



HAL
open science

Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée

Nathalie Claisse

► **To cite this version:**

Nathalie Claisse. Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV066 . tel-00849149

HAL Id: tel-00849149

<https://theses.hal.science/tel-00849149>

Submitted on 30 Jul 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie organique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Nathalie CLAISSE

Thèse dirigée par **Sébastien FORT**

préparée au sein du **Centre de Recherches sur les
Macromolécules Végétales**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du vivant**

Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée

Thèse soutenue publiquement le **13 Décembre 2012**,
devant le jury composé de :

Mr. Olivier RENAUDET

Professeur, Université de Grenoble, Président

Mr. Jean-Marie BEAU

Professeur, Université d'Orsay-Paris Sud, Rapporteur

Mr. Richard DANIELLOU

Professeur, Université d'Orléans, Rapporteur

Mr. Sébastien FORT

Chargé de recherche CERMAV, St Martin d'Hères, Membre

Mr. Hugues DRIGUEZ

Directeur de recherche CERMAV, Invité

Mr. Michel VIDAL

Directeur scientifique ERAS Labo, St Nazaire-les-Eymes, Invité



“Il est extrêmement rare que la montagne soit abrupte de tous les côtés...”

André Gide

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr Redouane Borsali, Directeur du CERMAV pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire, ainsi que le CNRS et ERAS Labo pour le financement de mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon Jury : Pr O. Renaudet, Pr J.M Beau, Pr R. Daniellou d'avoir jugé mon travail de thèse, ainsi que pour nos riches discussions lors de la soutenance.

Je remercie Hugues Driguez pour ses précieux conseils lors de ces trois années, ainsi que lors de la période de rédaction du manuscrit. Bonne retraite !

Les fameuses séances de "chaise verte", nos discussions, tes conseils, ta patience, ton attention et ton écoute, pour tout cela je te témoigne ma reconnaissance et te remercie sincèrement Sébastien.

Bien sûr, je remercie mes collègues de CBO pour avoir partagé ces trois ans, et contribué au bon déroulement de cette période à coup de sourire, réconfort, gâteaux, conseils ;

Un grand merci à Mr. Sa?e (aka Sylvain), Sami, Paco (aka Patricia), Sylvie, Aurélie, Bernard, William, Claire, Alain, Philippe, Gérard, Eric, Sophie.

Merci à Rémi, pour les gels deutsche qualität et nos discussions d'avenir, à Ludo pour ses conseils à mon arrivée et tous nos cafés dans l'aquarium, à Anne-Laure, à Emeline (un jour ils auront du champagne aux Berthom !), à Tinaïg, à Leyla, à Hélène, à Jimmy, à Christophe, aux collègues thésards du CERMAV.

Merci à tous les stagiaires qui ont croisé mon chemin au CERMAV, avec une pensée spéciale pour Marine, la 'tote, pour ses supers gâteaux ;)

Je n'oublie pas les amis Brésiliens : Samuel avec qui je partage la timidité, toujours le sourire! Renato, un artichaut qui met du temps à s'ouvrir mais pour découvrir un cœur d'or (pensée pour toi à chaque passage piéton !) et Cony la dernière et la plus stressée de nous tous !

Anica (Čičí), partenaire de dosage ☺, merci pour ton sourire, tes histoires, la super rando à la mer de glace, la rakia lors de cette mémorable soirée time's up! A ton tour de connaître les joies de la rédaction, bon courage!

Stéphanie, merci pour ces trois années de partage de labo, nos fous rire, nos sourcils de coton, pour tous nos concerts à hottes fermées sur le son de virage radio (sans compter la cassette de Noël !), merci pour tous ces « TTTTTTTTTubes » !!! qui ont permis de sauver quelques précieuses gouttes de produit ☺ !

Laurine...merci ! Je ne sais pas par où commencer... Je te remercie pour ton amitié, pour ton soutien, pour ton aide avec les purifs (les tubes...). Je n'oublierai pas nos supers soirées, et tes démonstrations de Sean Paul ;) au top ! continue d'être super-Lolo !

Alex, en toi j'ai trouvé un compagnon de galère, un complice, un ami. Merci pour tous ces bons moments, ces petites courses entre les midis, ces pintes de brigand, ces riris, cette super séance de ski à St-Pierre où j'ai appris à chaîner... Que de souvenirs ! J'espère que nos chemins ne s'éloigneront pas, tu me manques déjà ;)

Je remercie mes amis pour leur réconfort lors de cette période, pendant laquelle je n'ai pas été très disponible. Evidemment, je remercie mes parents Thérèse et Thierry pour leur aide et leur soutien inconditionnel, ainsi que mes grand-parents. Merci à ma petite sœur Caroline pour ses coups de pieds aux fesses, les longs coups de téléphone et les plaques de chocolat pour me remonter le moral !

Je tiens à remercier Anthony, qui me supporte et soutient depuis toujours, qui a subi toutes mes séances de râlerie, qui sait trouver les mots qu'il faut. Merci d'ensoleiller ma vie !

Introduction Générale **23**

Chapitre 1 : Etude Bibliographique **33**

I. Cellulose et cellodextrines **33**

I.1. Cellulose **33**

I.1.1. Structure chimique 33

I.1.2. Sources de cellulose 34

I.1.3. Polymorphisme de la cellulose 36

I.1.4. Solvants de la cellulose 40

I.2. Cellodextrines **42**

I.2.1. Généralités 42

I.2.2. Activités biologiques 43

II. Conversion de la cellulose **53**

II.1. Hydrolyse de la cellulose **54**

II.1.1. Hydrolyse chimique 54

II.1.2. Hydrolyse enzymatique 57

II.2. Apport des liquides ioniques à la conversion de la cellulose **65**

II.2.1. Liquides ioniques : généralités 65

II.2.2. Solubilité de la cellulose en liquide ionique 67

II.2.3. Modification de la cellulose en liquide ionique 69

II.2.4. Prétraitement de la cellulose en liquide ionique 70

II.2.5. Hydrolyse de la cellulose en liquide ionique 70

III. Synthèses chimique et enzymatique d'oligosaccharides **71**

III.1. Synthèse chimique d'oligosaccharides **71**

III.2. Synthèse enzymatique d'oligosaccharides **72**

III.3. Les glycosyl-transférases **73**

III.3.1. Généralités 73

III.3.2. Activité des glycosyl-transférases 74

III.3.3. Utilisation des glycosyl-transférases en synthèse 75

III.4. Les glycoside-hydrolases **76**

III.4.1. Généralités	76
III.4.2. Glycoside-hydrolases agissant avec rétention de configuration	76
III.4.3. Glycoside-hydrolases agissant avec inversion de configuration	77
III.4.4. Les Glycoside-hydrolases comme outils de synthèse	78

IV. Conclusion **82**

Chapitre 2: Hydrolyse contrôlée de cellulose et de cellulose modifiée pour la production de cellodextrines **91**

I. Problématique de production des cellodextrines hydrosolubles **92**

I.1. Contexte	92
I.2. Limitations des hydrolyses enzymatiques	93
I.3. Stratégie développée	94

II. Dépolymérisation contrôlée de cellulose par procédés "verts" : utilisation alternée de liquides ioniques et d'enzymes **95**

II.1. Méthodologie générale	95
II.2. Préfragmentation de la cellulose en oligosaccharides insolubles dans l'eau	96
II.2.1. Dissolution de la cellulose	97
II.2.2. Caractérisation du substrat de départ	98
II.2.3. Préfragmentation par hydrolyse acide en phase homogène	102
II.2.4. Préfragmentation par hydrolyse acide en phase hétérogène	103
II.2.5. Comparaison des deux méthodes d'hydrolyse acide	104
II.2.6. Caractérisation des oligosaccharides insolubles	105
II.3. Hydrolyse enzymatique d'oligosaccharides insolubles dans l'eau	109
II.3.1. Conversion des oligosaccharides insolubles en cellodextrines hydrosolubles	111
II.3.2. Influence du temps d'hydrolyse	112
II.3.3. Influence de la présence d'espèces inhibitrices	113
II.3.4. Influence de la concentration enzymatique	115
II.3.5. Distribution des cellodextrines formées lors de l'hydrolyse enzymatique	116
II.4. Bilan	119

III. Hydrolyse enzymatique de cellulose acétate hydrosoluble pour la production contrôlée de cellodextrines **121**

III.1. Cellulose acétate : brève introduction	121
III.2. Synthèses de cellulose acétate hydrosoluble	123
III.3. Caractérisation de la cellulose acétate.	124
III.3.1. Rendement et détermination du DS	124
III.3.2. Détermination du DP	127
III.4. Hydrolyse enzymatique de la cellulose acétate hydrosoluble	128
III.4.1. Conversion de la WSCA en cellodextrines hydrosolubles	128
III.4.2. Distribution de tailles des cellodextrines hydrosolubles produites	130

IV. Conclusion et perspectives **137**

Chapitre 3 : Synthèse d'analogues de Lipo-Chitooligosaccharides à squelette cellodextrine **147**

I. Les lipo-chitooligosaccharides **147**

I.1. Généralités	147
I.2. Structure des LCO	149
I.3. Activité des LCO	150
I.3.1. Facteurs de nodulation	152
I.3.2. Facteurs de mycorhization	154
I.3.3. Perception et reconnaissance des LCO	155
I.4. Synthèse de LCO	156
I.4.1. Dépolymérisation chimique et chimio-enzymatique de la chitine	156
I.4.2. Synthèse chimique	156
I.4.3. Synthèse biotechnologique	158
I.4.4. Synthèse d'analogues de LCO	161

II. Synthèse d'analogues de LCO à squelette cellodextrine **164**

II.1. Stratégies de synthèse du squelette saccharidique	164
II.2. Synthèse du squelette saccharidique à l'aide de cellulases	166
II.2.1. Synthèse du squelette par une glycosynthase	166

II.2.2. Synthèse du squelette par une cellulase sauvage	187
II.3. Synthèse du squelette par la β-<i>N</i>-acétyl-hexosaminidase d'<i>Aspergillus oryzae</i>	196
II.3.1. Transglycosylations catalysées par une β - <i>N</i> -acétyl-hexosaminidase	196
II.3.2. Transglycosylation d'une unité GlcNHAc sur une cellodextrine par la β - <i>N</i> -acétyl-hexosaminidase d' <i>A.oryzae</i>	198
II.4. Synthèse du squelette avec du lysozyme	201
II.4.1. Synthèse d'un disaccharide GlcNHAc- Glc- β -SPH avec du lysozyme	202
II.4.2. Synthèse du tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc) ₃ avec du lysozyme	208
II.5. Acylation du squelette saccharidique pour la synthèse de l'analogue de LCO	211
II.5.1. Déprotection de l'unité <i>N</i> -acétylglucosamine du squelette saccharidique	212
II.5.2. Acylation du tétrasaccharide GlcNH ₂ -(Glc) ₃	214
<u>III. Conclusion et perspectives</u>	<u>221</u>
<u>Chapitre 4 : Partie expérimentale</u>	<u>231</u>
<u>I. Matériel et méthodes</u>	<u>231</u>
I.1. Solvants et réactifs	231
I.2. Méthodes chromatographiques	231
I.2.1. Chromatographie sur couche mince de silice	231
I.2.2. Chromatographie préparative sur gel de silice	231
I.2.3. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)	232
I.2.4. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)	232
I.2.5. Chromatographie par perméation de gel (GPC)	233
I.3. Caractérisations physico-chimiques	234
I.3.1. Spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	234
I.3.2. Spectrométrie de masse	234
I.3.3. Diffraction des Rayons X (DRX)	235
I.3.4. Dosage des sucres réducteurs	235
I.3.5. Pouvoir rotatoire	236
<u>II. Préparation des cellodextrines</u>	<u>236</u>

II.1. Acétolyse de l'Avicel	236
II.2. Hydrolyse de l'Avicel à l'acide phosphorique	237
II.3. Hydrolyse de l'Avicel avec un mélange d'acide	237
II.4. Prétraitement de l'Avicel en liquide ionique par hydrolyse à l'acide camphorsulfonique	238
II.5. Prétraitement de l'Avicel en liquide ionique par hydrolyse avec la résine acide Amberlyst-15DRY (AB15)	238
II.6. Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides insolubles dans l'eau	239
II.7. Synthèse de cellulose partiellement acétylée hydrosoluble (WSCA)	239
II.8. Hydrolyse enzymatique de la cellulose partiellement acétylée hydrosoluble	240
III. Synthèse d'analogues de LCO	241
III.1. Synthèse du donneur de glycosylation -SBox	241
III.2. Synthèse des accepteurs de glycosylation	244
III.3. Synthèse de fluorures de glycosyles disaccharidiques	250
III.4. Synthèse du tétrasaccharide par transglycosylation	264
III.5. Synthèse de l'analogue de LCO : acylation	270
Références	273
Annexe : Valorisation des compétences des docteurs®	285

Acronymes et Abréviations

A

AB15 : amberlyst 15-DRY
AGU : unité anhydroglucose
AMIm-Cl : 1-Allyl-3-méthyl-imidazolium Chloride

B

BCA : acide bichoninique
BG : β -glucosidase
BMIM-Cl : 1-Butyl-3-méthyl-imidazolium chloride

C

CA : cellulose acétate
CAZy : Carbohydrate Active enZYmes
CBH : cellobiohydrolase
CBM : module de liaison
CCM : chromatographie sur couche mince
CP-MAS : Cross-Polarization Magic Angle Spinning
CSA : acide camphorsulfonique

D

DMA/LiCl : *N,N*-Diméthylacétamide Lithium Chloride
DNS : acide dinitrosalicylique
DP : degré de polymérisation
DRX : diffraction des rayons X
DS : degré de substitution

E

EG : endoglucanase

F

FT-IR : Infra-Rouge à transformée de Fourier

G

GPC : chromatographie par perméation de gel

H

HEW : hen egg white
HMF : 5-(hydroxyméthyl)furfural
HPLC : chromatographie liquide haute performance

I

I : indice de polymolécularité

IUBMB : International Union of Biochemistry and Biomolecular Biology

L

LMH : largeur à mi-hauteur

M

MCC : cellulose micro-cristalline

Mn : masse molaire en nombre

MW : masse molaire en poids

N

NDO : non-digestible oligosaccharide

NMMO : N-Methylmorpholine-N-Oxide

P

PS : polystyrene

R

RMN : résonance magnétique nucléaire

S

SEC : chromatographie d'exclusion stérique

T

TRS : sucres réducteurs totaux

W

WSCA : cellulose hydrosoluble partiellement acétylée

Ces travaux ont fait l'objet des communications scientifiques suivantes :

1. **European Carbohydrate Symposium (Eurocarb XVI)**, Juillet 2011, Sorrento (Italie).

Communication par affiche : "Depolymerisation of cellulose in green media : alternate use of ionic liquid and enzyme" .

Nathalie Claisse, Michel Vidal, Sébastien Fort.

- Prix du meilleur poster, décerné par EPNOE (European Polysaccharide Network of Excellence)

2. **15^{ème} Journée Scientifique du Groupe Lyonnais des Glyco-Sciences**, Novembre 2011, Lyon (France).

Communication orale : "Dépolymérisation contrôlée de cellulose par procédés verts : utilisation alternée de liquides ioniques et d'enzymes".

Nathalie Claisse, Michel Vidal, Sébastien Fort.

3. **Séminaire CERMAV**, Janvier 2012, Grenoble (France).

Communication orale : "Dépolymérisation contrôlée de cellulose par procédés verts : utilisation alternée de liquide ionique et d'enzymes".

Nathalie Claisse, Michel Vidal, Sébastien Fort.

4. **24^{èmes} Journées du Groupe Français des Glyco-Sciences**, Mai 2012, Val Joly, (France)

Communication orale : "Synthèse chimio-enzymatique d'analogues de Lipo-ChitoOligosaccharides (LCOs) à squelette cellodextrine".

Nathalie Claisse, Michel Vidal, Sébastien Fort.

5. **Journée Rhône-Alpes des Biomolécules**, Juin 2012, Grenoble (France).

Communication par affiche : "Chemo-enzymatic synthesis of Lipo-ChitoOligosaccharide (LCOs) analogs with a cellodextrin backbone".

Nathalie Claisse, Michel Vidal, Sébastien Fort.

6. **International Carbohydrate Symposium**, Juillet 2012, Madrid (Espagne).

Communications orale et par affiche : "Chemo-enzymatic synthesis of Lipo-ChitoOligosaccharide (LCOs) analogs with a cellodextrin backbone".

Nathalie Claisse, Michel Vidal, Sébastien Fort.

Introduction Générale

Introduction Générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au CERMAV, au sein de l'équipe Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides (CBO) dirigée par Sébastien Fort. Ils s'inscrivent dans la thématique de l'équipe visant à synthétiser et modifier des oligosaccharides par voie chimio-enzymatique pour leur valorisation.

Cette thèse intitulée "Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bioinspirée" a été réalisée dans le cadre d'une Bourse de Docteur Ingénieur (BDI) co-financée par le CNRS et la société ERAS Labo.

La société ERAS Labo est une PME spécialisée dans la synthèse de produits organiques et minéraux dans les domaines du médicament, des polymères et des molécules d'intérêt biologique. Le cofinancement de cette thèse au CERMAV marque le souhait d'ERAS d'accroître sa recherche dans le domaine des glycosciences. Ainsi, les attentes principales de ce projet concernaient l'élaboration de molécules d'intérêt ainsi que de méthodes de production applicables à l'échelle de l'entreprise.

La valorisation des polysaccharides issus de la biomasse végétale et en particulier de la cellulose est un des grands défis de ce siècle. La plupart des études récentes portent sur l'optimisation de la conversion des biopolymères en monomères pouvant remplacer les produits d'origine pétrolière, tant comme carburants que comme produits chimiques de base dans l'industrie des polymères. Cependant, l'obtention d'oligosaccharides et de dérivés pouvant avoir des propriétés biologiques ou physico-chimiques intéressantes constitue un autre axe de valorisation de la biomasse saccharidique. Par exemple les oligosaccharides résultant d'une dégradation de la chitine, des xylanes, des $\beta(1,3)$, des $\beta(1,4)$ et des $\beta(1,3)$ -(1,4) glucanes sont des molécules d'intérêt recherchées pour leurs propriétés antibactériennes, immunostimulantes ou encore pour leur potentiel comme sondes dans l'étude des relations structure/activité des glyco-enzymes.

