils subissent plusieurs étapes de phosphorylation intracellulaire qui permettent la production et l'accumulation des métabolites actifs, les dérivés di et triphosphates. Ces derniers exercent l'activité cytotoxique des analogues de nucléosides par interaction avec les enzymes (ADN polymérase et ARN polymérase) du métabolisme des nucléotides physiologiques et par incorporation dans l'ADN et l'ARN, induisant ainsi la mort cellulaire par apoptose. Malgré la connaissance de plus en plus importante concernant les protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose par les analogues de nucléosides, le mécanisme exact reste peu connu. Cependant, il semble qu'il varie en fonction de l'analogue utilisé. Quant au rôle joué par l'incorporation d'analogues de nucléosides dans l'ARN dans ce phénomène d'apoptose, il reste très controversé <sup>224</sup>.

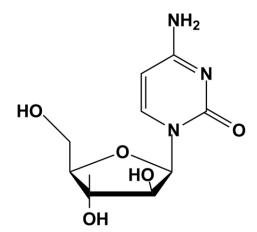


Figure V-10 : Structure de la cytarabine

Toutefois, son utilisation est limitée par sa demi-vie plasmatique courte, sa faible lipophilie, la nécessité de son activation par phosphorylation biologique, et sa faible résistance aux enzymes telle que la cytidine désaminase qui catalyse la transformation de la cytarabine (Ara C) en métabolite biologiquement inactif le 1-β- D arabinofuranosyluracile (Ara U) <sup>225</sup>.

Des dérivés de cytarabine ainsi que des conjugués ont été conçus avec l'intention d'augmenter sa stabilité, sa lipophilie, par exemple l'ancitabine, l'enocitabine et le fostabine ont été utilisé cliniquement au Japon <sup>225-227</sup>. La conjugaison de la cytarabine peut protéger le groupe amine de la désamination et provoque des changements de paramètres pharmacocinétiques <sup>228</sup>.

Des conjugués de cytarabine avec des polysaccharides contenant des groupes carboxyliques tels que l'acide polygalacturonique (PGA) et le carboxyméthyl  $\beta$ -D-glucane (CMG) ont été préparés par activation de groupe carboxylique de polysaccharide par l'isobutylchloroformiate et formation d'un conjugué par une réaction de couplage. Ces conjugués sont plus résistants à l'hydrolyse enzymatique dans des conditions acides douces  $^{229}$ .

#### V.4.3. Essai de couplage du xyloglucane avec la cytarabine

Nous avons essayé de préparer des conjugués xyloglucane-cytarabine via un couplage peptidique. Les essais ont été conduits dans les conditions expérimentales suivantes :

Les réactifs sont introduits dans les quantités suivantes :

Xyloglucane: 1% (w/v), EDAC: 4 éq, NHS: 4 éq, Cytarabine: 4 éq,

La cytarabine a été ajouté à la solution aqueuse de xyloglucane oxydé et agité jusqu'à dissolution. Le pH est ajusté à 7-7.5 avant l'ajout de 2 ml d'une solution contenant l'EDAC et le NHS. La réaction à été conduite durant 24 h à température ambiante.

Le produit a été purifié par ultrafiltration pour éliminer l'excès d'agents de couplage ainsi que la cytarabine non conjuguée. Le produit est ensuite caractérisé par infrarouge en utilisant le KBr comme support et résonance magnétique nucléaire  $(H^1)$  dans  $D_2O$  à  $25^{\circ}C$ .

La figure V-11 montre le spectre de l'infrarouge obtenu pour des conjugués XG-Cyt sous forme acide, le spectre montre l'existence d'une bande à 1642 cm<sup>-1</sup> qui peut être attribuée à la formation d'une liaison amide entre le NH<sub>2</sub> de la cytarabine et le COOH du xyloglucane oxydé, cependant nous n'observons pas clairement l'autre bande caractéristique des liaisons amides qui est vers 1550 cm<sup>-1</sup>.

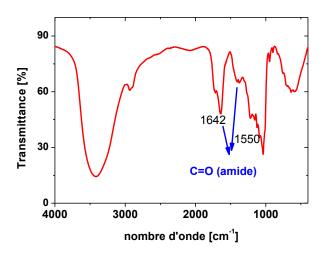


Figure V-11: Spectre infrarouge obtenu après un essai de couplage

Le résultat de RMN <sup>1</sup>H (figure V-12) montre la présence de cytarabine mais en très faible intensité (pic 7,6 ppm correspondant à l'azote). Le spectre montre aussi que la méthode de purification qu'on a utilisé (l'ultrafiltration) n'était pas efficace. Les agents de couplage existent dans le produit final (1,05; 1,13; 1,83; 1,87 et 1,96 ppm corresponds à l'EDAC, 3,08 ppm corresponds à NHS et des impuretés inconnues vers 3,15 ppm).