La mise au point de procédés efficaces pour contrôler l'hydrolyse des polysaccharides végétaux et en particulier de la cellulose en oligosaccharides passe par des traitements enzymatiques, plus respectueux de l'environnement, mais nécessite

d'améliorer les propriétés des enzymes actuellement disponibles ou bien d'en isoler de nouvelles.

Dans ce projet, nous avons utilisé la capacité des liquides ioniques considérés comme solvants alternatifs et capables de dissoudre les macromolécules, ainsi que des enzymes afin de favoriser les procédés de dépolymérisation de cellulose en oligosaccharides de tailles ciblées. Dans une deuxième partie, nous avons utilisé ces oligosaccharides comme molécules de base pour la synthèse chimio-enzymatique de molécules d'intérêt dans le domaine de l'agrochimie. Nous avons utilisé des cellodextrines pour l'obtention d'analogues de lipo-chitooligosaccharides à potentielle vocation de fertilisants naturels, et comme sondes pour l'élucidation des mécanismes biologiques impliqués.

Ce manuscrit de thèse se compose d'une étude de la littérature sur la thématique de la cellulose et des modifications d'oligosaccharides, suivie de deux chapitres rapportant les aspects de préparation d'oligosaccharides de cellulose et de leur modification pour l'obtention de molécules d'intérêt. Le dernier chapitre décrit quant à lui les aspects expérimentaux des travaux. Dans le cadre de la formation des docteurs de l'école doctorale et en partenariat avec l'Association Bernard Gregory – Intelli'agence, un mémoire personnel portant sur la valorisation des compétences des docteurs a été réalisé et se trouve proposé en annexe. Il s'agit d'un bilan à vocation tout public du projet scientifique, ainsi que des compétences personnelles que j'ai développées au cours de la thèse.

- Le premier chapitre du manuscrit est dédié à une étude bibliographique sur les connaissances actuelles dans le domaine de la cellulose et de ses oligosaccharides. En particulier, nous nous focaliserons sur les méthodes existantes de dépolymérisation de la cellulose par voies chimique et enzymatique, ainsi que sur les méthodes émergentes de production à l'aide de liquides ioniques. La dernière partie est consacrée à une revue des méthodes de synthèse des oligosaccharides, en particulier par des approches enzymatiques.
- Le second chapitre aborde la dépolymérisation contrôlée de cellulose et de cellulose modifiée pour la préparation de cellodextrines de degrés de polymérisation 3 et 4, où deux méthodes de production chimio-enzymatique sont présentées.

- Le troisième chapitre est consacré à la modification des oligosaccharides de cellulose préparés pour leur valorisation en biomolécules d'intérêt. En particulier, les travaux décrivent la synthèse de molécules analogues de lipochitooligosaccharides à potentielle vocation de fertilisant naturel. Trois stratégies de synthèse chimio-enzymatique ont été élaborées et sont détaillées.
- Le dernier chapitre relate des aspects expérimentaux des travaux menés.
- En annexe se trouve le mémoire de valorisation des compétences des docteurs réalisé dans le cadre des formations de l'école doctorale en partenariat avec l'Association Bernard Gregory-Intelli'agence. Ce mémoire a pour but de réaliser un bilan à vocation tout public du projet de thèse. Dans une première partie, le cadre général, le déroulement, la gestion et la conduite du projet de doctorat sont abordés. La seconde partie est consacrée au bilan des compétences personnelles développées au cours de la thèse ainsi que sur ses retombées sur les plans personnel et professionnel.

Chapitre 1 :

Etude Bibliographique

I. Cellulose et cellodextrines **33**

I.1. Cellulose	33
I.1.1. Structure chimique	33
I.1.2. Sources de cellulose	34
I.1.3. Polymorphisme de la cellulose	36
I.1.4. Solvants de la cellulose	40
I.1.4.1. Solubilité dans l'eau	40
I.1.4.2. Solubilisation de la cellulose par interactions moléculaires	41
I.1.4.3. Modification chimique de la cellulose en vue de sa solubilisation	42
I.2. Cellodextrines	42
I.2.1. Généralités	42
I.2.2. Activités biologiques	43
I.2.2.1. Substrats pour l'étude de cellulases	43
I.2.2.2. Les cellodextrines comme éliciteurs	48
I.2.2.3. Les cellodextrines comme précurseurs de substrats fermentables	50
I.2.2.4. Les cellodextrines comme prébiotiques	51

II. Conversion de la cellulose **53**

II.1. Hydrolyse de la cellulose	54
II.1.1. Hydrolyse chimique	54
II.1.1.1. Hydrolyses acides	54
II.1.1.2. Acétolyse	55
II.1.1.3. Hydrolyse par catalyse acide en phase hétérogène	56
II.1.1.4. Hydrolyse en milieu alcalin	56
II.1.1.5. Eclatement des fibres à l'ammoniac (AFEX)	57
II.1.2. Hydrolyse enzymatique	57
II.1.2.1. Les cellulases	57
II.1.2.2. Saccharification enzymatique	60
II.1.2.3. Prétraitement de la cellulose	63
II.1.2.4. Broyage	63
II.1.2.5. Eclatement à la vapeur	63

II.1.2.6. Dioxyde de carbone supercritique	64
II.2. Apport des liquides ioniques à la conversion de la cellulose	65
II.2.1. Liquides ioniques : généralités	65
II.2.2. Solubilité de la cellulose en liquide ionique	67
II.2.3. Modification de la cellulose en liquide ionique	69
II.2.4. Prétraitement de la cellulose en liquide ionique	70
II.2.5. Hydrolyse de la cellulose en liquide ionique	70
<u>III. Synthèses chimique et enzymatique d'oligosaccharides</u>	<u>71</u>
III.1. Synthèse chimique d'oligosaccharides	71
III.2. Synthèse enzymatique d'oligosaccharides	72
III.3. Les glycosyl-transférases	73
III.3.1. Généralités	73
III.3.2. Activité des glycosyl-transférases	74
III.3.3. Utilisation des glycosyl-transférases en synthèse	75
III.4. Les glycoside-hydrolases	76
III.4.1. Généralités	76
III.4.2. Glycoside-hydrolases agissant avec rétention de configuration	76
III.4.3. Glycoside-hydrolases agissant avec inversion de configuration	77
III.4.4. Les Glycoside-hydrolases comme outils de synthèse	78
III.4.4.1. Transglycosylation	78
III.4.4.2. Glycoside-hydrolases mutées : les glycosynthases	80
<u>IV. Conclusion</u>	<u>82</u>

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

I. Cellulose et cellodextrines

La cellulose a été découverte en 1838 par Anselme Payen, un chimiste français qui observe alors une molécule composante de la paroi des plantes qui peut être dégradée, tout comme l'amidon, en glucose^[1]. La construction du mot cellulose vient donc de l'association de "cellule" et de "ose", suffixe français qui désigne les sucres, c'est donc "le sucre provenant des cellules". Cette dénomination a ensuite été adoptée par l'ensemble de la communauté scientifique mondiale. La cellulose est le polysaccharide naturel structural majeur des plantes.

I.1. Cellulose

I.1.1. Structure chimique

La cellulose est un polysaccharide linéaire constitué d'un enchaînement d'unités glucosyles liées en β 1-4^[2]. Cette caractéristique engendre la rotation de 180° par rapport à leur voisin des molécules de glucose composant la chaîne formant ainsi un motif de répétition de deux unités de glucose : le cellobiose. Cela induit une structure moléculaire hélicoïdale très étirée de pas de 7 unités de cellobiose^[3]. Chaque unité de glucose (AGU, unité anhydroglucose) a pour formule brute ($C_6H_{10}O_5$) et mesure 0,515nm. Elle possède trois groupements hydroxyles libres en positions équatoriales C 2,3 et 6 ainsi que deux atomes d'oxygène engagés dans les liaisons osidiques en C1 et 4.

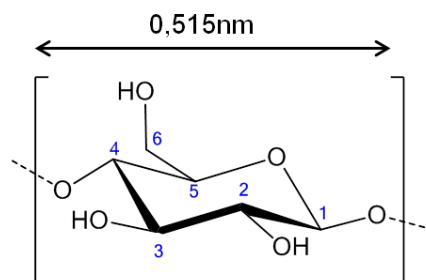


Figure 1 : Unité anhydroglucose (AGU)

La chaîne de cellulose peut être décrite selon trois parties :

- l'extrémité réductrice dont le carbone anomère n'est pas lié à un autre glucose. Il en résulte un équilibre entre les formes hémiacétale et aldéhyde, conférant une réactivité spécifique à cette position,
- le cœur de la chaîne saccharidique composé d'un nombre n variable d'AGU,
- l'extrémité non réductrice dont le carbone anomère est engagé dans une liaison glucosidique.

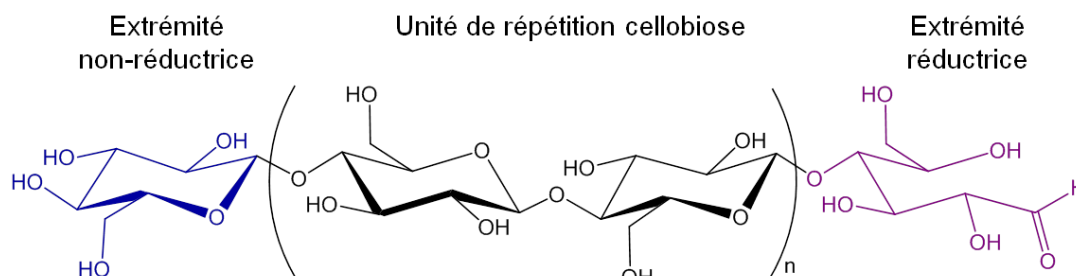


Figure 2 : Chaîne de cellulose

Le degré de polymérisation (DP) peut atteindre jusqu'à 20 000 molécules de glucose suivant l'origine du polysaccharide.

I.1.2. Sources de cellulose

La cellulose est l'un des polymères naturels les plus répandus sur Terre. C'est le composant structural majoritaire des plantes et il se retrouve dans les parois cellulaires végétales primaire et secondaire. La paroi primaire des plantes est adjacente à la membrane lipidique et est constituée en majorité de cellulose. Elle dessine la structure de la cellule végétale. La paroi secondaire quant à elle est composée de cellulose, des hémicelluloses (xyloglucane, xylane, mannane, glucomannane, $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$ glucanes), de lignine et permet l'allongement de la cellule végétale (Figure 3).

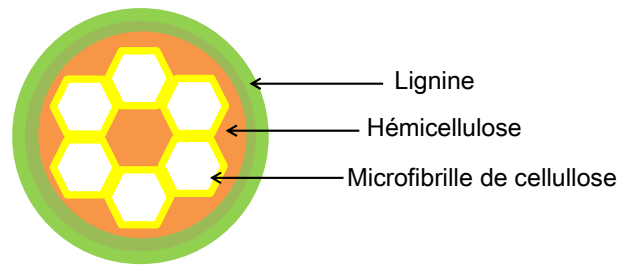


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe transversale de parois végétales

Les proportions de ces trois composants sont variables et dépendantes de la nature du végétal. Elles se situent typiquement entre 60 et 80% de cellulose, 10 à 20% d'hémicellulose et 10 à 20% de lignine^[4]. C'est cet assemblage pariétal qui apporte la rigidité structurale de la cellule (Figure 4).

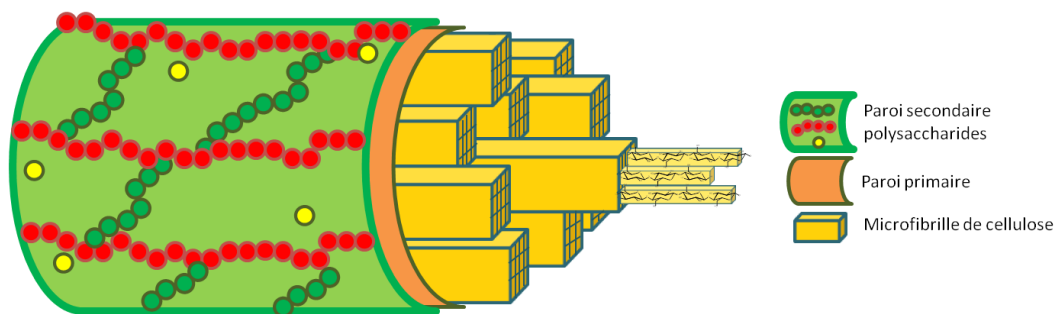


Figure 4 : Représentation des parois végétales primaire et secondaire

De manière générale, la cellulose possède une structure dense et très organisée donc cristalline, pérennisée par sa structure chimique comportant des groupements hydroxyles. Ses groupements se trouvant en position équatoriale, ils favorisent l'établissement de liaisons hydrogènes fortes inter et intra-caténaïres de type force de Van der Waals (Figure 5). Ces liaisons confèrent ainsi au polysaccharide une grande densité, stabilité et rigidité

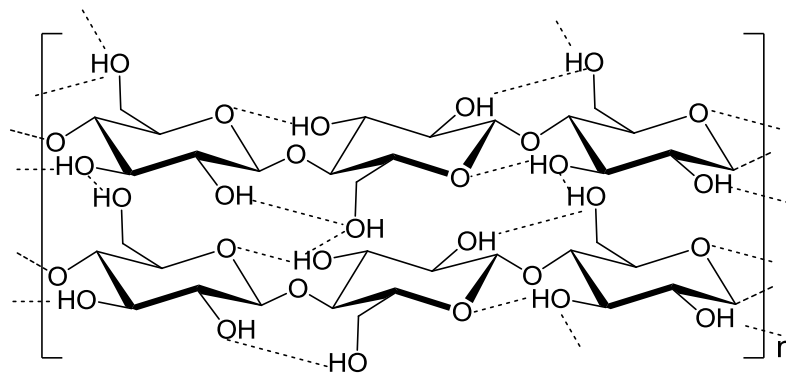


Figure 5 : Représentation schématique des interactions inter et intramoléculeaires des chaînes de cellulose, d'après Nishiyama *et al.*^[5]

Du fait de ces nombreuses interactions inter-caténaires fortes, la cellulose est insoluble dans la plupart des solvants. Cette propriété apporte aux végétaux en plus de stabiliser leur structure la capacité de résister aux facteurs naturels de dégradation. Certains arbres vivent ainsi plusieurs milliers d'années dans certaines conditions climatiques. De la structure cristalline de la cellulose en découlent des propriétés mécaniques de résistance. Cependant contrairement aux autres molécules cristallines, l'arrangement des chaînes de cellulose en fibrilles lui apporte également une grande flexibilité. L'ensemble de ces propriétés physico-chimiques et mécaniques, en plus de sa grande abondance et disponibilité font de la cellulose l'un des polysaccharides le plus étudié.

I.1.3. Polymorphisme de la cellulose

La cellulose est un polymère pouvant présenter différentes allomorphies: elle possède quatre types de structures cristallines décrites, nommées de I à IV. Pour définir la cristallinité de la cellulose, il existe un panel de techniques de caractérisation^[6] dont les plus courantes sont la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la diffraction des rayons X (DRX) et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du ¹³C.

La cellulose I est dite native, sa structure est celle que l'on retrouve dans la plupart des végétaux et quelques autres organismes vivants. La structure a été décrite pour la première fois sur la cellulose de *Valonia ventricosa* par diffraction des rayons X, montrant alors l'arrangement parallèle des chaînes^[7]. Plus tard, la technique de RMN ¹³C CP-MAS (Cross Polarization-Magic Angle Spinning) a permis d'établir que cette allomorphie est composée de deux sous-structures, la cellulose I α et I β présentes dans différentes proportions suivant la source de cellulose^[8]. Ainsi, la cellulose I α est

composée d'une maille triclinique à une chaîne, et la cellulose I β est composée d'une maille monoclinique à deux chaînes parallèles. La cellulose I α est prévalente dans la cellulose bactérienne ou d'algues et la cellulose I β se retrouve majoritairement dans la cellulose produite par les végétaux, comme le coton ou le lin^[9]. Ces deux formes sont souvent présentes simultanément au sein d'une même fibrille dans des proportions dépendantes de leur origine. De manière générale les chaînes de cellulose native s'arrangent de façon parallèle^[10, 11] et forment des feuillets. L'orientation des chaînes de chaque feuillet est légèrement inclinée par rapport à celle de ses voisins, sans connexion entre les strates, comme représenté en Figure 6.

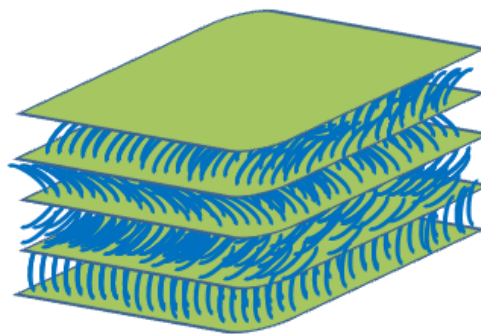


Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation en feuillets des chaînes parallèles de cellulose I

Les micro-fibrilles de cellulose ne sont pas parfaitement cristallines et comportent également des zones moins organisées paracristallines ou amorphes. Ainsi cette hétérogénéité de structure se retrouve au sein des microfibrilles de cellulose (Figure 7).

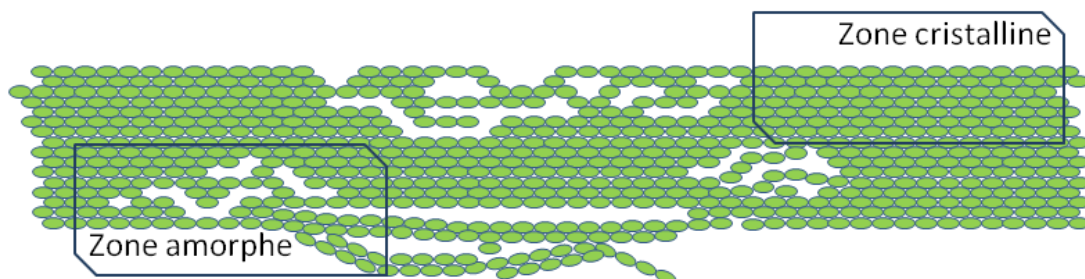


Figure 7 : Représentation schématique des microfibrilles de cellulose

Les autres formes existantes de cellulose sont générées par des traitements de la cellulose I native^[12], et chacun des allomorphes possède une stabilité thermodynamique différente. Ainsi, la transition d'une allomorphie à une autre n'est pas toujours réversible (Figure 8).

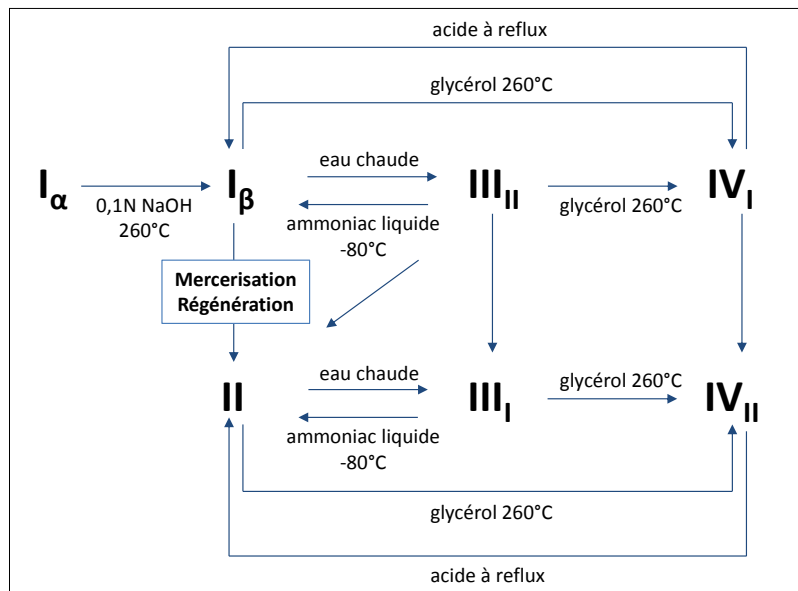


Figure 8 : Procédés de transitions polymorphiques de la cellulose, d'après Kroon-Batenburg *et al.*^[12]

La cellulose II est issue d'un traitement chimique ou physico-chimique de la cellulose native qui permet une réorientation moléculaire de la cellulose sans en changer la structure globale. Sa structure diffère de la cellulose native par l'orientation de ses chaînes qui se réarrangent de manière antiparallèle (Figure 9). Cette orientation permet la disposition d'un plus grand nombre de groupements hydroxyle à l'extérieur des chaînes, permettant ainsi d'établir de plus nombreuses liaisons hydrogène intermoléculaires.

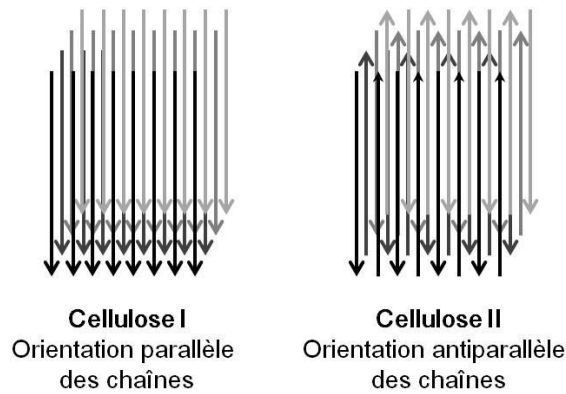


Figure 9 : Représentation schématique de l'orientation des chaînes de cellulose

Elle est généralement obtenue par un traitement permettant sa dissolution puis sa régénération, ou par un traitement alcalin. Historiquement, le traitement en milieu alcalin concentré (mercerisation) a été découvert par John Mercer en 1844. Il permet le gonflement des fibres de cellulose pour de meilleures propriétés mécaniques du textile^[13]. Le traitement de mercerisation permet également une meilleure absorption des colorants dans les fibres. Cette propriété est due au gonflement de la cellulose lui permettant d'intégrer plus de molécules au sein de sa structure. Leur pénétration dépend directement de la nature et de la polarité du solvant^[14], comme le montre la Figure 10 :

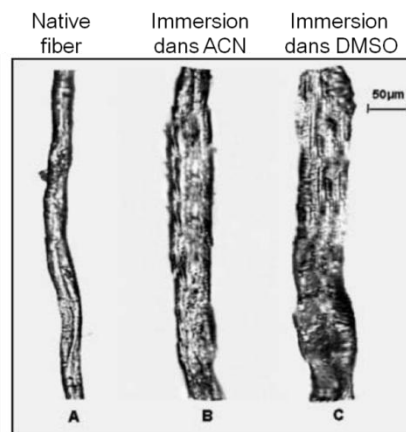


Figure 10 : Cliché en microscopie optique de fibres de cellulose native et mercerisées dans différents solvants, d'après Fidale *et al.*^[14]

D'autres procédés ont été décrits pour permettre la transition de cellulose I en cellulose II. Ces traitements emploient des conditions acide ou basique à basse température visant à dissoudre la cellulose pour ensuite la régénérer, sans la dégrader. Les chaînes de cellulose parallèles peuvent changer leur arrangement lors de la dissolution pour adopter une conformation préférentielle, thermodynamiquement plus stable. Ainsi, la

transformation de la cellulose I en cellulose II est irréversible puisque la réaction inverse est énergétiquement défavorisée. La cellulose II perd en zones de cristallinité et la proportion de zones amorphes augmente. Ses groupements hydroxyles sont alors plus disponibles et donc plus réactifs

La Cellulose III (i et ii) est majoritairement obtenue par un traitement à l'ammoniaque ou en présence d'amine à partir de cellulose I et II respectivement^[15]. Ses paramètres de maille sont similaires à ceux de la cellulose II mais avec une orientation des chaînes parallèle comme la cellulose I α et I β ^[16]. La cellulose IV (i et ii) est produite à partir d'un traitement de la cellulose III (i et ii) dans le glycérol à 260°C.

I.1.4. Solvants de la cellulose

La cellulose est un polysaccharide très difficile à solubiliser. Les solvants de la cellulose ont la capacité de la dissoudre par rupture des interactions hydrogène. Ils pénètrent alors au sein des cristaux afin de parvenir à dissocier l'assemblage des chaînes. Il existe plusieurs classifications des solvants de la cellulose, selon leurs natures ou selon s'ils modifient la cellulose (solvants dits "dérivatisants").

I.1.4.1. Solubilité dans l'eau

La cellulose demeure insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants usuels quelle que soit son allomorphie. Il n'existe que quelques solvants particuliers qui ont la capacité de dissoudre la cellulose. La solubilité de la cellulose est directement liée à la longueur de sa chaîne, car plus le DP est élevé, plus les liaisons hydrogène intermoléculaires sont nombreuses. Le critère de solubilité de la cellulose dans l'eau se divise en trois zones (Figure 11) :

- les oligosaccharides de DP supérieurs à 30, considérés comme comparable au polymère^[17],
- les cellodextrines de DP 7 à 13 et plus, solubles dans l'eau dans certaines conditions^[18],

- les cellodextrines de DP inférieurs à 7, solubles dans l'eau^[19].

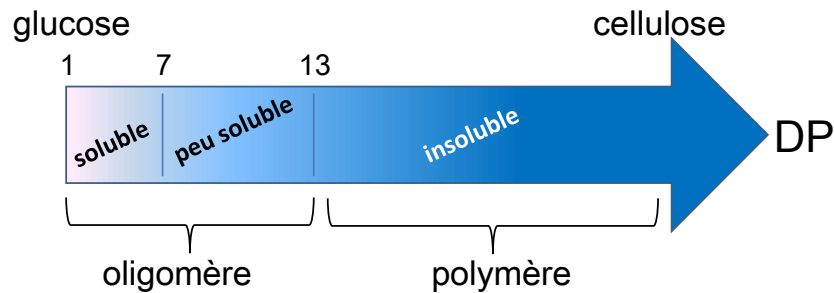


Figure 11 : Solubilité de la cellulose dans H₂O

I.1.4.2. Solubilisation de la cellulose par interactions moléculaires

Les solvants agissent par simples interactions intermoléculaires. Ils peuvent se diviser ici en deux sous-catégories à savoir les milieux aqueux et non-aqueux. Les solvants aqueux comptent les sels inorganiques comme les dérivés de LiCl ou les sels fondus^[20], les complexes avec les métaux de transition comme le Cuam (cuprammonium hydroxyde) ou le Cuen (cupriethylenediamine hydroxyde) ainsi que les hydroxydes d'ammonium ou alcalins. Certains de ces procédés comme la dissolution au Cuam sont utilisés de manière industrielle pour de gros tonnages. Les solvants non-dérivatisants non aqueux sont des références pour la dissolution et comptent principalement les N-Oxide comme la *N*-Méthylmorpholine-*N*-Oxide (procédé Lyocell®), et le *N*-*N*-DiMéthylAcétamide en présence de chlorure de Lithium (DMAc/LiCl).

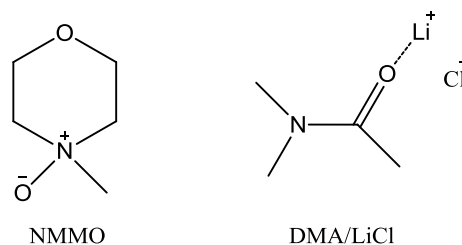


Figure 12 : Structure de NMMO et DMAc/LiCl

I.1.4.3. Modification chimique de la cellulose en vue de sa solubilisation

Les "solvants" dérivatisants de la cellulose sont un abus de langage car ce sont des procédés qui modifient la structure de la cellulose par la formation d'un intermédiaire comme un ester, éther ou acétal afin de permettre la dissolution. Des liaisons covalentes sont formées et induisent la modification de la cellulose, ou sa "dérivatisation". Ces produits peuvent dans certains cas être isolés par reprecipitation et exploités pour les propriétés apportées par cette fonctionnalisation. Les dérivés les plus couramment utilisés sont l'acétate de cellulose (film, membranes et filtres), le nitrate de cellulose (explosif), le xanthate de cellulose (viscose, cellophane). A l'échelle industrielle, la méthode de solubilisation la plus utilisée est le procédé viscose, élaboré par Cross *et al.* en 1892 utilisant le sulfure de carbone et la soude pour obtenir le xanthate de cellulose^[21]. La viscose est le premier dérivé de l'industrie du textile synthétique produit à de gros tonnages^[22], et permet de traiter aujourd'hui plus de trois millions de tonnes de cellulose par an. La plupart de ces procédés de production de dérivés de cellulose utilisent des produits chimiques toxiques pour l'Homme, et pour l'environnement. La recherche de bons solvants pour la cellulose, plus respectueux de l'environnement reste un challenge à relever, d'autant plus que l'exploitation des ressources végétales à disposition tend à augmenter.

I.2. Cellodextrines

I.2.1. Généralités

Les cellodextrines sont les oligosaccharides de cellulose. Elles sont solubles dans l'eau à des degrés de polymérisation inférieurs à 8, et ont le même comportement structural que la cellulose^[23] (Tableau 1). Le cellotétraose a d'ailleurs été utilisé comme modèle pour l'étude de la structure de la cellulose^[24].

	Masse molaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Solubilité dans H₂O (g/L)
Cellobiose	342,3	225	125-147
Celotriose	504,45	206-209	très soluble
Cellotétraose	666,59	252-253	78, à 25°C
Cellopentaose	828,73	266-268	4,8 ; 40 (eau chaude)
Cellohexaose	990,86	275-278	10 (eau chaude)
celloheptaose	1152,9	283-283	1 (eau chaude)

Tableau 1 : Propriétés des cellodextrines, d'après Huebner *et al.*^[23]

I.2.2. Activités biologiques

Les cellodextrines sont peu disponibles car elles sont difficiles à obtenir, pourtant elles présentent certaines propriétés biologiques intéressantes.

I.2.2.1. Substrats pour l'étude de cellulases

Naturellement, la cellulose est dégradée par une famille d'enzymes appelée cellulases appartenant aux glycoside-hydrolases. Les cellulases sont largement utilisées dans les industries papetières, textiles, agroalimentaires ou encore des détergents^[25] (Figure 13). Elles sont notamment utilisées pour le désancrage du papier, la décoloration de textiles et l'abrasion de surface du denim (bio-stoning)^[26]. Dans les industries alimentaires, elles ont des applications en tant qu'additif, par exemple pour le dépulpage des fruits. Elles sont également utilisées dans l'industrie des vins et des huiles pour améliorer le pressage des fruits et la libération des arômes, ainsi que pour la nutrition animale^[27, 25].

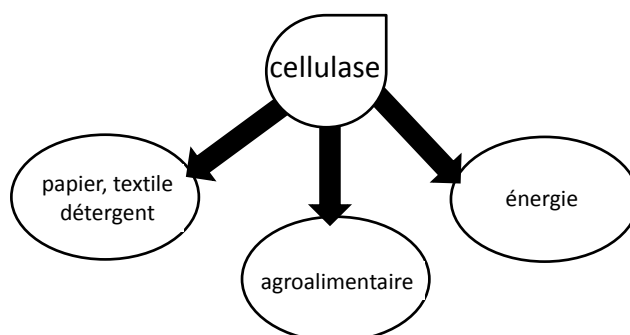


Figure 13 : Applications des cellulases dans l'industrie

Avec le développement de la chimie verte, les procédés industriels développés tendent à être plus respectueux de l'environnement. Ainsi l'emploi de produits chimiques nocifs tend à diminuer, notamment au profit de l'utilisation des enzymes. Avec ce développement se crée parallèlement un besoin en substrats pour pouvoir doser l'activité des cellulases et réaliser leurs caractérisations biochimiques. Les cellodextrines sont donc utilisées comme modèles pour le dosage de ces enzymes. Suivant la nature de la cellulase (EndoGlucanase (EG), CelloBioHydrolase (CBH), β -Glucosidase) le type de substrat approprié diffère, en fonction des propriétés hydrolytiques intrinsèques de l'enzyme^[28]. Les cellodextrines de DP 3 et 4 sont les tailles intéressantes pour des substrats de cellulases, car elles sont un bon compromis entre l'affinité pour les enzymes et leur solubilité dans l'eau.

Plusieurs techniques utilisant différents types de substrats permettent de réaliser le dosage de leurs activités. Par exemple, les cellodextrines naturelles permettent d'évaluer l'activité des cellulases par suivi d'hydrolyse cinétique par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)^[29], ou par dosage des extrémités réductrices libérées. Les cellodextrines réduites permettent de donner des informations sur le lieu de coupure hydrolytique ainsi que de déterminer le nombre de sous-sites d'une enzyme par dosage des oligosaccharides libérés. En effet, lorsque l'enzyme hydrolyse la cellodextrine réduite, elle libère une molécule à l'extrémité réduite ainsi que une ou plusieurs cellodextrines : en dosant chacune des espèces, le nombre de sous-sites et les caractéristiques de l'enzyme peuvent être déterminés^[30, 31]. L'activité enzymatique peut également être évaluée par des cellodextrines fonctionnalisées par un groupement chromogénique. La libération du substrat lors de l'hydrolyse peut ainsi être suivie par dosage colorimétrique du chromophore^[32].

Dans ce contexte de caractériser l'activité d'une classe d'enzyme, Armand *et al.* ont développé des substrats à base de cellodextrines pour doser l'activité spécifique d'endoglucanases par transfert d'énergie de résonance de type Förster (FRET)^[33]. Cette méthode avantageuse permet un dosage en continu de l'hydrolyse suivi d'une émission de fluorescence. Le principe schématisé sur la Figure 14 repose sur la bifonctionnalisation d'une cellodextrine par un groupement donneur fluorophore à l'extrémité réductrice, et par un groupement accepteur "quencher" à l'extrémité non-réductrice.

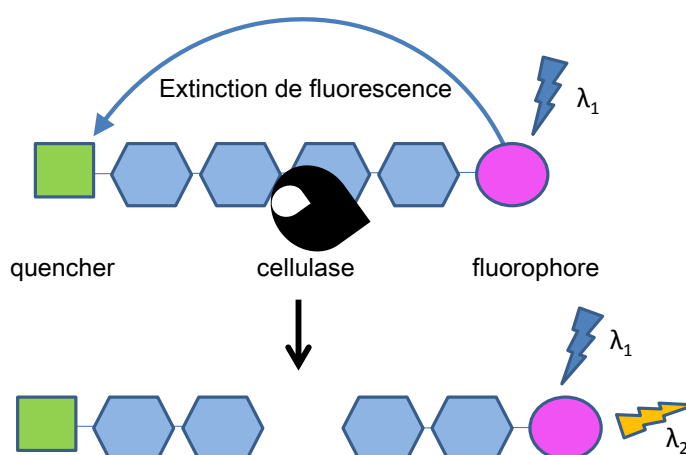


Figure 14 : Principe du transfert d'énergie de résonance de type Förster (FRET)

Lorsque l'on excite le fluorophore à une longueur d'onde λ_1 , il se produit un phénomène de transfert d'énergie qui engendre l'émission du "quencher". L'extinction de la fluorescence et le phénomène de FRET s'observe lorsque le spectre d'émission du fluorophore recouvre le spectre d'excitation du "quencher". Ce phénomène est possible lorsque le fluorophore et le "quencher" se situent à une distance appropriée pour engendrer un recouvrement spectral minimum de 50%, ici de 20Å soient 4 AGU. Lors de l'hydrolyse enzymatique, le transfert de résonance et donc l'extinction de fluorescence sont interrompus. Le groupement fluorophore excité émet alors une longueur d'onde λ_2 dont l'intensité directement liée à l'activité d'hydrolyse peut être suivie. Typiquement ici le substrat bifluorescent est un cellotétraose portant des groupements indoethyl et 5-(2aminoethylamino)-1-naphtalensulfonate (EDANS)

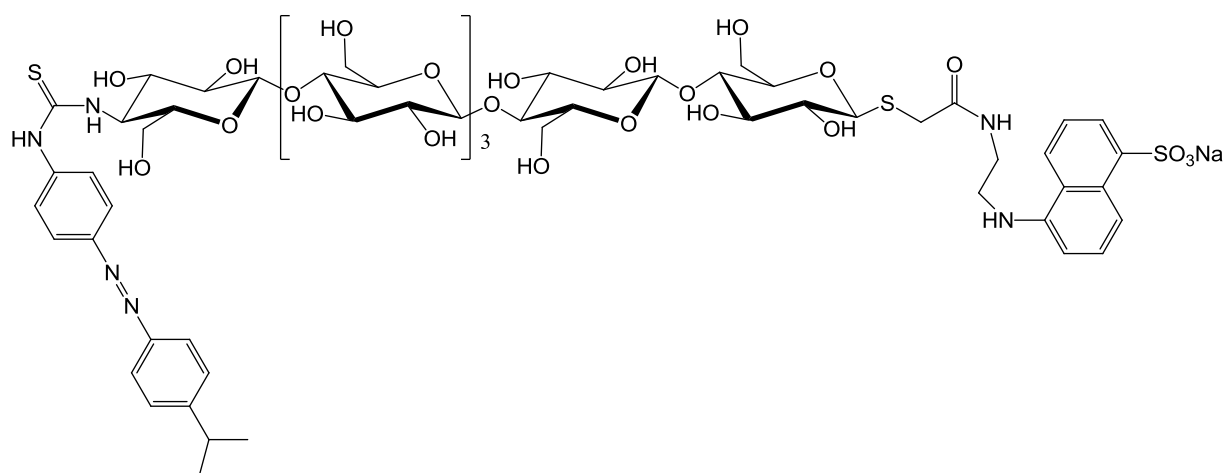


Figure 17 : Cellohexaose bifluorescent, synthétisé par Boyer et al. ^[34]

La sonde a été préparée par synthèse enzymatique au moyen de la glycosynthase Cel7B Glu17Ala à partir d' α -fluorure de glycoside, comme représenté sur la Figure 18.