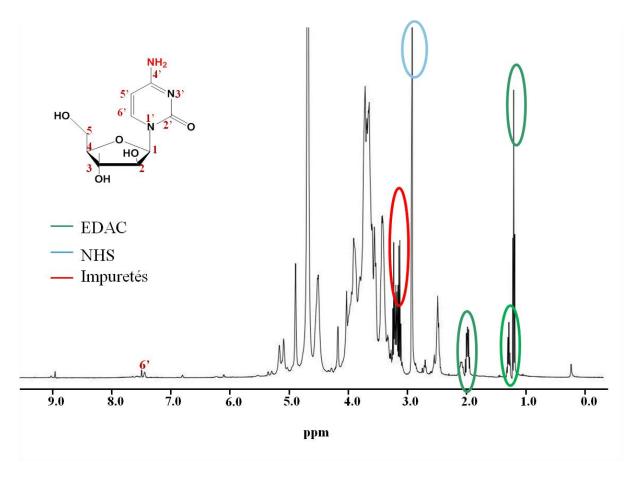


Figure V-12 : Spectre RMN <sup>1</sup>H obtenu après un essai de couplage

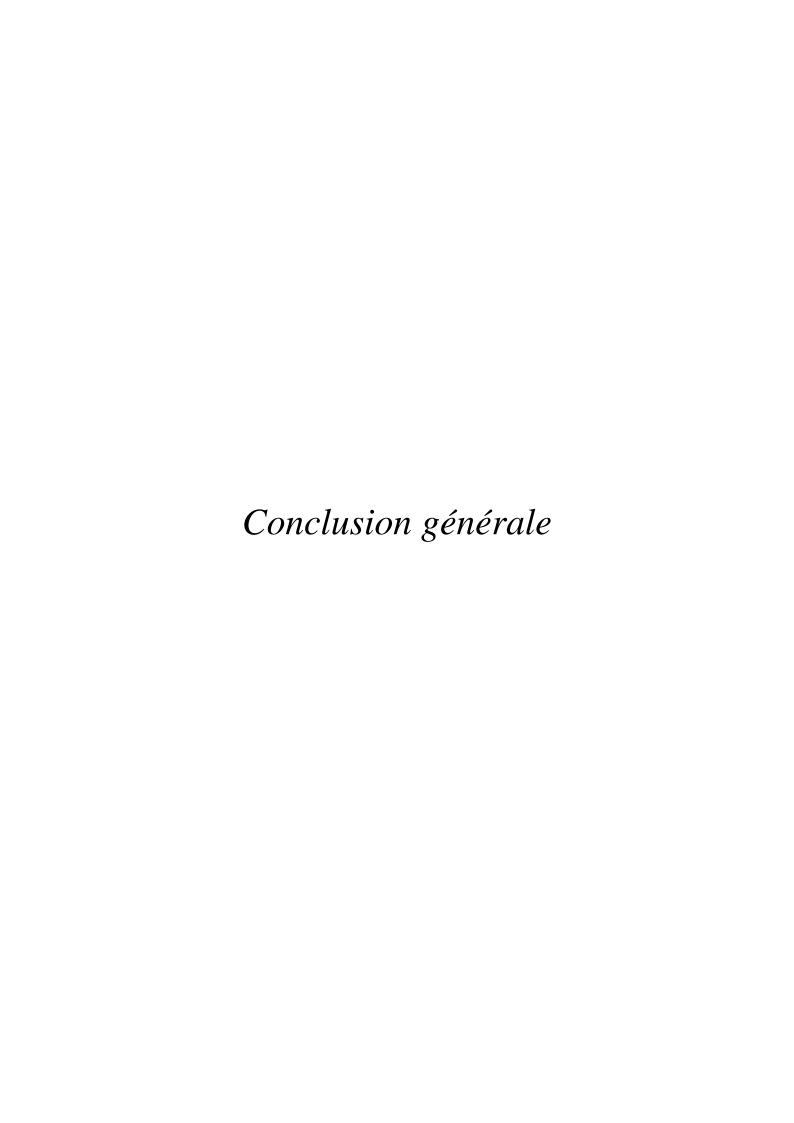
Dans un deuxième essai, nous avons changé quelques paramètres en augmentant la quantité de la cytarabine à 10 éq, et en changeant la méthode de purification précédente (ultrafiltration) par une dialyse (48h) suivi d'une centrifugation (7000 g, 20min).

Cependant le résultat obtenu n'est pas satisfaisant, nous n'arrivons pas à éliminer les agents de couplages utilisés (EDAC, NHS).

## V.5.Conclusion

Nous sommes arrivés à préparer des dérivés oxydés de xyloglucane via une oxydation douce en utilisant le système TEMPO/NaOCl/NaBr. Le produit obtenu a été caractérisé par résonance magnétique nucléaire et infrarouge.

Nous avons montré qu'on est capable coupler le xyloglucane oxydé avec la cytarabine (un anticancéreux utilisé en chimiothérapie), le produit a été caractérisé par infrarouge et RMN, les résultats de RMN montrent la présence de la cytarabine dans le mélange, cependant nous ne pouvons pas calculer le degré de couplage à cause de la présence des réactifs (EDAC et NHS). Ceci nécessite une optimisation des conditions de la réaction (les quantités des différents réactifs, méthodes de purification...etc).



## Conclusion générale

Dans ces travaux de thèse, nous sommes attachés à l'étude des propriétés physico-chimiques d'un polysaccharide, ainsi que sa dégradation enzymatique. Nous nous sommes aussi intéressés à sa modification chimique et son couplage avec un principe actif.

Notre choix s'est porté sur le xyloglucane, un polysaccharide d'origine végétale trouvant de nombreuses applications dans différents domaines.

Trois résultats peuvent être retenus :

Dans un premier temps, l'étude les propriétés physico-chimiques du xyloglucane en solution en fonction de différentes conditions expérimentales par diffusion dynamique de la lumière (DLS) nous a permis de définir de bonnes conditions de solubilisation, et a soulevé la difficulté d'obtenir de bons solvants pour les polysaccharides.

Une étude complémentaire de ses solutions (préparées dans le NaNO<sub>2</sub>) a été réalisée montrant qu'en présence de nitrite de sodium à une concentration (0.1M) le xyloglucane s'organise en nanoparticules non agrégées et ayant un diamètre de 60 nm.

La deuxième partie de ce travail, consacrée au suivi de l'hydrolyse enzymatique du xyloglucane par une endoglucanase a mis en évidence la digestion du xyloglucane mais aussi l'agrégation des produits de dégradation en solution.

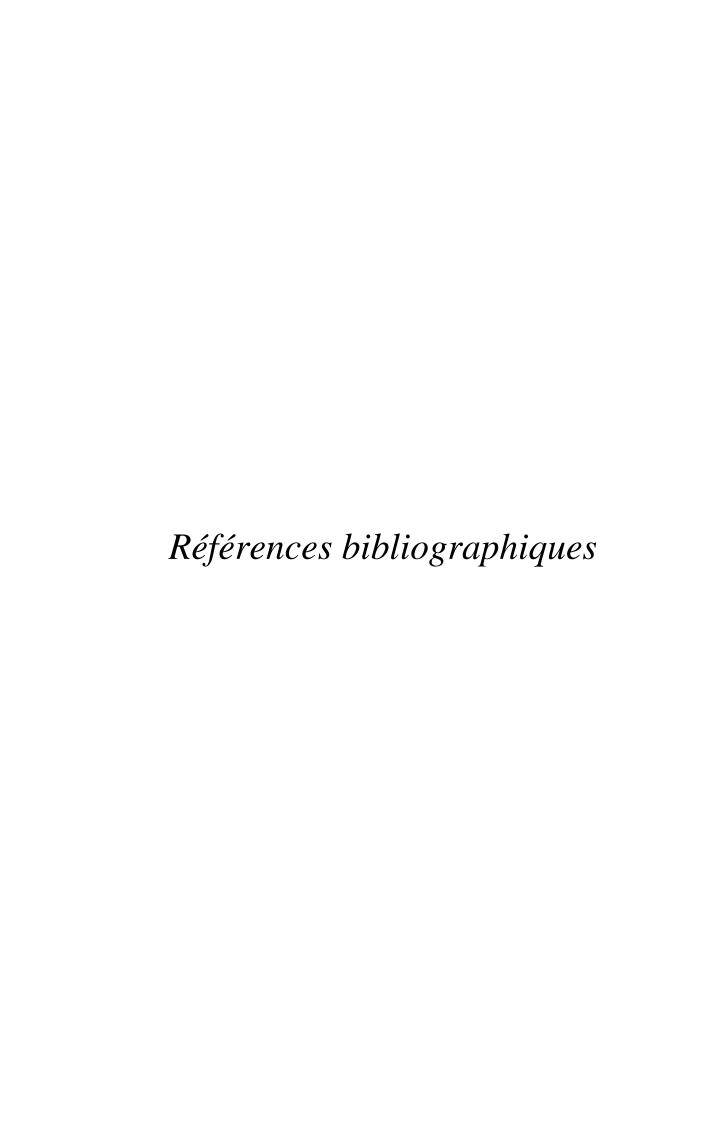
En surface, il a été impossible de suivre le phénomène de l'hydrolyse enzymatique en temps réel par la microscopie à force atomique mais le suivi de la dégradation enzymatique des surfaces incubées avec la cellulase ont mis en évidence l'importance de la surface (désorption possible du polymère pour permettre l'action de l'enzyme) et l'action de l'enzyme dans le cas de nanoparticules (l'enzyme déroule les nanoparticules avant de couper les liaisons osidiques).

Enfin dans la troisième partie, nous avons obtenu des dérivés de xyloglucane via une oxydation sélective par le système TEMPO/NaOCl/NaBr, permettant l'oxydation sélective des hydroxyles primaires en acides carboxyliques.

# Conclusion générale

La présence de groupes carboxyles à la surface de xyloglucane a permis également d'aborder la préparation de nouveaux conjugués xyloglucane-cytarabine (un anticancéreux utilisé en chimiothérapie) par couplage peptidique.

Toute fois une optimisation des conditions de la réaction sera nécessaire.



- Carpita N.Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47(1996)
   445-476.
- Vincken J., Schols HA., Oomen RJFJ., McCann MC., Ulvskov P., Voragen AGJ.,
   Visser RGF. *Plant Physiology* 132(2003)1781-1789.
- 3. Deguchi S., Tsujii K., Horikoshi K. Chemical Communications 31(2006) 3293–3295.
- 4. Irvine JC., Hirst EL. Journal of the Chemical Society 121 (1922)1585-1591.
- 5. Irvine JC., Hirst EL. Journal of the Chemical Society 123 (1923)518-532.
- 6. Cosgrove DJ. Nature Reviews Molecular Cell Biology 6 (2005) 850-861.
- 7. Whistler RL., Chen CC. Fibre Science and Technology 11 (1991) 287-319.
- 8. Wilkie KCB. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 36 (1979) 215-264.
- 9. Stephen, A.M. The polysaccharides; G.O. Aspinall Ed (1983)98-193.
- 10. Fry SC. Journal of Experimental Botany 40 (1989)1–11.
- 11. Hayashi T. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40 (1989) 139–168.
- 12. Gould SE., Rees DA., Wight NJ. Biochemical Journal 124(1971) 47-53.
- 13. Aspinall GO., Krishnamurthy TN.,Rosell KG A. Carbohydrate Research 55 (1977)11-19.
- 14. Hayashi T., Delmer DP. Carbohydrate Research 181 (1988)273-277.
- 15. Acebes JL., Moral R., Zarra I. *Phytochemistry 33* (1993)1343-1345.
- 16. Vierhuis E., York WS., Kolli VSK., Vincken JP., Schols HA., Van Alebeek G., Voragen, AGJ. Carbohydrate Research 332 (2001)285-297.
- 17. Docoa T., Williams P., Pauly M., O'Neill MA., Pellerin P. Carbohydrate Polymers 53 (2003) 253-261.
- 18. Ren YL., Picout DR., Ellis PR., Ross-Murphy SB. *Biomacromolecules 5* (2004)2384-2391.