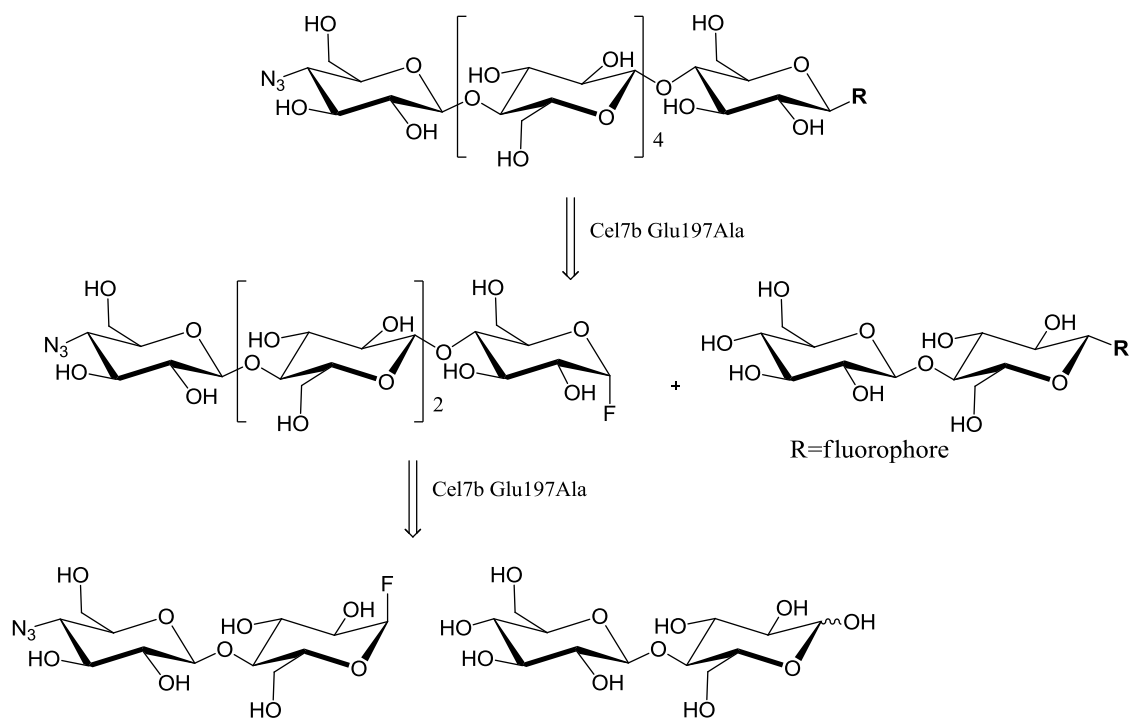


Figure 18 : Schéma rétrosynthétique de la sonde fluorescente synthétisée par Boyer et al. ^[34]

Le "quencher" a ensuite été introduit par réduction de l'azide en amine puis formation d'isothiocyanate.

De nombreuses techniques sont disponibles afin de doser l'activité des cellulases par des substrats cellodextrines naturels ou modifiés.

I.2.2.2. Les cellodextrines comme éliciteurs

Les éliciteurs sont des biomolécules qui interviennent dans les interactions plante-pathogène ou dans les mécanismes de stress de la plante^[35]. Ce sont des molécules produites par certains micro-organismes pathogènes qui induisent chez les végétaux le déclenchement de mécanismes de reconnaissance et d'attaque-défense^[36]. Les réactions de défense se déroulent en trois temps :

- production de molécules de défense,
- renforcement de la paroi cellulaire,
- résistances locale et systématique acquises.

Ces mécanismes se traduisent à plusieurs niveaux^[37]. D'abord dès les premiers instants, la plante-hôte subit des changements de flux ioniques à travers la membrane plasmique. Elle produit des espèces réactives oxygénées et modifie ses mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation. Ensuite au niveau métabolique, les mécanismes stimulent les voies métaboliques des phénylpropanoïdes et des acides gras. Cela déclenche la production de messagers chimiques de défense comme l'acide salicylique et les jasmonates, ainsi que des agents antimicrobiens comme les phytoalexines^[36]. Au-delà de l'arsenal des molécules chimiques déployé pour se défendre, la plante met également en place des défenses physiques. Pour cela, elle produit des barrières et renforcements lignocellulosiques ainsi que des enzymes hydrolytique à destination du pathogène^[38].

Dans ce type d'interactions, l'intérêt de la plante est de détecter au mieux ces molécules élicitrices afin de déclencher de manière suffisamment précoce les mécanismes défensifs. Au contraire, le pathogène produit des molécules appelées supprimeurs qui permettent de prévenir et retarder le déclenchement de ce mécanisme défensif chez la plante.

Il existe plusieurs types d'éliciteurs, qui peuvent être des oligosaccharides, des peptides et des protéines ou des lipides^[37]. Certaines séries d'oligosaccharides comme les β 1-3 glucanes linéaires^[39, 40], les chito-oligosaccharides^[41, 42] ou les α (1-4) oligogalacturonides^[43] possèdent une activité élicitrice.

En 2007, Aziz *et al.* ont publié une étude montrant une activité élicitrice des cellodextrines sur la vigne (*Vitis vinifera*). Les cellodextrines induisent comme les autres oligosaccharides éliciteurs le déclenchement de réponses défensives chez l'hôte dont l'un des premiers signes est la production de H_2O_2 . Ces réponses défensives varient en fonction de la nature de l'oligosaccharide mais aussi en fonction de son DP et de sa concentration (Figure 19).

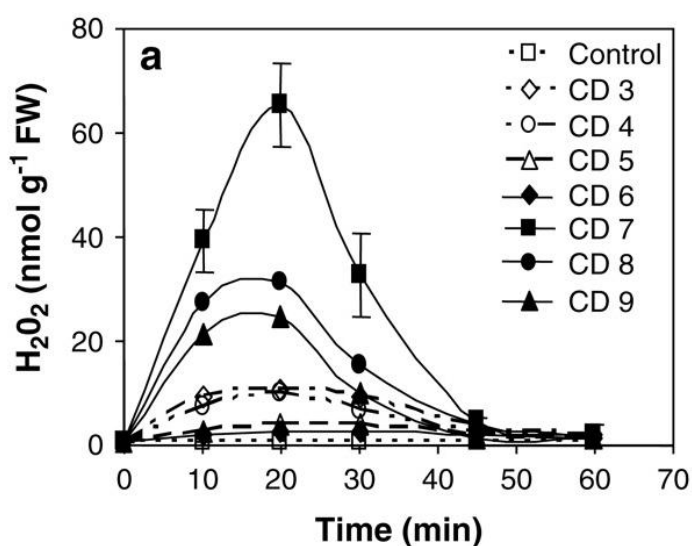


Figure 19 : Production d' H_2O_2 par la vigne élicitée avec différentes cellodextrines, d'après Aziz *et al.*^[39]

Lorsque la vigne est mise en présence de cellodextrines, une réduction significative de l'infection du champignon induisant des moisissures (*Botrytis cinerea*) est observée. Les cellodextrines de DP 3, 7, 8 et 9 en particulier ont montré une activité significative sur la production d' H_2O_2 montrant ainsi leur efficacité en tant qu'éliciteurs.

Mimer l'infection de la plante par des éliciteurs non-spécifiques pour induire une réponse défensive permet son renforcement et par effet secondaire son développement. Ainsi, les éliciteurs naturels pourraient trouver des applications comme potentiels phytofortifiants en agrochimie.

I.2.2.3. Les cellodextrines comme précurseurs de substrats fermentables

Avec la raréfaction des énergies fossiles, la valorisation des agroressources en biocarburant et en produits biosourcés est en plein essor notamment les carburants de seconde génération à partir de ressources ligno-cellulosiques. Afin de produire le bioéthanol, les procédés actuels utilisent les levures, en particulier *Saccharomyces cerevisiae* pour fermenter le glucose en éthanol. En revanche, les levures n'ont pas la capacité d'hydrolyser préalablement la cellulose en sucres fermentables, et n'assimilent pas les cellodextrines comme source de carbone. Cette limitation implique donc la présence d'une β -glucosidase dans le milieu afin de permettre l'hydrolyse des cellodextrines en glucose. L'obtention de bioéthanol nécessite donc deux étapes : une étape de saccharification de la biomasse jusqu'au glucose par procédés chimiques ou biocatalytiques, puis une étape de fermentation. Plusieurs procédés de production existent, alliant la saccharification et la fermentation en continu ou en simultané^[44].

Certains champignons possèdent une activité de saccharification. Récemment Galazka *et al.* ont découvert un gène chez le champignon cellulolytique *Neurospora crassa* lui permettant d'internaliser les cellodextrines (Figure 20). Cette faculté lui autorise ainsi une croissance rapide sur la cellulose^[45]. Ce gène est présent également chez d'autres champignons filamenteux comme la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*). L'existence d'une β -glucosidase intracellulaire a également été mise en évidence chez ces espèces porteuses du gène^[46]. Cette présence naturelle du gène chez ces champignons cellulolytiques témoigne de l'importance du transport transmembranaire des cellodextrines pour la transformation en glucose *in situ* chez ces espèces. L'existence et l'expression de tels gènes induisant le transport transmembranaire de cellodextrines a ouvert la voie à de nouvelles stratégies pour la production de biocarburant.

Le groupe californien de J. Cate a développé des souches de levures modifiées exprimant ce gène de champignon permettant le transport de cellodextrines au sein des cellules. Cette modification permet à la levure de croître sur les cellodextrines et lui donne ainsi la capacité de les hydrolyser en glucose et de les fermenter simultanément. Cette stratégie est prometteuse puisqu'elle permet une croissance rapide des levures et une transformation dès leur formation des sucres en éthanol. Cela permet d'éviter l'accumulation de glucose au sein de la cellule, et ainsi de prévenir l'inhibition de

l'activité de la glucosidase par de trop fortes concentrations en glucose. Le procédé permet déjà sans optimisation de produire de l'éthanol avec du cellobiose.

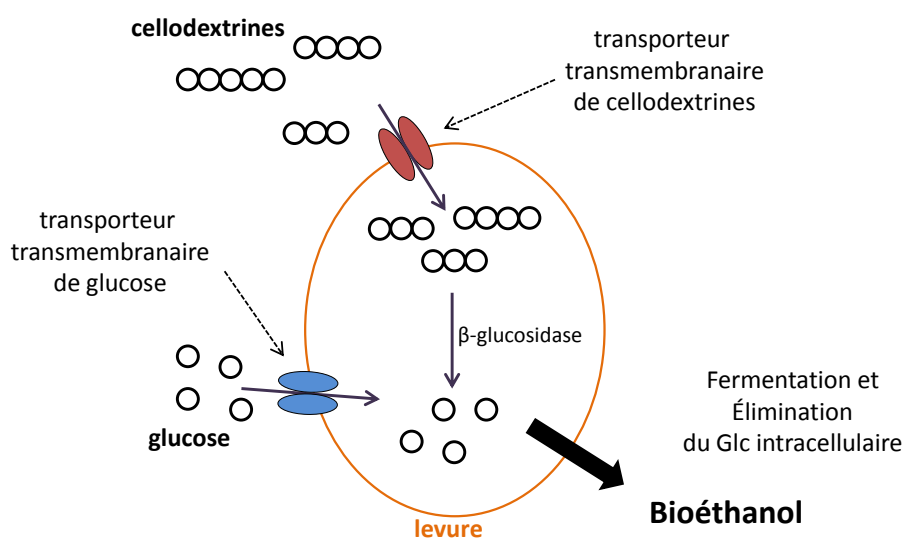


Figure 20 : Mécanisme d'internalisation des cellodextrines dans la levure pour la production d'éthanol, d'après Galazka *et al.* [45]

Les rendements obtenus sont comparables à ceux obtenus industriellement à partir du glucose. Les levures exprimant ce gène de transport devrait donc permettre une nette amélioration des rendements de production de bioéthanol par saccharification et fermentation simultanée^[47] (SSF).

1.2.2.4. Les cellodextrines comme prébiotiques

La cellulose est un substrat récalcitrant qui n'est pas dégradé par la plupart des mammifères car ils ne possèdent pas les enzymes pour sa dégradation. En revanche les herbivores et ruminants dont le régime alimentaire consiste principalement de polysaccharides pariétaux sont capables de la digérer. Leur digestion intervient par fermentation microbienne qui permet la génération de courtes chaînes d'acides gras assimilables, comme le butyrate ou l'acétate^[48]. Chez les ruminants, 70% des apports caloriques sont comblés par ces chaînes grasses volatiles alors qu'en comparaison, l'Homme ne peut en tirer que 10% de ses apports^[49]. Cette capacité qu'a le système enzymatique des bactéries composant le rumen de dégrader rapidement les polysaccharides en monosaccharides et en leurs dérivés est très intéressante^[50]. Les bactéries intestinales ont accès aux substrats qui ne sont pas digérables par le système

propre de l'hôte dans le rumen. Le régime alimentaire influence donc la nature et la qualité de la flore intestinale, ainsi que les produits qui en sont issus^[51].

Depuis quelques années, le marché des aliments fonctionnels s'est considérablement développé. Ces aliments sont consommés dans le cadre du régime alimentaire quotidien, et apportent au-delà des apports nutritionnels des bénéfices sur la santé sur le point physiologique. Ils réduiraient ainsi le risque de contracter certaines maladies chroniques. Des études ont montré qu'enrichir le régime alimentaire avec certains sucres précurseurs améliore la production de leurs acides gras dérivés qui auraient une action positive sur la santé : c'est le développement des prébiotiques. Ces molécules ne sont pas dégradables par les bactéries intestinales et favorisent le développement de certaines bactéries bénéfiques. Une majorité d'entre eux sont composés de sucres de 2 à 20 unités^[52], nommés les Non-Digestible Oligosaccharides (NDO). Russell a décrit en 1984 la fermentation de cellodextrines par les bactéries cellulolytiques du rumen^[53]. Récemment, Pokusaeva *et al.* ont démontré qu'une bactérie intestinale *Bifidobacterium breve* est capable de se développer sur des cellodextrines^[54]. Cela démontre l'existence naturelle de bactéries capables de dégrader les cellodextrines par voie métabolique. Otsuka *et al.* ont montré en 2004 que l'apport de cellodextrines comme compléments alimentaires améliore la croissance des porcs^[55]. Récemment en 2011, Hasunuma *et al.* ont fait les mêmes observations sur la croissance des veaux^[56]. Les celooligosaccharides sont des oligosaccharides non-digérables (NDO), ayant des propriétés prébiotiques.

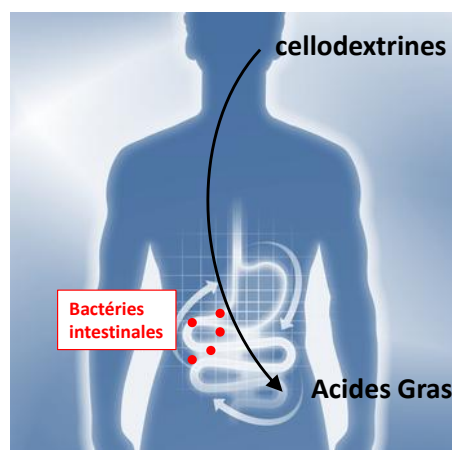


Figure 21 : Les cellodextrines comme compléments alimentaires potentiels

Des études préliminaires sur l'effet de ces NDO sur l'Homme et en particulier sur les cellodextrines ont été initiées par Satouchi *et al.* en 1996 et ont montré que les

cellodextrines pourraient être dégradées au sein du système abdominal. Watanabe *et al.* (1998) et Nakamura *et al.* (2004) ont poursuivi ces études et montreraient leurs effets sur la prévention du diabète et de l'obésité ^[57, 58] par la stimulation sélective de certaines bactéries du colon. Les cellodextrines sont à ce jour à l'étude pour leur utilisation en tant que compléments alimentaires pour leurs effets bénéfiques sur l'organisme.

La cellulose est un polysaccharide naturel d'intérêt puisqu'elle possède de nombreuses applications industrielles^[59] sous sa forme naturelle en tant que matériau, renfort ou encore en tant qu'additif alimentaire sous la classification E460. La cellulose est la matière première pour la fabrication de dérivés de cellulose qui représentent également un très large marché. Ils trouvent des applications dans des secteurs aussi variés que l'agroalimentaire, les matériaux ou le textile. Avec la pénurie imminente en énergies fossiles, le glucose et les sucres fermentables suscitent un grand intérêt des industriels de l'énergie pour la production de bioéthanol et de produits chimiques biosourcés. Au-delà des énergies, un marché considérable se développe autour des produits issus de la biomasse, qui représente une source de matière première abondante, peu onéreuse et renouvelable. La valorisation de la cellulose en oligosaccharides et en cellodextrines passe en premier lieu par son hydrolyse.

II. Conversion de la cellulose

La cellulose est une matière première avantageuse pour de multiples raisons, et en particulier pour son abondance naturelle et sa disponibilité. Ce polysaccharide suscite l'intérêt des scientifiques et industriels depuis des dizaines d'années sans tarir, et surprend par sa complexité malgré une structure qui apparaît relativement simple. Depuis toujours, la conversion de la cellulose en glucose et en dérivés de cellulose est très étudiée. Plus de 3000 articles scientifiques sont référencés sur l'hydrolyse de la cellulose dans la base de données SciFinder® (juillet 2012). Différentes techniques de dépolymérisation s'appuyant sur des principes chimiques ou physiques existent. La plupart des méthodes sont développées à partir de la matière végétale brute lignocellulosique, incluant cellulose, lignine et héli-cellulose.