- 19. Ren YL., Picout DR., Ellis PR., Ross-Murphy SB., Reid JSG. *Carbohydrate Research* 340 (2005) 997-1005.
- 20. Hilz H., De Jong LE., Kabel MA., Verhoef R., Schols HA., Voragen AGJ. Carbohydrate Research 342 (2007)170-181.
- 21. SogaK., Arai K., Wakabayashi K., Kamisaka S.,Hoson T. *Advances in Space Research* 39 (2007) 1204-1209.
- 22. Chant SR. Flowering Plants of the World (1993)105-106.
- 23. Jambulingam R., Fernandes ECM. *Agroforestry Systems* 4 (1986)17–32.
- 24. Kumar CS., Bhattacharya S. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 48 (2008)1–20.
- 25. Rao PS., Ghosh TP., Krishna S. *Journal* of Scientific and *Industrial* Research 4 (1946)705-709.
- 26. Rao PS., Srivastava HC. Academic Press (1973) 369-411.
- 27. Kooiman P. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas 80 (1961) 849-865.
- 28. Savur G., Sreenivasan A., Journal of Biological Chemistry 172(1947)501-509.
- 29. Teraoka T., Iriguchi A., Ebie K., Mizuhashi N.US Patent 4 (1990)895 -938.
- 30. Mishra A., Clark JH., Vij A., Daswal S., *Polymers for Advanced Technologies* 192 (2007) 99-104.
- 31. Mishima T., Hisamatsu M., York WS., Teranishi K., Yamada T., *Carbohydrate Research*, 308 (1998) 389-395.
- 32. Taylor IEP., Atkins EDT, *FEBS Letters*. 181 (1985)300-302.
- 33. Lang P., Burchard W.Makromolekulare Chemie 194 (2003) 3157-3166.
- Gidley MJ., Lillford PJ., Rowlands DW., Lang P., Dentini M., Crescenzi V., Edwards
   M., Fanutti C., Grant Reid JS. Carbohydrate Research 214 (1991) 299-314.
- 35. Lang P., Kajiwara K. J. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 4 (1993)517-528.

- 36. Kim BS., Takemasa M., Nishinari K. Biomacromolecules 7 (2006) 1223-1230.
- 37. Yamagaki T., Mitsuishi Y., Nakanishi H., Rapid Communications in Mass Spectrometry 12 (1998) 307-311.
- 38. York WS ., Harvey LK ., Guillen R., Albersheim P., Darvill AG., Carbohydrate Research 248 (1993) 285-301.
- 39. Yaoi T., Nakai, Y. Kameda, A. Hiyoshi and Y. Mitsuishi. *Applied* and Environmental *Microbiology* 71(2005) 7670-7678.
- 40. Sone Y., Sato K., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 58(1994) 2295-2296.
- 41. Iain CMD. Pure and Applied Chemistry 61 (1989) 1315-1322.
- 42. York WS., Kumar Kolli VS.,Orlando R., Albersheim P.,Darvill AG. *Carbohydrate*\*Research 285 (1996) 99-128.
- 43. York WS., Halbeek HV., Darvill AG., Albersheim P. Carbohydrate Research 200 (1990) 9-31.
- 44. Picout DR., Ross-Murphy SB., Errington N., Harding SE. *Biomacromolecules* 4 (2003) 799-807.
- 45. Buckeridge MS., Rocha DC., Reid JSG., Dietrich SMC. Physiologia Plantarum 86 (1992)145-151.
- 46. Fanutti C., Gidley MJ., Reid JSG. *Planta 184* (1991)137-147.
- 47. Marry M., Cavalier DM., Schnurr JK., Netland J., Yang ZY., Pezeshk V., York WS., Pauly M., White AR. *Carbohydrate Polymers* 47 (2003)347-356.
- 48. Kim K., Lee M., Park H., Kim JH., Kim S., Chung H., Choi K., Kim IS., Seong BL., Kwon IC. *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006)3490-3491.
- 49. Nishinari K., Yamatoya K., Shirakawa M. *Handbook of hydrocolloids Wood* (2000) 247–267.
- 50. Glicksman M.In Food Hydrocolloids 3 (1986)191-202.
- 51. Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd. In *Technical Bulletin*, 1989.

- Gidley MJ., Lillford PJ., Rowlands DW., Lang P., Dentini M., Crescenzi V., Edwards
   M., Fanutti C., Grant Reid JS. Carbohydrate Research 214 (1991)299-314.
- 53. Yuguchi Y., Kumagai T., Wu M., Hirotsu T., Hosokawa J. Cellulose 11 (2004) 203-208.
- 54. Ikeda S., Nitta Y., Kim BS., Temsiripong T., Pongsawatmanit R., Nishinari K. *Food Hydrocolloids* 18(2004) 669–675.
- 55. Shirakawa M., Yamatoya K., Nishinari K. Food Hydrocolloids 12(1998) 25-28.
- 56. Miyazaki S., Suisha F., Kawasaki N., Shirakawa M., Yamatoya K., Attwood D. *Journal of Controlled Release* 56 (1998)75-83.
- 57. Ray P., *Biochimica et Biophysica Acta* 629 (1980) 431-444.
- 58. Camirand A., Brummell D., Maclachlan G., *Plant Physiology* 84 (1987)753-756.
- 59. Moore P., Swords K., Lynch M., Staehelin L. *Journal of Cell Biology* 112 (1991)589-602.
- 60. Zabotina OA., Van De Ven WTG., Freshour G., Drakakaki G., Cavalier D., Mouille G., Hahn MG., Keegstra K., Raikhel NV. *Plant Journal* 56 (2008)101-115.
- 61. Brummell DA., Camirande A., Maclachlan GA., *Journal of Cell Science* 96 (1990)705-710.
- 62. Keegstra K., Raikhel N. Current Opinion in Cell Biology 4 (2001)219-224.
- 63. Richmond TA., Somerville CR. *Plant Molecular Biology* 47 (2001)131-143.
- 64. Faik A., Chileshe C., Sterling J., Maclachlan G. Plant Physiology 114 (1997) 245-254.
- 65. Madson M., Dunand C., LI X., Verma R., Vanzin GF., Caplan J., Shoue DA., Carpita NC., Reiter WD. *Plant Cell* 15 (2003) 1662-1670.
- 66. Minic Z., Jouanin L. Plant Physiology and Biochemistry 44 (2006) 435-449.
- 67. Iglesias N., Abelenda JA., Rodino M., Sampedro J., Revilla G., Zarra I. *Plant and Cell Physiology* 47 (2006) 55-63.
- 68. Edwards M., Bowman Y., Dea I., REID J. *Journal of Biological Chemistry* 263 (1988) 4333-4337.

- 69. De Alcantara PHN., Martim L., Silva CO., Dietrich SMC., Buckeridge MS. *Plant Physiology and Biochemistry* 44 (2006) 619-627.
- Sampedro J., Sieiro C., Revilla G., González-Villa T., Zarra I. Plant Physiology. 126
   (2001) 910–920.
- 71. Crombie HJ., Chengappa S., Hellyer A., Reid JS. *Plant Journal* 15 (1998)27-38.
- 72. Michailidis G., Argiriou A., Darzentas N., Tsaftaris A. *Journal of Plant Physiology* 166 (2009) 403-416.
- 73. Baumann MJ., Eklöf JM., Michel G., Kallas AM., Teeri TT., Czjzek M., Brumer H.

  \*Plant Cell 19 (2007)1947–1963.
- 74. Fanutti C., Gidley MJ., Reid JSG. Plant Journal 3 (1993)691-700.
- 75. Henrissat B. *Biochemical Society Transactions* 26 (1998)153-156.
- 76. Grishutin SG., Gusakov AV., Markov AV., Ustinov BB., Semenova MV., Sinitsyn AP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1674 (2004) 268–81.
- 77. Koshland PJ. *Biological Reviews* 28 (1953) 416-436.
- 78. Davies G., Henrissat B. *Structure* 3(1995) 853-859.
- 79. Sinnott ML. Chemical Reviews 90 (1990)1171-1202.
- 80. Birsan C., Johnson P., Joshi M., MacLeod A., McIntosh L., Monem V., Nitz M., Rose DR., Tull D., Wakarchuck WW., Wang Q., Warren RAJ., White A., Withers SG. Biochemical Society Transactions 26 (1998)156-160.
- 81. Ooshima H., Burns DS., Converse AO. *Biotechnology* and *Bioengineering* 36(1990) 446-452.
- 82. Withers SG. Carbohydrate Polymers 44 (2001)325-337.
- 83. SANDGREN M. doctoral thesis (2003) Uppsala University Sweden.
- 84. Shirakawa M., Yamatoya K. Foods and Food Ingredients Journal of Japan 208(2003).
- 85. Gerard T. Handbook of water-soluble gums and resins 23(1980)1-12.

- 86. kumar CS., bhattacharya S. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48 (2008)1–20.
- 87. Rao PS., SRIVASTAVA HC. Academic Press (1973) 369–411.
- 88. Shankaracharya NB. *Journal of Food Science and Technology* 35 (1998)193–208.
- 89. Kalum, I. *Japan Patent* No. WO 9849387,1980.
- 90. Brumer H., Zhou Q., Baumann MJ., Carlsson K., Teeri TT. *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 5715-5721.
- 91. Christiernin M., Henriksson G., Lindstrom ME., Brumer H., Teeri TT., Lindstrom T., Laine J. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 18(2003)182–187.
- 92. De Lima DU., Buckeridge MS. Carbohydrate Polymers 46(2001)157–163.
- 93. Naoki T. JP2000281522, 2000.
- 94. Fleury E., Halila S., Driguez H., Cottaz S., Hamaide T., Fort S. FR2900931, 2007.
- 95. Tadashi N., Koji A., Seiji N. *Patent* No.11152207A2,1997.
- 96. Koji A., Reiji M., Tomiyuki N., Tadashi N., Toshikatsu H., Nozomiko S., Keiichi U., Syoji N. *International Patent No.* WO 9926590A1, 1999.
- 97. Yokoyama H., Mori Y. *Japan Patent No.* 2008208051-A, 2008.
- 98. R.Hartemink, K. M. J. VanLaereand A. K. C. Mertens, Anaerobe 2(1996) 223-230.
- 99. Makino C., Misaki A. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 38(1992)391-395.
- 100. Mastromarino P., Petruzziello R., Macchia S., Rieti S., Nicoletti R., Orsi N. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39(1997) 339-345.
- 101. Sinibaldi L., Pietropaolo V., Goldoni B., Di Taranto C., Orsi N. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 4(1992)16-22.
- 102. Mannucci L., Fregona I., Di Gennaro A. *Journal of Medical Contactology and Low Vision* 1(2000) 6-9.
- 103. Rolando M., Valente C. BMC Ophthalmology 7 (2007) 1471-1478.