II.1. Hydrolyse de la cellulose

De nombreux procédés permettent de dépolymériser totalement la cellulose pour sa conversion en glucose ou en produits de dégradation des sucres. Ces techniques comprennent des procédés chimiques, physico-chimiques, enzymatiques ou encore des combinaisons de plusieurs procédés.

II.1.1. Hydrolyse chimique

II.1.1.1. Hydrolyses acides

Les méthodes de prétraitement et d'hydrolyse chimiques en milieu acide utilisent des acides minéraux. Ces réactifs sont des outils performants permettant de réaliser la dépolymérisation de la cellulose de manière efficace. L'avancement de ce type de réaction n'est toutefois que très peu contrôlable. Afin d'orienter la réaction vers la formation de cellodextrines ou de glucose, les paramètres tels que la concentration, la nature de l'acide, la température, la pression et le temps de réaction sont à moduler. De manière générale, les hydrolyses acides sont réalisées en milieu concentré à basse température, ou en milieu dilué à température élevée. Les acides principalement utilisés sont les acides hydrochlorique, sulfurique, ou phosphorique.

La méthode la plus décrite dans la littérature est celle de Miller *et al.*, décrite en 1960, par laquelle des rendements de 25% en cellodextrines sont obtenus par hydrolyse à l'acide hydrochlorique fumant^[60]. Liebert *et al.* décrivent une méthode de production de cellodextrines par hydrolyse à l'acide phosphorique concentré à 55°C. Les auteurs décrivent des rendements très variables compris entre 5 et 53% en cellodextrines solubles après 20 heures d'hydrolyse^[61]. Les méthodes utilisant l'acide sulfurique dilué sont beaucoup moins utilisées et présentent comme décrit par Voloch *et al.* des rendements en cellodextrines de DP 1-8 très faibles, de moins de 2%^[62]. Avec l'acide sulfurique concentré, la formation du glucose est favorisée, et les rendements s'élèvent à 35%^[63]. Récemment, Zhang *et al.* ont élaboré une méthode permettant d'obtenir des rendements de 40% en cellodextrines de DP 1 à 9 au moyen d'un mélange d'acides hydrochlorique et sulfurique^[64].

Ces différentes méthodes diffèrent surtout par le temps de réaction et la nature de l'acide utilisé.

Bien que ces méthodes d'hydrolyse acide soient relativement efficaces, elles présentent de nombreux inconvénients. Les réactifs utilisés sont très corrosifs, toxiques et dangereux. Le contrôle de la réaction est délicat, et il n'y a pas de sélectivité quant aux espèces formées. La génération de mélanges de nombreuses espèces de cellodextrines rend leur purification très délicate. De plus, l'utilisation de conditions très acides engendre la production de produits secondaires issus de la décomposition du glucose en milieu acide comme le 5-(hydroxyméthyl)furfural (HMF) et l'acide levulinique^[65] dont il est souvent difficile de s'affranchir.

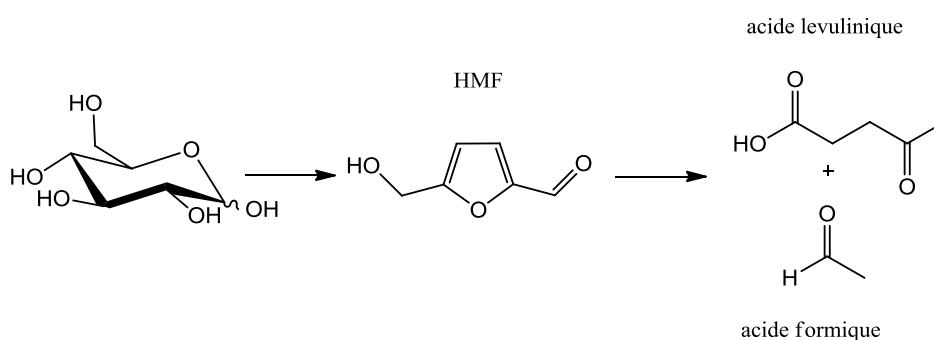


Schéma 1 : Décomposition du glucose en milieu acide

La production de cellodextrines est limitée ici par la formation de ces dérivés. Ces méthodes d'hydrolyse par des acides minéraux ne sont pas idéales pour la production de cellodextrines. Elles soulignent le besoin de développer des méthodes d'hydrolyse plus contrôlables pour une meilleure efficacité.

II.1.1.2. Acétolyse

L'acétolyse de la cellulose permet l'hydrolyse et la peracétylation simultanée de la chaîne de cellulose. Dickey et Wolfrom décrivent en 1949 la réaction au cours de laquelle un mélange d'acide acétique, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique permet la production rapide d'oligosaccharides peracétylés de DP 1 à 9 en moins de quatre heures^[66]. Cette méthode d'obtention de cellodextrines par modification chimique permet d'obtenir des rendements du même ordre que les hydrolyses acides. Elle requiert toutefois une étape supplémentaire de désacétylation. Les conditions réactionnelles présentent les mêmes inconvénients de corrosivité, de nocivité et de contrôle que les hydrolyses aux acides minéraux. Néanmoins, la différence de mobilité sur silice des cellodextrines acétylées est plus marquée et permet de faciliter la purification de mélanges d'espèces de tailles différentes.

II.1.1.3. Hydrolyse par catalyse acide en phase hétérogène

L'hydrolyse de la cellulose par un catalyseur acide solide emploie le plus souvent un support inerte (base carbone, silice, zéolithe, polymère) portant des groupements –COOH, SO₃H ou –OH ou des catalyseurs métalliques, utilisés à des températures élevées^[67]. Ce traitement fait partie de la classe des hydrolyses acides, et procure des résultats comparables à ceux obtenus par hydrolyse en acide minéral concentré. L'avantage majeur d'un tel procédé réside dans la possibilité de recycler le catalyseur. Cela permet de limiter les quantités d'agents chimiques, en gardant une réactivité importante. Récemment, une revue parue de Guo *et al.* soulève l'efficacité de ces catalyseurs qui peuvent produire en moyenne jusqu'à 80% de glucose à partir de cellulose^[68]. En 2008, Onda *et al.* ont d'ailleurs décrit un procédé à partir de cellulose amorphe permettant d'obtenir de très bons rendements en glucose en utilisant des groupements acide sulfonique^[69]. Dans certaines conditions, ces méthodes sont employées dans le but d'obtenir des produits de dégradation, par exemples pour la production d'acides gras pour le biodiesel^[70, 71].

II.1.1.4. Hydrolyse en milieu alcalin

La dépolymérisation de cellulose en milieu alcalin regroupe principalement les hydrolyses, ou les réactions de "peeling off". Les hydrolyses basiques sont réalisées au moyen de soude, de chaux ou d'ammoniaque. Peu de données sont reportées dans la littérature, ce sont des procédés qui sont peu utilisés pour la saccharification. Li *et al.* ont cependant décrit une méthode de prétraitement par la soude diluée couplée à des irradiations qui permet d'atteindre 40% de rendement de saccharification^[72]. Les agents alcalins sont dans la plupart des cas employés comme agents gonflants de la cellulose. Les réactifs peuvent alors s'insérer à l'intérieur des fibres de cellulose pour permettre la rupture des liaisons hydrogène.

Les procédés alcalins sont principalement utilisés comme prétraitement pour s'affranchir de la lignine et de l'hémicellulose, et peu pour l'hydrolyse. Par cela ils permettent d'augmenter la surface spécifique^[73].

II.1.1.5. Eclatement des fibres à l'ammoniac (AFEX)

Le prétraitement par éclatement des fibres à l'ammoniaque consiste à porter la cellulose dans l'ammoniaque liquide à hautes température et pression pendant une courte durée. Ensuite l'opération consiste à faire chuter la pression pour provoquer une décompression explosive des fibres. L'ammoniaque est un agent alcalin gonflant qui pénètre facilement à l'intérieur des fibres afin de changer sa structure cristalline. L'hydrolyse enzymatique réalisée sur la cellulose prétraitée avec le procédé AFEX (Ammonia Fiber Explosion) présente des rendements en sucre très proches des rendements théoriques. Cependant, le procédé n'est pas avantageux pour s'affranchir de la lignine^[74]. L'avantage d'AFEX réside dans le fait que la formation de dérivés de dégradation est plus limitée par rapport aux procédés acides^[75]. Néanmoins du point de vue industriel, cette opération implique des coûts importants de recyclage de l'ammoniaque.

II.1.2. Hydrolyse enzymatique

Dans la nature, certaines enzymes sont capables de dégrader la cellulose. Les hydrolyses chimiques et physico-chimiques sont efficaces pour la conversion de la cellulose en glucose mais contrairement aux enzymes, elles engendrent la formation de dérivés de dégradation. De plus, l'utilisation d'enzymes implique des conditions réactionnelles plus douces.

II.1.2.1. Les cellulases

Les cellulases sont les enzymes responsables de l'hydrolyse de la cellulose et font partie de la famille des glycoside-hydrolases. Elles sont secrétées par des champignons, ou associées à la surface des micro-organismes où elles forment des cellulosomes. Parmi les cellulases, trois types d'enzymes se distinguent par la particularité de leur mode d'action hydrolytique sur la cellulose.

- Les endoglucanases (EG) sont des enzymes qui ont la propriété de réaliser des coupures aléatoires dans le milieu des chaînes de cellulose amorphe.

- Les cellobiohydrolases (CBH) hydrolysent la cellulose de manière processive, c'est à dire qu'elles s'ancrent sur la chaîne de cellulose pour réaliser la dépolymérisation, et se déplacent le long de la chaîne^[76]. Les cellobiohydrolases I (CBHI) hydrolysent les chaînes en direction de leurs extrémités réductrices pour libérer du cellobiose, tandis que les cellobiohydrolases II (CBHII) agissent en direction de leurs extrémités non-réductrices.
- Les β -(1,4)-glucosidases hydrolysent le cellobiose ainsi que les cellodextrines solubles en glucose.

Les cellulases agissent en synergie grâce à leurs actions hydrolytiques complémentaires afin de parvenir à dégrader les chaînes de cellulose^[77]. Les cellulosomes possèdent ces trois types d'activités réunies et cela permet ainsi la dégradation totale du polysaccharide (Figure 22).

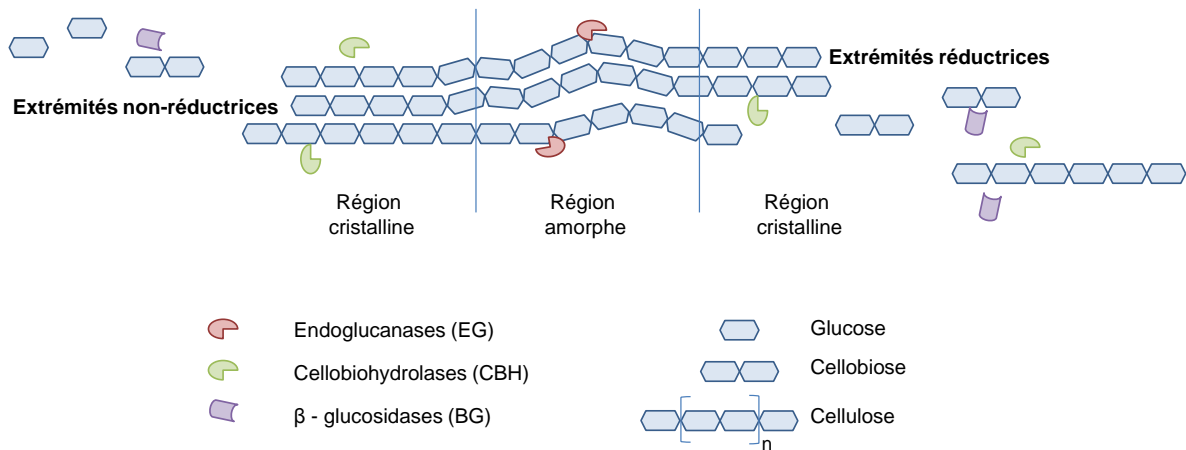


Figure 22 : Schéma représentatif du mode d'action synergique des cellulases, adapté de Gusakov^[78]

La majorité des cellulases sont composées de trois parties structurales :

- le module de liaison à la cellulose (CBM) qui permet à la cellulase de s'ancrer sur la chaîne. Ce module est capital pour les enzymes processives,
- le site catalytique^[76],
- un bras espaceur qui permet d'établir une distance utile entre le CBM et le site catalytique.

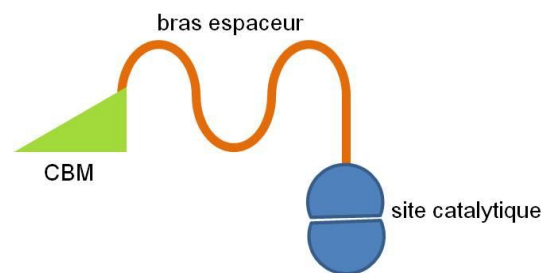


Figure 23 : Domaines structuraux des cellulases

Le type d'activité enzymatique est lié à la topologie de son site actif. La prise en charge d'un substrat dépend en partie de sa morphologie et de sa structure. Il existe trois différents types de topologie pour les cellulases schématisés dans la Figure 24, d'après Davies et Henrissat^[79].

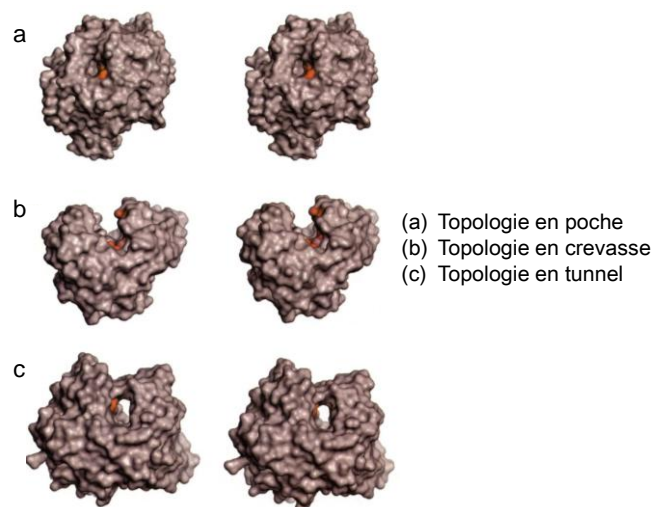


Figure 24 : Topologies des sites actifs des cellulases, d'après Davies et Henrissat^[79]

- La topologie de type "poche" permet la reconnaissance de l'extrémité non-réductrice des sucres. Ce type de site se retrouve chez les β -glucosidases qui sont alors des enzymes est très adaptées pour la dégradation de courts oligosaccharides comme les cellodextrines et en revanche inactive sur la cellulose native où les extrémités de chaînes sont moins nombreuses et peu accessibles ;
- La topologie de type "crevasse" permet de se lier aléatoirement à plusieurs unités de glucose à la fois, permettant la coupure hydrolytique de longues chaînes saccharidiques. Ce type de site se retrouve chez les endo-enzymes, comme les endoglucanases ;
- La topologie de type "tunnel" implique la présence de longues boucles permettant de fermer la crevasse. Les substrats s'insèrent ainsi dans le tunnel ou la coupure hydrolytique est réalisée. L'hydrolysate est alors relargué tandis que le substrat reste lié à l'enzyme, qui continue son activité d'hydrolyse le long de la chaîne. Ce type de site se trouve chez les cellobiohydrolases, qui agissent donc avec processivité. Il est à noter que certaines endoglucanases décrites comme processive fonctionnent selon ce principe. L'enzyme a la capacité d'ouvrir et fermer ses boucles pour faire entrer et piéger les oligosaccharides au sein du site.

II.1.2.2. Saccharification enzymatique

Les cellulases sont généralement utilisées de façon industrielle pour la dégradation de la cellulose en sucres fermentables pour la production de bioéthanol. L'avantage de l'hydrolyse biocatalysée réside dans le fait qu'elle permet de s'affranchir de la formation non-désirable de produits secondaires provenant de l'hydrolyse du glucose en conditions acides ou à haute température.

L'hydrolyse enzymatique de la matière lignocellulosique brute par les cellulases n'est pas optimale. En effet, l'hémicellulose entourant les microfibrilles de cellulose constitue une barrière physique qui la protège des hydrolyses enzymatiques. La lignine fait office de ciment et est responsable de l'intégrité et de la rigidité structurale du

substrat végétal. Ainsi, une étape de prétraitement permettant de s'affranchir de la lignine et de l'hémicellulose permet d'améliorer l'hydrolyse (Figure 25).

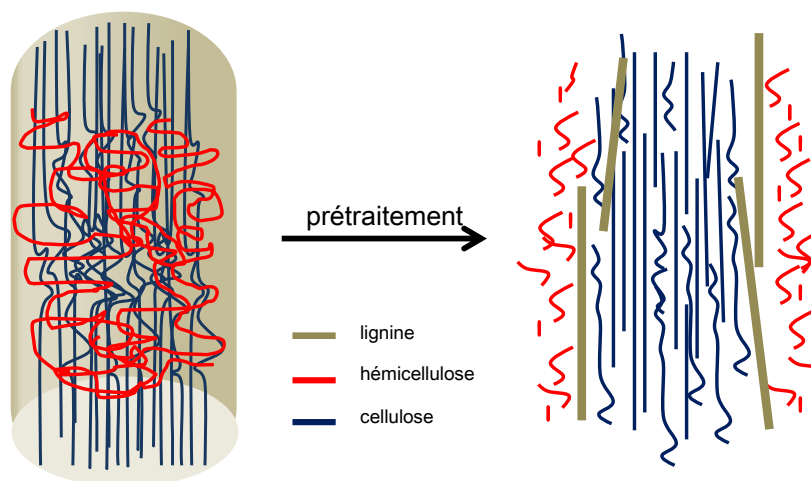


Figure 25 : Prétraitement de la lignocellulose (adapté de Hsu *et al.* 1980)

Les cellulases et l'hydrolyse enzymatique de la cellulose sont étudiées depuis plusieurs décennies. La récalcitrance de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique totale demeure toujours un défi, et ce pour plusieurs raisons. L'une des principales barrières à l'hydrolyse réside dans l'insolubilité de la cellulose dans l'eau. Cette insolubilité cause un accès limité des enzymes aux liaisons osidiques. La cristallinité de la cellulose est un facteur limitant majeur. En effet, l'efficacité des cellulases pour dégrader le polysaccharide réside dans leur complémentarité. Leurs actions sont simultanées, cependant la rapidité et l'efficacité du processus d'hydrolyse passe d'abord par l'action des endoglucanases. Elles permettent de réduire la taille des chaînes, créant ainsi une quantité croissante de bouts de chaînes. Ces extrémités peuvent ensuite être prises en charge par les CBH, puis de la même manière par les β -glucosidases. Or les endoglucanases sont extrêmement peu actives sur la cellulose cristalline^[77, 80]. Pour réaliser l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, il convient donc d'exécuter une étape préalable de prétraitement par laquelle la cellulose cristalline est rendue amorphe^[81]. La réactivité des enzymes sur la cellulose prétraitée en est alors nettement améliorée puisque dans des concentrations enzymatiques adaptées, les chaînes leur deviennent totalement accessibles. La conversion de la cellulose approche alors les rendements théoriques en glucose.

L'hydrolyse de la cellulose se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, la réaction d'hydrolyse est rapide, puisque les endoglucanases permettent la réduction massive de la taille des chaînes. Les CBH peuvent alors agir sur les zones cristallines résiduelles et hydrolyser les chaînes de cellulose en cellobiose, puis les β -glucosidases agissent sur le cellobiose et les oligosaccharides solubles libérés. Au cours de la réaction, la vitesse d'hydrolyse diminue jusqu'à transformation totale de la cellulose. Ce ralentissement intervient lorsque les enzymes ont hydrolysé les parties qui leur sont le plus accessibles.

Les cocktails d'enzymes regroupant toutes les classes de cellulases permettent donc dans certaines conditions la conversion totale de la cellulose. Une saccharification peut être rendue optimale lorsque les conditions réactionnelles réunissent :

- Cellulose prétraitée accessible aux cellulases,
- Conditions de température et pH optimales pour l'enzyme,
- Concentrations en enzymes adaptées.

L'avantage majeur des hydrolyses de la cellulose réalisées par voie enzymatique se trouve dans l'absence de produits de dégradation des sucres. Néanmoins, les hydrolyses enzymatiques sont peu utilisées car elles ne sont pas rentables au vu des quantités nécessaires pour mener une dépolymérisation enzymatique. L'ingénierie des enzymes, et de leurs substrats est un axe de recherche important, spécialement pour la conversion de la cellulose pour de gros tonnages, pour l'industrie des biocarburants par exemple.

Différents procédés chimiques ou physico-chimiques ont été développés afin de réaliser le prétraitement de la cellulose afin de parvenir à une meilleure digestibilité enzymatique.

II.1.2.3. Prétraitement de la cellulose

Plusieurs méthodes de prétraitement de la biomasse ont été développées afin de préparer un substrat plus propice à l'action des cellulases. Ces techniques font recourt à des principes chimiques et physico-chimiques. Suivant les conditions utilisées, la plupart des procédés de prétraitement permettent également l'hydrolyse de la cellulose. Parmi elles se retrouvent principalement des procédés de traitements chimiques, mécaniques, par irradiation ou par explosion de vapeur.

II.1.2.4. Broyage

Les procédés de prétraitement mécanique par broyage sont très efficaces pour la transformation de la cellulose cristalline à amorphe. Le stress mécanique appliqué à la structure cristalline par le procédé de broyage engendre un échauffement rapide, qui accélère sa transformation en cellulose amorphe. Le broyage permet la réduction de la taille des particules^[82] et une diminution radicale de la cristallinité de la cellulose^[83], ce qui améliore sa dégradation enzymatique. Le procédé est efficace, cependant la consommation énergétique pour sa réalisation est élevée^[84].

II.1.2.5. Eclatement à la vapeur

Cette méthode est très couramment utilisée pour le prétraitement de la matière lignocellulosique. Le principe repose sur la montée en pression de l'atmosphère saturée en eau du réacteur contenant la biomasse (point critique de l'eau 374°C, 22.1 MPa). En diminuant la pression, il se produit une explosion décompressive qui entraîne sa dégradation. L'opération est rapide, le temps de résidence à haute pression est souvent inférieur à dix minutes. Ce procédé atteint de hautes températures, ce qui permet de s'affranchir de l'hémi-cellulose et de la lignine pour offrir aux enzymes un meilleur accès à la cellulose^[85]. Par exemple, Grous *et al.* ont montré que la cellulose prétraitée par explosion de vapeur était hydrolysée à 90% en 24 heures par des endoglucanases d'*A.niger* et de *T.viride*, pour seulement 15% à partir de cellulose non-prétraitée^[86]. A température élevée, l'eau agit comme un acide, ce qui catalyse la dégradation de la cellulose en glucose. De plus les conditions d'opération promeuvent l'auto-hydrolyse de la cellulose par la formation d'acides provenant de la dégradation des sucres à haute température^[87]. Ce procédé présente des avantages économiques car il est moins

consommateur d'énergie, et il ne génère pas de coûts de recyclage. Il permet la production de cellulose réactive aux cellulases. Cependant, la génération d'acide lors du procédé entraîne inévitablement la formation de produits de dégradation, qui peuvent être inhibiteurs pour de futures étapes de transformation en vue de produire des biocarburants.

II.1.2.6. Dioxyde de carbone supercritique

Sur le même principe que le procédé d'explosion à la vapeur, l'eau est ici remplacée par du CO₂ qui pénètre facilement à l'intérieur des fibres grâce à la pression appliquée^[88]. Ce procédé possède de nombreux avantages liés principalement aux propriétés du CO₂. Il est économiquement avantageux et non toxique donc compatible avec les règles environnementales^[89]. Les produits formés sont facilement isolables. Du fait que le traitement est effectué à 31°C et 7MPa, il ne génère pas de dérivés secondaires inhibiteurs des cellulases contrairement aux procédés à la vapeur d'eau ou à l'ammoniaque. En 1982, Dale *et al.* ont obtenu un rendement théorique en glucose de 75% après 24 heures d'hydrolyse enzymatique sur de la luzerne prétraitée au CO₂ supercritique^[90]. Sur la cellulose prétraitée en milieu dioxyde de carbone supercritique, des exemples de la littérature reportent d'ailleurs des rendements en glucose quantitatifs par hydrolyse enzymatique^[91, 92]. Le procédé est actuellement étudié pour réaliser l'hydrolyse enzymatique en milieu CO₂ supercritique. Muratov et Kim ont réalisé l'hydrolyse enzymatique de cellulose de coton en CO₂ supercritique par des cellulases de *T. viride* pendant 48 heures à 50°C et 120atm. Ils ont pu obtenir de bons rendements en glucose atteignant 92%^[93]. Les rendements issus de ces procédés rendent la technique intéressante pour la conversion de la cellulose en glucose. Elle est d'autant plus avantageuse qu'elle permet de s'affranchir de la formation de produits de dégradation des sucres

Ces procédés sont efficaces, mais impliquent pour la plupart des conditions réactionnelles complexes, notamment pour le travail sous pression. Depuis les années 2000, les liquides ioniques sont très étudiés et en particulier dans le domaine de la cellulose, car ils représentent une alternative avantageuse aux méthodes de prétraitement actuelles.

II.2. Apport des liquides ioniques à la conversion de la cellulose

II.2.1. Liquides ioniques : généralités

Les liquides ioniques sont des sels fondus, liquides à des températures inférieures à 100°C constitués par l'association d'un anion et d'un cation. Il existe une sous-catégorie de liquides ioniques regroupant les sels liquides à des températures inférieures à 30°C (Room-Temperature Ionic Liquids (RTIL)). La première description d'un liquide ionique dans sa définition actuelle a été faite par Paul Walden en 1914, lorsqu'il décrit la formation d'un sel liquide à température ambiante, le nitrate d'éthylammonium^[94]. A leurs prémices, les liquides ioniques étaient peu étudiés puisqu'à l'époque ils ne présentaient pas d'applications. Depuis les années 1990 et le début des études physico-chimiques de ces sels, l'intérêt pour cette classe de molécules croît exponentiellement comme l'indique la Figure 26. En 2012, le mot clef "ionic liquids" rassemble plus de 30000 références dans SciFinder® contre 7 en 1990. C'est l'un des domaines qui s'est le plus rapidement développé cette dernière décennie. Les liquides ioniques se trouvent également sous plusieurs synonymes comme sels fondus, sels d'onium ou fluides ioniques.

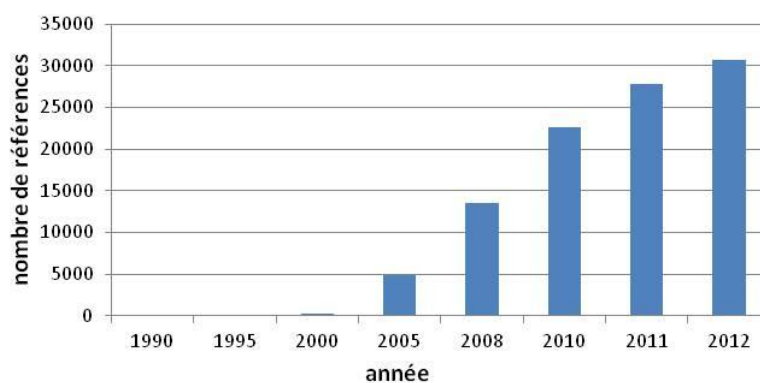


Figure 26 : Evolution du nombre de références SciFinder pour "ionic liquids" de 1990 à 2012

Dans la structure des liquides ioniques, au moins un des deux ions est de nature organique, le plus souvent le cation. En général on retrouve le pyridium et le methylimidazolium^[95] en tant que cation, associé à un anion inorganique comme

couramment les halogènes $[\text{Cl}]^-$, $[\text{F}]^-$ ou $[\text{Br}]^-$ ou encore des anions moléculaires tels que $[\text{BF}_4]^-$ et $[\text{PF}_6]^-$.

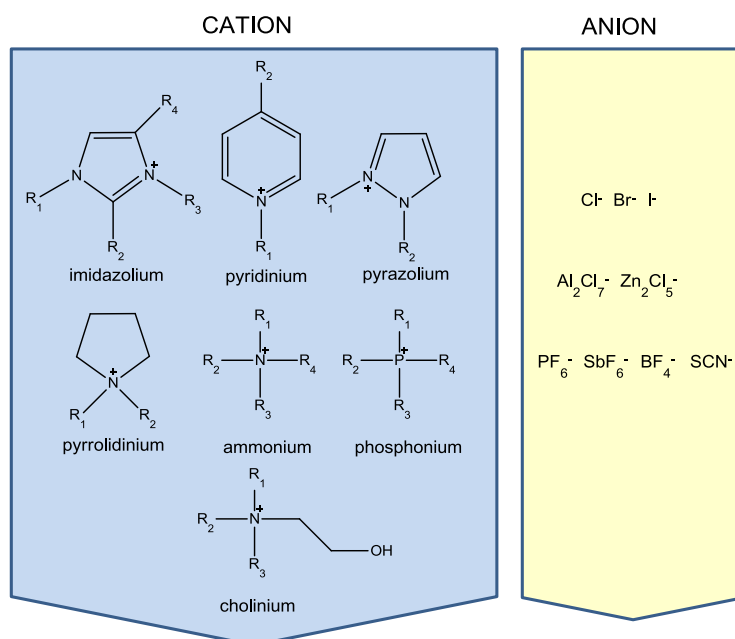


Figure 27 : Liquides Ioniques courants

Chaque combinaison ionique donne lieu à des propriétés physico-chimiques différentes. Les liquides ioniques possèdent en effet de nombreuses propriétés remarquables comme leur faible tension de vapeur et leur faible inflammabilité, leur grande stabilité chimique et thermique et leur large fenêtre électrochimique. Les propriétés des liquides ioniques sont liées aux caractéristiques des ions, de ce fait leurs propriétés sont totalement modulables. Ainsi leurs propriétés de polarité, de viscosité, de point de fusion, leur capacité de solvation varient suivant la structure du liquide ionique, et il est alors possible d'élaborer une combinaison adéquate possédant les propriétés recherchées.

Les liquides ioniques sont de plus en plus utilisés dans des domaines comme la synthèse organique, la catalyse ou l'électrochimie^[96]. Ils sont recyclables^[97], et cela constitue une caractéristique intéressante pour l'industrie des points de vue économique et environnemental. Ils font progressivement leur entrée dans les procédés industriels^[98], comme le procédé BASIL® (Biphasic Acid Scavenging utilising Ionic Liquids) lancé en 2002 par BASF (Figure 28).

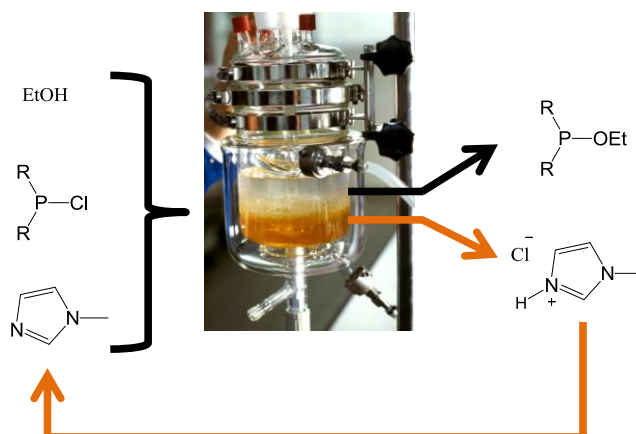


Figure 28 : Procédé BASIL® , (photo extraite du site internet BASF, the chemical company)

Ce procédé pionnier du domaine apparaît jusqu'à présent comme l'un des plus réussis. Il est utilisé pour la synthèse de précurseurs de photo-amorceur alkoxyphenylphosphines. Cette synthèse engendre la formation d'HCl, et classiquement la triéthylamine est utilisée comme base pour la neutralisation *in situ*. Cela forme des sels compacts dont il est très difficile de s'affranchir. L'utilisation de liquide ionique méthyl-imidazolium comme capteur de proton ne permet pas de s'affranchir des sels, mais ceux-ci sont sous forme liquide et s'éliminent très facilement par séparation de phase.

II.2.2. Solubilité de la cellulose en liquide ionique

Parmi les propriétés des liquides ioniques, leur capacité à dissoudre les polysaccharides est remarquable. En 2002, Swatloski *et al.* ont décrit pour la première fois la dissolution de la cellulose en liquide ionique, en utilisant notamment des combinaisons impliquant un noyau méthyl-imidazolium comme cation et différents halogénures comme anion^[99] (Figure 29). L'étude démontre que les liquides ioniques sont des solvants de la cellulose qui ne modifient pas sa structure chimique. La capacité du liquide ionique à dissoudre la cellulose est intimement liée à sa capacité à accepter les liaisons hydrogène. Ici la substitution du noyau 1-alkyl-3-méthyl-imidazolium par une chaîne alkyle plus ou moins grande influence également la bonne dissolution de la cellulose.

Liquide ionique	méthode	Solubilité (%w/w)
[C ₄ MIm]Cl	Δ 100°C	10%
[C ₄ MIm]Cl	Δ 70°C	3%
[C ₄ MIm]Cl	Δ 80°C + sonication	5%
[C ₄ MIm]Cl	Δ Micro-ondes	25% solution
[C ₄ MIm]Cl	Δ Micro-Ondes, 3-5s impulsion	Solution visqueuse
[C ₄ MIm]Br	Δ Micro-ondes	5-7%
[C ₄ MIm]SCN	Δ Micro-ondes	5-7%
[C ₄ MIm]BF ₄	Δ Micro-ondes	Insoluble
[C ₄ MIm]PF ₆	Δ Micro-ondes	Insoluble
[C ₆ MIm]Cl	Δ 100°C	5%
[C ₈ MIm]Cl	Δ 100°C	Très peu soluble

Figure 29 : Solubilité de la cellulose en liquide ionique (adapté de Swatloski *et al.*^[99])

La taille des chaînes de cellulose et son origine entrent également en compte puisque plus le DP est élevé, plus la capacité de dissolution du liquide ionique diminue. Ainsi les rapports massiques de cellulose par rapport au liquide ionique sont variables. Par exemple le pourcentage massique de dissolution des linters de coton (DP 1200) est inférieur à celui de la cellulose microcristalline (DP 300), dans les mêmes conditions. La capacité de dissolution de la cellulose de plusieurs dizaines de liquides ioniques est mentionnée dans une revue de Wang *et al.*^[100] parue en 2012. Parmi ceux-ci, les liquides ioniques composés d'un cation Imidazolium apparaissent comme les plus performants, avec un pouvoir de dissolution de la cellulose microcristalline (Avicel) compris entre 0,5 et 27% en poids de liquide ionique. Toutefois, les propriétés de chacun sont très variables en fonction du contre-ion mais aussi de la substitution de noyau imidazolium.

Dans la littérature, BMIm-Cl (1-butyl-3-méthyl-imidazolium chloride) représenté en Figure 30, est décrit comme l'un des meilleurs solvants pour la cellulose, capable de dissoudre jusqu'à 25% en masse de cellulose micro-cristalline^[99, 101, 102]

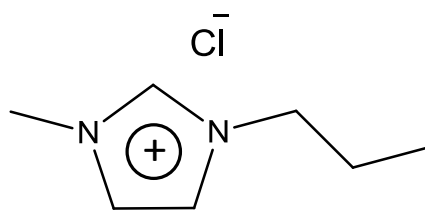


Figure 30 : 1-Butyl-3-Methyl-Imidazolium Chloride

Les mécanismes de dissolution de la cellulose par les liquides ioniques ne sont pas à ce jour totalement élucidés, et plusieurs mécanismes sont avancés. Néanmoins, l'anion du liquide ionique apparaît avoir un rôle particulier lors de la dissolution. Remsing *et al.* décrit notamment la capacité des ions Cl^- à pénétrer dans la structure interne de la cellulose afin de former des liaisons hydrogène avec les groupements hydroxyle^[103]. Cela provoque la désorganisation majeure du réseau cristallin de la cellulose.