- 104. Burgalassi S., Chetoni P., Panichi L., Boldrini E., Saettone MF. *Ophthalmic* Research 31 (1999) 229-235.
- 105. Nisbeta DR., Cromptona KE., Hamiltona SD., Shirakawae S., Prankerdc RJ.,Finkelsteind DI., Horned MK., Forsythea JS. *Biophysical Chemistry* 121(2006)14-20.
- 106. Yoo MK., Choi HK., Kim TH., Choi YJ., Akaike T., Shirakawa M., Cho CS. *Archives of Pharmacal Research* 28(2005)736-742.
- 107. Miyazaki S., Suisha F., Kawasaki N., Shirakawa M., Yamatoya K., Attwood D.

  \*\*Journal of Controlled Release 56(1998)75-83.\*\*
- 108. Suisha F., Kawasaki N., Miyazaki S., Shirakawa M., Yamatoya K., Sasaki M., Attwood D. *International Journal of Pharmaceutics* 172(1998)27-32.
- 109. Kawasaki N., Ohkura R., Miyazaki S., Uno Y., Sugimoto S., Attwood D. *International Journal of Pharmaceutics* 181(1999)227-234.
- 110. Burgalassi S., Chetoni P., Panichi L., Boldrini E., Saettone MF. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2000 (16) 497-509.
- 111. Takahashi A., Suzuki S., Kawasaki N., Kubo W., Miyazaki S., Loebenberg R., Bachynsky J., Attwood D. *International Journal of Pharmaceutics* 246 (2002) 179-186.
- 112. Ruel-Gariepy E., Leroux JC. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58 (2004) 409-426.
- 113. Nisbet DR., Crompton KE., Hamilton SD., Shirakawa S., Prankerd RJ., Finkelstein DI., Horne MK., Forsythe JS. *Biophysical Chemistry* 121(2006) 14-20.
- Itoh K., Yahaba M., Takahashi A., Tsuruya R., Miyazaki S., Dairaku M., Togashi M.,
   Mikami R., Attwood D. *International Journal of Pharmaceutics* 356 (2008) 95-101.
- 115. Busato A. P., Reicher F., Domingues R., Silveira JLM. *Materials Science and Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* 29 (2009) 410-414.

- 116. Simi CK., Abraham TE. Colloid and polymer science 288 (2010) 297-306.
- 117. Butt HJ., Graf K., Kappl H. *Physics and Chemistry of Interfaces*, Wiley/VCH, Berlin, 2003.
- 118. Higgins JS., Benoît HC., *Polymers and Neutrons Scattering*, Clarendon press, 1994.
- 119. Cummins, H.Z., Pike, E.R., *Photon correlation and Light Beating Spectroscopy*, Plenum Press, 1974.
- 120. Linder, P., Zemb, T., Neutron, *X-Ray and Light Scattering: Introduction to an Investigate Tool for Colloidal and Polymeric systems*, North Holland, 1991.
- 121. Schmitz, K.S., *An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macro-molecules*, Academic Press inc., 1990.
- 122. Rayleigh. *On the electromagnetic theory of light, Philosophical Magazine* 81(1881) 12.
- 123. Pecora, R.; Berne, B. J. Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics. Dover Publications, INC: Mineola, NY, 2000.
- 124. Dalgleish DG., Hallett FR. Food Research International 28 (1995) 181-193.
- 125. Chu B. Laser light scattering. Academic Press, 1991.
- 126. Koppel DE. *Journal of Chemical Physics* 57(1972) 4814-4820.
- 127. Provencher, S.W.; Computer Physics Communications 27 (1982)229-242.
- 128. Brown W. Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications, Press Inc, 1993.
- 129. Burchard W. Advances in Polymer Science 48 (1983)1-124.
- 130. Checot F.; Brulet A.; Oberdisse J.; Gnanou Y.; Mondain-Monval O.; Lecomm-andoux S. *Langmuir* 10(2005)4308-4315.
- 131. Binnig G., Quate CF., Gerber, C. Physical Review Letters 56 (1986) 930-933.
- 132. Rugar D., Hansma PK. *Physics Today* 43 (1990)23-30.

- 133. Morris VJ., Kirby AR., Gunning AP. Atomic Force Microscopy for biologists,

  Imperial College Press, 2009.
- 134. Ohnesorge F., Binnig G. *Science* 260 (1993) 1451-1456.
- 135. Burnham NA., Colton RJ., Pollock HM. *Journal of Vacuum Science and Technology* 9 (1991) 2848-2856.
- 136. Sedin DL., Rowlen KL. Analytical *Chemistry* 72 (2000) 2183-2189.
- 137. Thundat T., Allison DP., Warmack RJ., Ferrell TL. *Ultramicroscopy* 42–44 (1992) 1101-1106.
- 138. Lyubchenko YL., Oden PI., Lampner D., Lindsay SM., Dunker KA. *Nucleic Acids Research* 21 (1993) 1117-1123.
- 139. Martin Y., Williams CC., Wickramasinghe HK. *Journal of Applied Physics* 61(1987) 4723-4729.
- 140. McIntire TM., Penner RM., Brant DA. Macromolecules 28 (1995) 6375–6377.
- 141. Zhong Q., Inniss D., Kjoller K., Elings V.B., Surface Science Letters 209 (1993) L688-L690.
- 142. Bruker, Santa Barbara.
- 143. Keller D., Bustamante C. Biophysical Journal 64 (1993) 896-897.
- 144. Lin JN., Lea AS., Hansma PK., Andrade JD. Langmuir 6 (1990) 509-511.
- 145. Bustamante C., Keller D. *Physics Today* 48 (1995) 32-38.
- 146. Balnois E., Wilkinson KJ. *Physicochemical and Engineering Aspects* 207 (2002) 229–242.
- 147. Hanaor D, Triani G, Sorrell C (2011). Surface and Coatings Technology 205 (2011) 855-874.
- 148. Norrman K., Ghanbari-Siahkali A., Larsen NB., Annual Reports Section C Physical chemistry 101 (2005) 174-201.
- 149. Schubert DW., Dunkel T. Materials Research Innovations 7 (2003) 314-321.