II.2.3. Modification de la cellulose en liquide ionique

Grâce à leurs propriétés de solvants non-dérivatisants, les liquides ioniques permettent la réalisation de modifications chimiques de la cellulose mais aussi des mono- et oligosaccharides. Des procédés d'estérification et d'étherification en liquide ionique se sont développés permettant une amélioration des rendements, du contrôle du degré de substitution (DS) et de la distribution par rapport aux procédés conventionnels. Par exemple, Zhang *et al.* ont décrit l'acétylation de la cellulose dans le liquide ionique AMIm-Cl (A :Allyl) pour l'obtention de différents DS (0,9 à 2,7) en 0,5 à 23h^[104]. Egalement, Heinze *et al.* ont réalisé l'acylation et la carbonylation de la cellulose de manière efficace et rapide en milieu BMIm-Cl et ont obtenus des dérivés ayant un DS compris entre 2,5 et 3 en 2 heures^[105].

La modification de la cellulose en liquide ionique est de plus en plus étudiée car elle permet de former des dérivés homogènes, ainsi que de recycler les réactifs employés.

II.2.4. Prétraitement de la cellulose en liquide ionique

Il est établi que l'hydrolyse enzymatique de la cellulose requiert dans un premier temps une étape de prétraitement au cours de laquelle la cellulose native de type I est déstructurée et rendue amorphe. Les capacités de solvation des liquides ioniques permettent de réaliser cette étape de prétraitement par simple dissolution et re-précipitation de la cellulose dans un non-solvant. Les liaisons osidiques de la cellulose régénérée après dissolution en liquide ionique sont plus accessibles aux enzymes. Zhao *et al.* reportent une baisse de 58 à 75% de la cristallinité de la cellulose de départ après son prétraitement. L'activité des cellulases de *T. viride* sur la cellulose Avicel prétraitée est 2 à 10 fois supérieure que sur l'Avicel non régénérée^[106]. De plus, Dadi *et al.* ont observé des vitesses d'hydrolyses d'Avicel par des cellulase de *T. viride* 50 fois plus rapides que sur l'Avicel non-prétraitée^[107]. Cette activité importante des enzymes sur la cellulose régénérée est intéressante car elle pourrait permettre de diminuer les quantités d'enzyme afin de réaliser l'hydrolyse.

Les liquides ioniques permettent donc un accès avantageux vers le prétraitement de la cellulose en vue de sa saccharification par voie enzymatique. D'autres méthodes de prétraitement en liquide ionique se sont développées, et utilisent notamment les propriétés des micro-ondes pour réaliser une dissolution rapide favorisée par un chauffage homogène. Swatloski *et al.* ont décrit la dissolution de cellulose jusqu'à 25% en masse dans BMIm-Cl en utilisant le chauffage par micro-ondes. De plus, en utilisant des impulsions de 3 à 5 secondes de micro-ondes, la solubilité de cellulose de DP 1000 a été améliorée de 150%.^[99] Il existe des méthodes de prétraitement employant les ultrasons en combinaison avec les micro-ondes afin d'aider d'autant plus à solubiliser la cellulose.

De ces méthodes, toutes présentent des taux de régénération en cellulose quasi totaux car le milieu n'altère pas la cellulose. La cellulose prétraitée issue permet ensuite une meilleure digestibilité des enzymes.

II.2.5. Hydrolyse de la cellulose en liquide ionique

De manière générale, les méthodes chimiques requièrent l'emploi de conditions fortes, comme un large excès d'acide ou des conditions de température et de pression élevées. Ces hydrolyses prennent place en premier lieu à la surface de la cellulose. Lors

d'une hydrolyse menée en liquide ionique, la cellulose est solubilisée. Les liaisons osidiques deviennent alors plus accessibles et sujettes à l'hydrolyse par protonation. Il est donc possible d'employer des conditions plus modérées. Le principal avantage des hydrolyses réalisées en liquides ioniques réside dans les quantités catalytiques d'acide nécessaires. Parmi ces méthodes, la nature du liquide ionique ainsi que la nature du catalyseur acide varient. Ainsi il peut s'agir d'acides minéraux (HCl, H₂SO₄) ou de résines acides sulfoniques, d'acides organiques (acides *p*-toluènesulfonique, camphorsulfonique), d'acides métalliques ou de Lewis comme le ZnCl₂ et FeCl₂^[108-110].

La valorisation de la cellulose passe par l'obtention d'oligosaccharides, qui peuvent ensuite être modifiés pour préparer des molécules d'intérêt. Les méthodes de dépolymérisation de la cellulose permettent d'accéder aux oligosaccharides avec des rendements très variables selon le procédé utilisé. De plus, la plupart d'entre elles ne permet pas de contrôler la taille des oligosaccharides formés et hydrolyse totalement la cellulose. Une alternative à la dépolymérisation consiste en la synthèse d'oligosaccharides. Il existe principalement deux approches pour synthétiser un oligosaccharide ou un polysaccharide : la voie chimique ou la voie enzymatique.

III. Synthèses chimique et enzymatique d'oligosaccharides

La synthèse d'oligosaccharides est très étudiée notamment en raison de l'implication des sucres dans de nombreux domaines biologiques. De nombreux outils se sont développés pour parvenir à la synthèse de ces biomolécules d'intérêt.

III.1. Synthèse chimique d'oligosaccharides

La synthèse chimique d'oligosaccharides représente dans la plupart des cas un travail fastidieux. La chimie des sucres se distingue par sa complexité liée à la réactivité particulière des groupements fonctionnels des glycosides. En effet pour mener une réaction de glycosylation chimique, les fonctions non concernées par le couplage doivent être protégées par des groupements qui ne réagiront pas lors de la réaction. La mise en place de stratégies de synthèses d'oligosaccharides doit donc être réalisée en suivant ces principes d'orthogonalité des groupements^[111]. Ce travail de protection, puis

déprotection des sucres est très consommateur de temps et influence largement les rendements de synthèse. De nouvelles techniques de synthèse chimique se développent permettant de faciliter les synthèses multi-étapes. Le groupe de P. Seeberger a notamment mis au point l'automatisation de la synthèse d'oligosaccharides, permettant la production d'oligosaccharides complexes nécessitant plusieurs étapes réactionnelles^[112].

Bien que cette méthode très performante apporte une amélioration à la difficulté de synthétiser des oligosaccharides par voie chimique, elle reste relativement singulière. Une alternative consiste en l'utilisation d'enzymes qui permettent de réaliser des réactions sélectivement, la protection des fonctions non impliquées n'étant alors plus nécessaire.

III.2. Synthèse enzymatique d'oligosaccharides

En synthèse de molécules glycosidiques, les enzymes sont des outils de couplage puissants qui sont de plus en plus utilisés. Parmi elles se trouvent principalement des enzymes dotées de capacités d'hydrolyse et de transglycosylation. Les enzymes peuvent se scinder en deux grandes catégories:

- les enzymes capables de modifier les liaisons osidiques (glycoside-hydrolases et glycosyl-transférases)
- Les enzymes permettant la "décoration" des sucres (estérases, phosphorylases, lipases, acylases, oxidases...)

Historiquement, la classification des enzymes s'effectue par la nomenclature IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) qui permet l'attribution du nom de l'enzyme selon son affinité pour un substrat et selon la réaction qu'elle catalyse. Celle-ci ne tient pas compte de la conformation structurale de l'enzyme. Un autre système a donc été développé permettant la nomenclature des enzymes agissant sur les sucres selon les homologues de séquences peptidiques et selon leur structure tridimensionnelle. Ce système de classification CAZY (Carbohydrate-Active enZYMes) élaboré par Henrissat *et al.* est aujourd'hui majoritairement utilisé^[113] (www.cazy.org).

La synthèse et la modification d'oligosaccharides sont particulièrement complexes, et les outils enzymatiques présentent de nombreux avantages par rapport à la synthèse chimique. Les principaux sont leur régio- et stéréosélectivité, et l'implication de conditions réactionnelles douces. En revanche, les enzymes nécessitent souvent des substrats particuliers, et la disponibilité d'enzymes pures est limitée.

La composition du site actif confère à l'enzyme la spécificité envers son substrat, et contrôle son activité catalytique. Dans la partie suivante, les glycosyl-transférases et les glycoside-hydrolases, qui sont les enzymes permettant la modification des liaisons osidiques, seront présentées.

III.3. Les glycosyl-transférases

III.3.1. Généralités

Les glycosyl-transférases sont les enzymes responsables de la biosynthèse des oligosaccharides et polysaccharides dans la Nature. Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement osidique activé appelé donneur sur un accepteur pouvant être osidique ou non. Les glycosyl-transférases se distinguent en deux groupes selon qu'elles agissent sur un donneur comportant un nucléotide (type Leloir) ou non (type non-Leloir) (Figure 31). Les donneurs de glycoside peuvent alors être :

- des monosaccharides phospho- ou diphospho nucléosides (donneur de type Leloir),
- des mono- ou oligosaccharides phospholipides (donneur de type non-Leloir),
- des sucres-1-phosphate ou 1-pyrosphosphate (donneur de type non-Leloir).

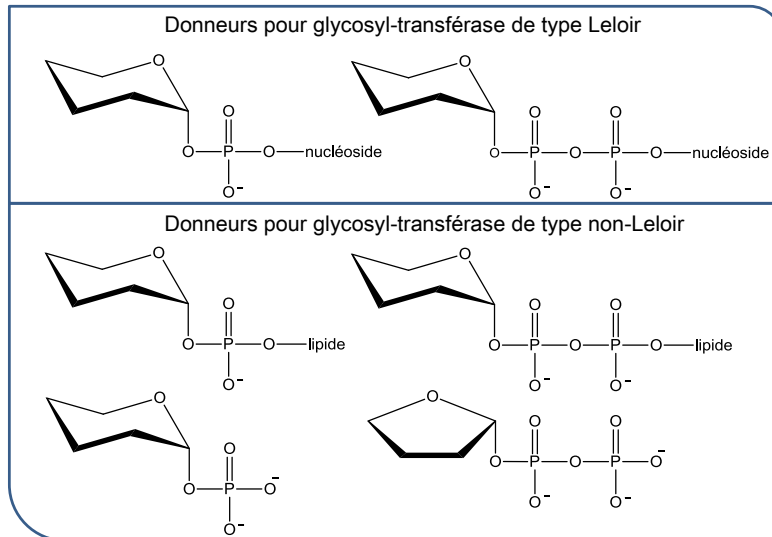


Figure 31 : Donneurs de glycoside pour les glycosyl-transférases

III.3.2. Activité des glycosyl-transférases

Les glycosyl-transférases constituent des outils enzymatiques très utilisés pour la synthèse d'oligosaccharide et de glyco-conjugués *in vitro*. Les glycosidases non-Leloir et Leloir diffèrent par la nature de leur donneur.

Glycosyl-transférase de type non-Leloir :

Les enzymes de type non-Leloir se différencient en deux catégories selon la présence d'un groupement phosphate activant sur le donneur de glycosyle. Si celui-ci est activé, les enzymes sont qualifiées de phosphorylases. Par exemple, Samain *et al.* ont développé une méthode de synthèse de cellodextrines par transglucosylation catalysée par la cellodextrine-phosphorylase de *Clostridium thermocellum*. Dans cette synthèse, l'enzyme est capable de synthétiser des cellodextrines à partir d'un donneur glucopyranosyl phosphate et d'un accepteur glucoside^[114]. Cette synthèse est efficace, néanmoins la taille des oligosaccharides produits n'est pas contrôlable.

Les donneurs qui ne sont pas activés par un groupement phosphate le sont par d'autres sucres, faisant alors office de groupements partants. Ces enzymes sont qualifiées de transglycosydases^[115].

Glycosyl-transférases de type Leloir :

Les enzymes de type Leloir sont responsables de la synthèse de la plupart des glycoconjugués se trouvant à la surface des cellules chez les mammifères, chez les plantes et champignons ainsi que chez les bactéries. Elles catalysent le transfert d'un donneur nucléotide-sucre, dont le nucléoside sert de groupement activant. Les enzymes de type Leloir se différencient entre elles par leur mécanisme de transfert glycosidique avec rétention ou inversion de configuration. Le mécanisme de transfert avec inversion de configuration implique un déplacement direct de type S_N2 au travers la formation d'un oxocarbénium de transition catalysé par une base (carboxylate). En revanche, le mécanisme de transfert avec rétention de configuration n'est pas totalement élucidé à ce jour. Plusieurs mécanismes ont été proposés, mais chacun indiquent dans une première étape la formation d'un oxocarbénium^[116]. Ils diffèrent ensuite dans la seconde étape où dans un cas le nucléophile serait généré par l'enzyme^[117], et dans l'autre cas le mécanisme serait de type S_Ni ^[118, 119].

III.3.3. Utilisation des glycosyl-transférases en synthèse

Les glycosyl-transférases sont reconnues comme étant de bons outils pour la synthèse d'oligosaccharides et de glyco-conjugués^[120]. Leur utilisation en synthèse est cependant limitée par la nécessité d'un donneur de glycoside activé par un nucléoside. La synthèse chimique de nucléotide est en effet fastidieuse et implique des coûts élevés. De plus, la glycosyl-transférase étant inhibée par le nucléoside libéré, les rendements de synthèse sont limités. Cela constitue un frein important pour la préparation d'oligosaccharides à grandes échelles. Deux stratégies ont été élaborées afin de prévenir l'inhibition enzymatique. Elles impliquent l'ajout d'une phosphatase afin de dégrader le nucléoside diphosphate^[121], ou l'ajout au milieu réactionnel de cocktails enzymatiques permettant sa régénération^[122].

D'autres voies biotechnologiques d'utilisation des transférases ont été développées pour permettre d'améliorer les rendements et seront détaillées dans le chapitre suivant.

III.4. Les glycoside-hydrolases

III.4.1. Généralités

Les glycosides-hydrolases représentent la classe d'enzymes responsables de l'hydrolyse des liaisons glycosidiques des oligo- et polysaccharides. Cette coupure est réalisée par réaction acido-basique selon deux mécanismes différents décrits par Koshland^[123]. Certaines agissent avec rétention de configuration, et d'autres par inversion de configuration.

III.4.2. Glycoside-hydrolases agissant avec rétention de configuration

Une majorité des glycoside-hydrolases agissant avec rétention de configuration est caractérisée par la présence de deux acides aminés au sein du site catalytique agissant pour l'un comme nucléophile (aspartate, glutamate) et pour l'autre comme couple acide/base (acide carboxylique/carboxylate). La coupure de la liaison osidique avec rétention de configuration préserve la configuration anomère de la molécule. Selon Koshland, la réalisation de l'hydrolyse s'exécute en deux étapes, comme représenté en Figure 32. Dans un premier temps, l'attaque nucléophile d'un carboxylate de l'enzyme permet la formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme, et la protonation de la liaison osidique par un acide carboxylique de l'enzyme permet le départ de l'aglycone. Lors de la deuxième étape, le résidu acide/base déprotonne une molécule d'eau qui hydrolyse le glycosyl-enzyme. L'espace entre les deux résidus est d'environ 5Å, afin que le nucléophile de l'enzyme soit suffisamment proche du glycoside pour former une liaison covalente^[124].

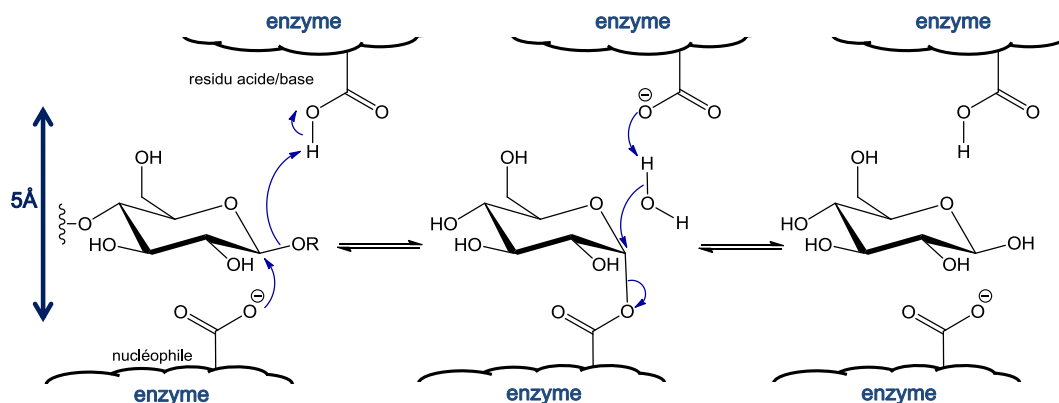


Figure 32 : Mécanisme d'hydrolyse par les glycoside-hydrolases agissant avec rétention de configuration

III.4.3. Glycoside-hydrolases agissant avec inversion de configuration

A l'inverse, les glycoside-hydrolases agissant avec inversion de configuration ont un mécanisme hydrolytique en une seule étape impliquant deux résidus acides carboxyliques catalytiques de l'enzyme (Figure 33). Le site actif de l'enzyme permet l'espacement des deux acides d'une distance d'environ 10Å, ce qui favorise l'entrée d'une molécule d'eau et donc l'unique étape pour la réalisation de l'hydrolyse^[124]. Ces deux acides agissent simultanément comme acide-base dont l'un protone l'oxygène de la liaison glycosidique et l'autre déprotone une molécule d'eau du milieu ayant le rôle de nucléophile. De l'hydrolyse résulte alors une inversion de configuration.