- 150. Meyerhofer D. *Journal of Applied Physics* 49 (1978) 3993-3997.
- 151. Braga PC., Ricci D. Atomic force microscopy: biomedical methods and applications,

  Humana Press, 2004.
- 152. Aigouy L ., De Wilde Y ., Frétigny C ., les nouvelles microscopies à la découverte du nanomonde, Belin, 2006.
- 153. Wolter O., Bayer T., Greschner J. *Journal of Vacuum Science and Technology B* 9 (1991) 1353-1357.
- 154. Itoh J., Tohma Y., Inoue T., Yokoyama H., Shimizu K. *Japanese Journal of Applied Physics* 33 (1994) 7167-7170.
- 155. Rangelow IW. Microelectronic Engineering 23 (1995) 369-372.
- 156. Boisen A., O. Hansen O., S. Bouwstra S. Journal of *Micromechanics and Microengineering* 6 (1996) 58-62.
- 157. Saya D., Fukushima K., Toshiyoshi H., Hashiguchi G., Fujita H., Kawakatsu H. Sensors and Actuators A 95 (2002) 281-287.
- 158. Albrecht TR., Akamine S., Carver TE., Quate CF. *Journal of Vacuum Science and Technology A* 8 (1990) 3386-3396.
- 159. Green JB., Idowu A., Chan SSF. Materials Today 6 (2003) 22-29.
- 160. Butt HJ., Graf K., Kappl H. *Physics and Chemistry of Interfaces*, Wiley/VCH, Berlin, 2003.
- 161. Noy A., Vezenov DV., Lieber CM. Annual Review of Materials *Science* 27 (1997) 381-421.
- 162. Smith DA., Connell SD., Robinson C., Kirkham J. *Analytica Chimica Acta* 479 (2003) 39-57.
- 163. Kim JM., Muramatsu H. Nano Letters 5 (2005) 309-314.
- 164. Capron I ., Alexandre S ., G. Muller G. Polymer 39 (1998) 5725–5730.

- 165. Gunning AP., Giardina TP., Faulds Craig B., Juge N.; Ring SG., Williamson G., Morris VJ. Carbohydrate polymers 51 (2003) 177-182.
- 166. Balnois E., Stoll S., Wilkinson KJ., Buffle J.,Rinaudo M.,Milas M. *Macromolecules* 33 (2000) 7440-7447.
- 167. Camesano TA., Kevin J. Wilkinson KJ. Biomacromolecules 2 (2001)1184-1191.
- 168. Spagnoli C.,Korniakov A., Ulman A.,Endre AB., Yuri LL., Cowmana MK.

  Carbohydrate Research 340 (2005) 929–941.
- 169. Balnois E., Wilkinson JE. *Physicochemical and Engineering Aspects* 207 (2002) 229–242.
- 170. Kirby AR., Alistair J., MacDougall AJ., Morris VJ. Food Biophysics 1(2006) 51-56
- 171. Adams EL., Kroon PA., Williamson G., Gilbert HJ., Morris VJ. *Carbohydrate*\*Research 339 (2004) 579-590.
- 172. Moore JC. *Journal of Polymer Science* 2 (1964)835-843.
- 173. Kausch HH., Heymans N., Plummer CJ., Decroly P. *Matériaux Polymères: Propriétés Mécaniques et Physiques, PPUR presses polytechniques*, 2001.
- 174. Fontanille M., Gnanou Y. Chimie et physico-chimie des polymères, Dunod, 2010.
- 175. Kulicke WM.,Lasen CC. Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes, Springer, 2004.
- 176. Champetier G., Monnerie L. *Introduction à la chimie macromoléculaire, Masson*, 1969.
- 177. Almin KE., Eriksson KE. *Biochimica et Biophysica Acta* 139(1967) 238–247.
- 178. Manning K. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 5 (1981)189–202.
- 179. Menon V., Prakash G., Rao M. Journal of Biotechnology 148(2010)233-239.
- 180. Mc Cormick CL. (1981). US patent 4 (1981) 278-790.
- 181. Turban AF. US patent 4 (1981)302-252.
- 182. Mc Cormick CL., Callais PA., Hutchinson BH. Macromolecules 18 (1985)2394–2401.

- 183. Dawsey TR., Mc Cormick CL. Journal of Macromolecular Science, Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics 30 (1990) 405.
- 184. French D. Academic Press (1984) 184-247.
- Lang P., Kajiwara K. Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition 4 (1993) 517-528.
- 186. Muller F., Manet S., Jean B., Chambat G., Boué F., Heux L., Cousin F.

  \*Biomacromolecules\* 12 (2011) 3330–3336.\*
- 187. Fry SC. Annual Plant Reviews 41 (2011) 1–42.
- 188. Gidley MJ., Peter J., Lillford PL., Rowlands DW. *Carbohydrate Research* 214 (1991) 299–314.
- 189. Kai Kc., De Oliveira Petkowicz KL. *International Journal of Biological Macromolecules* 46 (2010) 223-228.
- 190. Painter TJ., Cesaro A., Delben F., Paoletti S. *Carbohydrate Research* 140 (1985) 61-68.
- 191. Theisen A., Johann C., Deacon MP., Harding SE. Refractive increment data-book for polymer and biomolecular scientists Nottingham University Press 2000.
- 192. Capron I., Alexandre G., Muller G. *Polymer* 39(1998) 5725–5730.
- 193. Balnois E., Wilkinson KJ. *Physicochemical and Engineering Aspects* 207 (2002) 229–242.
- 194. Gu Y., Akhremitchev B., Walker GC., Waldeck DH. *Journal of Physical Chemistry B* 103 (1999) 5220-5226.
- 195. Fatouros Dimitrios G., Roshan Deen G., Arleth L., Bergenstahl B., Seier Nielsen F., Skov Pedersen J., Mullertz A. Pharmaceutical Research 24( 2007) 1844-1853.
- 196. Howard H.Weetall., Adolfas K.Gaigalas. *Applied Biochemitry and Biotechnology* 41 (1993)139-144.

- 197. Groll J., Fiedler J., Engelhard E., Ameringer T., Tugulu S., Klok HA.,3 Brenner RE.,Moeller M. Journal of Biomedical Materials Research Part A 74 (2005) 607-617.
- 198. Besemer AC., De Nooy AEJ., Van Bekkum H. In *Cellulose derivatives, Modification*.

  The American Chemical Society (1998)73-82.
- 199. De Nooy AE., Besemer AC., Van Bekkum H. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas 113 (1994) 165-166.
- 200. De Nooy AE., Besemer, AC., Van Bekkum H. *Carbohydrate Research* 269 (1995) 89-98.
- 201. De Nooy AE., Besemer AC., Van Bekkum H., Van Dijk JAP.; Smit JAM.

  Macromolecules 29 (1996) 6541-6547.
- 202. Chang PS., Robyt JF. *J. Carbohydrate Chemistry* 15 (1996) 819-830.
- 203. Lebelev OL., Kazarnovskii SN. Zhur. Obshch. Khim. 30 (1960) 1631-1635.
- 204. Sierakowski MR., Milas M., Desbrières J., Rinaudo M. *Carbohydrate Polymers*. 42 (2000) 51-57.
- 205. Isogai A., Kato Y. Cellulose 5 (1998) 153-164.
- 206. Tahiri C., Vignon MR. Cellulose 7 (2000) 177-188.
- 207. Muzzarelli R AA., Muzzarelli C., Cosani A., Terbojevich M. *Carbohydrate Polymers* 39 (1999) 361-367.
- 208. Araki J., Wada M., Kuga S. *Langmuir 17* (2001) 21-27.
- 209. Besemer AC., Van Bekkum H. *Starch/Staerke* 46 (1994) 95-101.
- 210. Besemer AC., Van Bekkum H. Starch/Staerke 46 (1994) 101-106.
- 211. Bragd PL., Besemer AC., Van Bekkum H. *Carbohydrate Research* 328 (2000) 355-363.
- 212. Schnatbaum K., Schafer HJ. Synthesis 5 (1999) 864-872.
- 213. Lucyszyn N., Lubambo AF., Matos KF., Marvilla., Souza CF., Sierakowski MR.

  Materials Science and Engineering C 29 (2009) 552–558.

- 214. Perez DS., Montanari S., Vignon MR. Biomacromolecules 4 (2003) 1417-1425.
- 215. Freitas RA. *Doctoral thesis* (2003) Université Fédérale du Paraná, Curitiba Brésil.
- 216. Martin S. *Doctoral thesis* (2003) Université Fédérale du Paraná, Curitiba Brésil.
- 217. Kassab R., Felix C., Parrot-Lopez H., Bonaly R. Tetrahedron Letters 38 (1997) 7555-7558.
- 218. Ikeda H., Horimoto Y., Nakata M., Ueno A., *Tetrahedron Letters* 45 (2000) 6483-6487.
- 219. Danishefsky I., Siskovic E. Carbohydrate Research 16 (1971) 199-205.
- Bulpitt P., Aeschlimann D. *Journal of Biomedical Materials Research* 47 (1999) 152-169.
- 221. Roumani M. Doctoral Thesis. Université Joseph Fourier, Grenoble France.
- 222. Pallavicini MG. Pharmacology and Therapeutics 25 (1984) 207–238.
- 223. Rustum M., Raymakers RA. *Pharmacology and Therapeutics* 56 (1993) 307–321.
- 224. Jordheim L., Galmarini CM., Dumontet C. Drug Targets 4 (2003) 443-460.
- 225. Beumer JH., Eiseman JL., Parise RA, Florian Jr JA., Joseph E, D'Argenio DZ., Parker RS., Kay B., Covey JM., Merrill J., Egorin MJ. *Cancer Chemotherapy* and *Pharmacology* 62 (2008) 457–464.
- 226. Miller LP., Pyesmany AF., Wolff LJ., Rogers PCJ., Siegel SE., Wells RJ., Buckley JD., Hammond GD. *Cancer* 67 (1991) 2235–2240.
- 227. Ueda T., Nakamura T., Ando S., Kagawa D., Sasada M., Uchino H., Johno I., Akiyama Y. *Cancer Research* 43 (1983) 3412–3416.
- 228. Rosti G., Bonifazi F., Trabacchi E., Vivo A., BAssi S., Martinelli G., Testoni N., Russo D., Baccarani M. *Leukemia* 17 (2003) 554–559.
- 229. Kery V., Novotny L., Tihlarik K., Haplová J., Kacuráková M., Sandula J., Balázová E. *International Journal of Biochemistry* 22 (1990) 1203–1207.