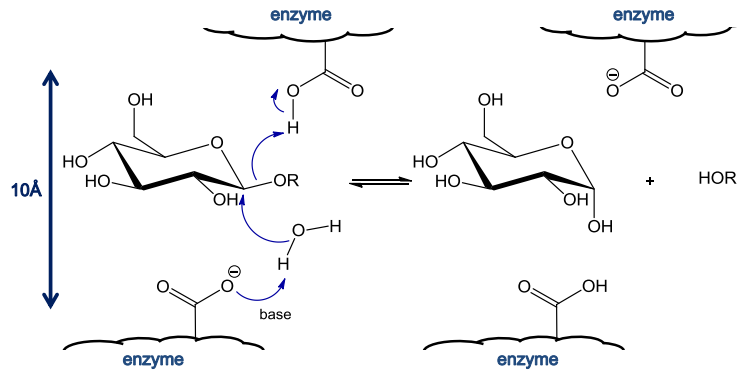


Figure 33 : Mécanisme d'hydrolyse par les glycoside-hydrolases agissant avec inversion de configuration

III.4.4. Les Glycoside-hydrolases comme outils de synthèse

III.4.4.1. Transglycosylation

Les glycoside-hydrolases ont pour fonction principale de réaliser l'hydrolyse d'oligo- et de polysaccharides, cependant dans certaines conditions réactionnelles, elles sont capables de réaliser des glycosylations. Cette activité est réalisable en plaçant dans des conditions cinétiques. Dans la plupart des cas, la transglycosylation est caractéristique pour les enzymes formant un complexe intermédiaire, c'est-à-dire pour les glycoside-hydrolases agissant avec rétention de configuration. De manière générale, il convient d'utiliser un donneur de glycosylation activé portant un bon groupement partant en position anomère, comme un aryl glycoside, un fluorure de glycosyle, ou encore un oligosaccharide. Cela permet la formation rapide du complexe intermédiaire. Deux voies sont alors possibles pour libérer le glycosyl-enzyme :

- l'hydrolyse (irréversible) par une molécule d'eau,
- la transglycosylation (réversible) sur un glycoside accepteur

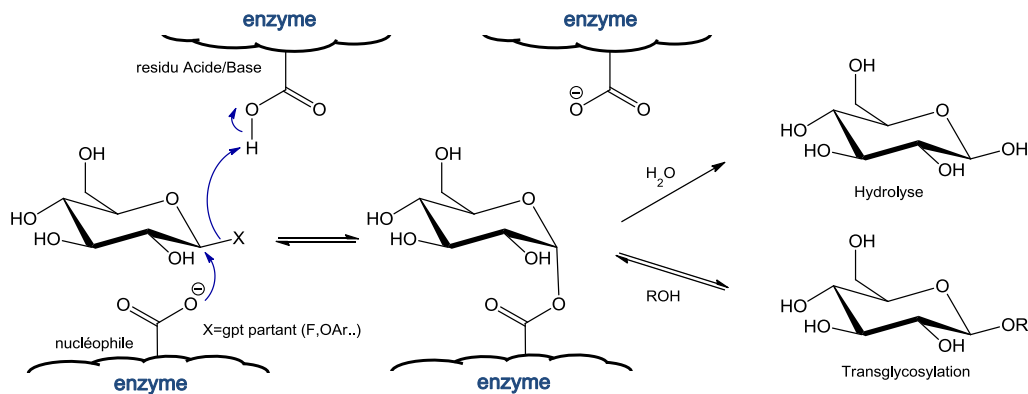


Figure 34 Mécanisme de transglycosylation des glycoside-hydrolases

Des rendements atteignant 100% en transglycosylation peuvent être obtenus par ce type de catalyse qui est utilisée pour la synthèse de glycosides mais aussi de glyco-conjugués^[125] notamment avec des peptides^[126]. Ces rendements sont très dépendants du type d'enzyme, des substrats et des conditions réactionnelles, mais aussi par le fait que les produits formés sont susceptibles d'être hydrolysés à leur tour.

Kobayashi *et al.* ont décrit la synthèse de cellulose synthétique par transglycosylation^[127, 128]. Cette synthèse est réalisée par autocondensation de β -fluorure de cellobiosyle au moyen d'une cellulase dans des conditions réactionnelles hydro-organiques, favorisant l'activité de transglycosylation (Schéma 2) :

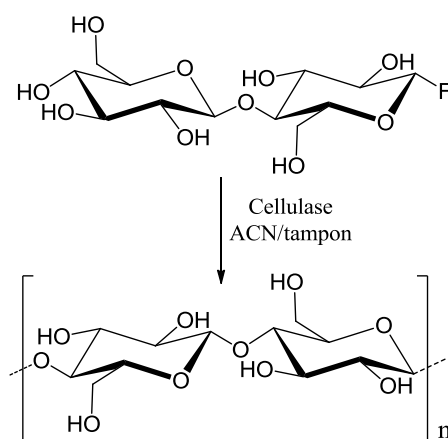


Schéma 2 : Synthèse enzymatique de cellulose, d'après Kobayashi et al.

La réaction catalysée par des cellulases de *T.viride* permet la synthèse de cellulose synthétique avec des rendements en oligosaccharides insolubles de 54% (taille de chaînes jusqu'au DP 22).

III.4.4.2. Glycoside-hydrolases mutées : les glycosynthases

En 1998, McKenzie *et al.* décrivent pour la première fois l'activité de transglycosylation de glycoside-hydrolases mutées (β -glucosidase/galactosidase d'*Agrobacterium sp.*)^[129]. Les glycosynthases sont des glycoside-hydrolases ayant subi une mutation, par laquelle son acide aminé catalytique nucléophile est remplacé par un autre acide aminé non-nucléophile. L'acide aminé glutamate ou aspartate peut ainsi être remplacé par la glycine, la sérine ou l'alanine ^[129-131]. Cette mutation influence radicalement l'activité de l'enzyme, puisque celle-ci est alors incapable de former le complexe intermédiaire glycosyl-enzyme et n'est plus en mesure d'hydrolyser. En revanche, l'enzyme est capable d'accepter un substrat de configuration inversée faisant alors office de mime du complexe glycosyl-enzyme^[132, 133].

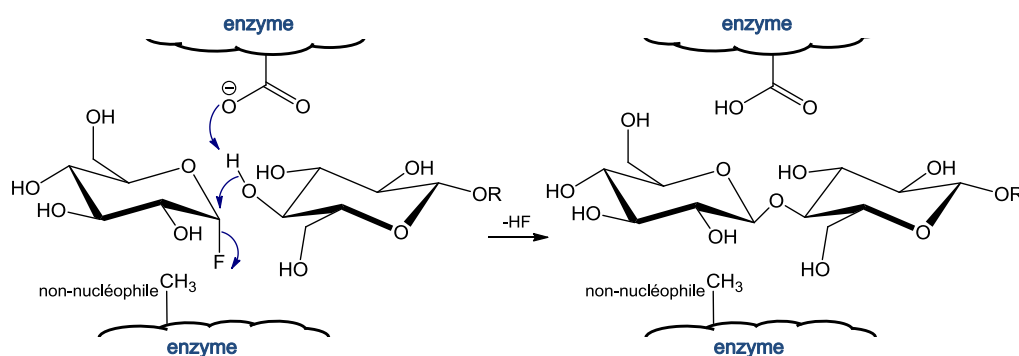


Figure 35 : Mécanisme de glycosylation des glycosynthases

L'utilisation de telles glycosynthases permet donc de s'affranchir de l'hydrolyse du donneur, mais aussi de l'hydrolyse des produits formés. La transglycosylation peut alors atteindre des rendements quantitatifs. Plusieurs glycosynthases ont pu être développées à partir de glucosidases, de cellulases, ou de mannanases et ont permis d'envisager de nouvelles voies de synthèse d'oligosaccharides. Par exemple, Fort *et al.* ont décrit la préparation de cellodextrines de DP 3 à 6 par glycosylation itérative d' α -fluorure de cellobiosyle protégé en position C₄ au moyen de la glycosynthase Cel7B E197A d'*Humicola insolens*^[134]. Par ailleurs, cette même cellulase mutée permet la synthèse de cellulose *in vitro* à partir de α -fluorure de cellobiosyle. En 2001, Nashiru *et al.* ont reporté la synthèse d'oligosaccharides au moyen d'une β -mannosidase dont le nucléophile est muté en sérine. Des rendements globaux de 70% ont ainsi pu être obtenus, à partir d' α -fluorure de mannosyle.

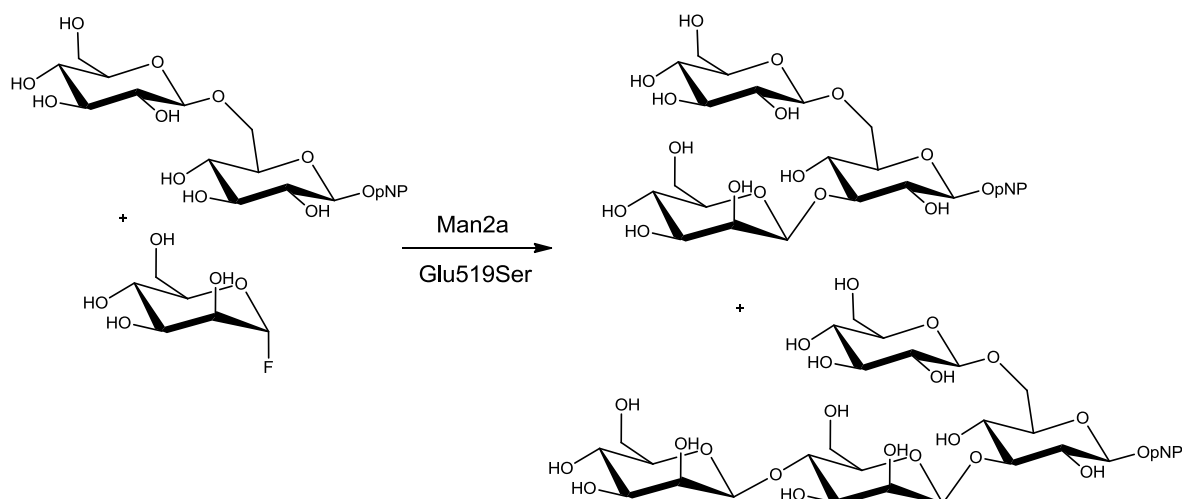


Schéma 3 : Synthèse d'oligosaccharides par la mannosynthase Man2aGlu519Ser

Cette mannosynthase offre également de bons rendements avec d'autres séries d'accepteurs de glycosylation, notamment avec le β -cellobioside où des rendements à 99% d'oligosaccharides sont obtenus^[135], ou encore le le *p*NP- β -gentibioside avec des rendements de 83% (Schéma 3).

Les enzymes constituent des outils très performants pour la synthèse d'oligosaccharides complexes. Les réactions catalysées par les enzymes présentent de nombreux avantages dont le principal, pouvant aussi devenir un inconvénient est leur spécificité. De manière générale, la glycosylation par les enzymes permet de limiter le nombre d'étapes en évitant les protections/déprotections des hydroxyles nécessaires lors de synthèses chimiques. La spécificité et la diversité des enzymes sont des atouts considérables qui apportent des possibilités avantageuses pour la synthèse d'oligosaccharides.

IV. Conclusion

Lors de cette étude bibliographique, l'intérêt des cellodextrines a été mis en avant de par leurs nombreuses propriétés biologiques. La valorisation de la cellulose au travers de sa dépolymérisation pour la synthèse d'oligosaccharides représente un challenge. Différents procédés de production des cellodextrines ont été présentés, et ont permis de mettre en évidence le manque de méthodes existantes pour la production contrôlée d'oligosaccharides. Les liquides ioniques et les enzymes paraissent être des outils intéressants pour le développement de méthodes de valorisation de la cellulose.

Les oligosaccharides sont des biomolécules impliquées à de nombreux niveaux biologiques, cependant leur synthèse est complexe et peut constituer un frein au développement de leurs applications. Dans la dernière partie de cette étude, les capacités des enzymes pour réaliser des réactions de synthèse oligosaccharidique ont été soulignées. L'association de la chimie et des enzymes semble être une alternative idéale pour l'obtention efficace d'oligo- ou de polysaccharides d'intérêt.

Chapitre 2 :

Hydrolyse contrôlée de
cellulose et de cellulose
modifiée pour la production
de cellodextrines

Chapitre 2: Hydrolyse contrôlée de cellulose et de cellulose modifiée pour la production de cellodextrines91

I. Problématique de production des cellodextrines hydrosolubles ..92

I.1. Contexte	92
I.2. Limitations des hydrolyses enzymatiques	93
I.3. Stratégie développée.....	94

II. Dépolymérisation contrôlée de cellulose par procédés "verts" : utilisation alternée de liquides ioniques et d'enzymes95

II.1. Méthodologie générale.....	95
II.2. Préfragmentation de la cellulose en oligosaccharides insolubles dans l'eau 96	
II.2.1. Dissolution de la cellulose.....	97
II.2.2. Caractérisation du substrat de départ	98
II.2.2.1. Détermination du DP par dosage colorimétrique	98
II.2.2.2. Caractérisation par DRX des structures d'Avicel et d'Avicel régénérée.....	100
II.2.2.3. Détermination de l'indice de polymolécularité (I)	101
II.2.3. Préfragmentation par hydrolyse acide en phase homogène.....	102
II.2.4. Préfragmentation par hydrolyse acide en phase hétérogène	103
II.2.5. Comparaison des deux méthodes d'hydrolyse acide	104
II.2.6. Caractérisation des oligosaccharides insolubles	105
II.2.6.1. Indice de polymolécularité.....	106
II.2.6.2. Diffraction des Rayons X.....	108
II.3. Hydrolyse enzymatique d'oligosaccharides insolubles dans l'eau	109
II.3.1. Conversion des oligosaccharides insolubles en cellodextrines hydrosolubles.	111
II.3.2. Influence du temps d'hydrolyse.....	112
II.3.3. Influence de la présence d'espèces inhibitrices	113
II.3.4. Influence de la concentration enzymatique	115
II.3.5. Distribution des cellodextrines formées lors de l'hydrolyse enzymatique.....	116
II.4. Bilan.....	119

<u>III. Hydrolyse enzymatique de cellulose acétate hydrosoluble pour la production contrôlée de cellodextrines</u>	121
III.1. Cellulose acétate : brève introduction	121
III.2. Synthèses de cellulose acétate hydrosoluble	123
III.3. Caractérisation de la cellulose acétate.	124
III.3.1. Rendement et détermination du DS	124
III.3.2. Détermination du DP	127
III.4. Hydrolyse enzymatique de la cellulose acétate hydrosoluble	128
III.4.1. Conversion de la WSCA en cellodextrines hydrosolubles	128
III.4.2. Distribution de tailles des cellodextrines hydrosolubles produites	130
III.4.2.1. Influence de l'enzyme sur la distribution	132
III.4.2.2. Influence du temps d'hydrolyse	134
III.4.2.3. Influence du DS sur la distribution.....	136
<u>IV. Conclusion et perspectives</u>	137

Chapitre 2: Hydrolyse contrôlée de cellulose et de cellulose modifiée pour la production de cellodextrines

De nombreux efforts sont faits pour développer des méthodes de dépolymérisation totale de la cellulose pour la production de glucose ou de composés résultants de sa dégradation comme l'acide levulinique ou le HMF. Peu de procédés existent pour la dépolymérisation contrôlée de la cellulose dans le but d'obtenir des cellodextrines. Celles-ci présentent pourtant des applications et des propriétés biologiques intéressantes.

Dans le cas présent, l'objectif a été de développer un procédé permettant d'obtenir des cellodextrines de DP 3 et 4 pour leur fonctionnalisation. Ces tailles de cellodextrines sont intéressantes car elles possèdent de potentielles applications en tant que squelette saccharidique pour la synthèse de biomolécules d'intérêt. Dans ce chapitre, nous présenterons deux méthodes que nous avons développées pour produire des cellodextrines. La première méthode consiste en une approche chimique puis enzymatique de dépolymérisation de la cellulose par hydrolyse successive en milieu "vert". La seconde permet la production contrôlée de cellodextrines par biocatalyse à partir de cellulose modifiée. Pour la réalisation de l'étude, nous avons choisi d'utiliser la cellulose microcristalline Avicel PH-101 qui est largement employée comme substrat cellulosique modèle dans la littérature.

I. Problématique de production des cellodextrines hydrosolubles

I.1. Contexte

La quasi-totalité des méthodes d'hydrolyse de la cellulose existantes permettent une dépolymérisation totale en monomères de glucose. Les techniques d'hydrolyse les plus courantes, employant des procédés chimiques, physico-chimiques ou enzymatiques ont été décrites précédemment. La dégradation de la cellulose représente un réel challenge en raison de ses propriétés structurales et physico-chimiques telles que sa haute cristallinité, et son insolubilité dans la plupart des solvants. L'obtention de cellodextrines passe généralement par le recours à ces méthodes d'hydrolyse chimique en contrôlant toutefois les temps de réaction afin d'éviter la dépolymérisation totale des chaînes de cellulose. Un autre procédé intéressant est celui de l'acétylolyse de cellulose décrit par Dickey et Wolfrom^[66] ainsi que plus tard par Miller^[60]. Cette technique permet de produire des cellodextrines acétylées qui sont ensuite facilement déprotégées. Cependant, en plus des conditions réactionnelles drastiques appliquées, un des inconvénients majeurs réside dans le fait que les tailles des cellodextrines formées ne sont pas contrôlées. Elles présentent ainsi des DP compris entre 1 et 9. Les rendements associés sont distribués entre les espèces formées, et largement dépendants du temps d'hydrolyse.

Nous avons testé quelques-unes de ces méthodes d'hydrolyse en milieu acide concentré décrites pour l'obtention de cellodextrines. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature et sont regroupés dans le Tableau 2:

Méthode	Réactifs	Conditions	Rendement		Rendement DP 3-4		Réf.
			exp.	litt.	exp.	litt.	
Acétylyse	AcOH/ Ac ₂ O/ H ₂ SO ₄	2h30 50°C	77%* DP 1-9	24%* DP 3-7	14%*	14%*	Miller ^[60]
Acide Phosphorique	H ₃ PO ₄ (85%)	20h 55°C	41% DP 1-9	54% DP 2-12	17%	non précisé	Liebert ^[61]
Mélange d'acides	HCl/H ₂ SO ₄ 80/20(v/v)	4h 25°C	38% DP 1-9	25% DP 3-6	6%	12%	Zhang ^[64]

(*: cellodextrines acétylées ; exp. : résultat expérimental ; litt. : résultat reporté dans la littérature)

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats d'hydrolyses acides de la cellulose pour l'obtention de cellodextrines

La sélectivité de la réaction vers la production de certaines tailles de cellodextrines, comme les DP 3 et 4, est de fait irréalisable puisqu'un mélange de cellodextrines solubles est inévitablement formé. Les temps d'hydrolyse prolongés conduisent à la formation d'acide levulinique et d'HMF, et les temps trop courts mènent à de faibles rendements en cellodextrines solubles. La distribution de chaque espèce au sein du mélange d'oligosaccharides est variable selon les méthodes et les conditions réactionnelles employées. Il en résulte que pour un même procédé, les rendements sont difficilement reproductibles. Bien que ces méthodes soient radicales et permettent la production de cellodextrines, elles présentent de nombreux inconvénients. Les deux principaux sont l'utilisation de conditions réactionnelles très corrosives et la formation de mélanges complexes de cellodextrines entraînant une étape de purification fastidieuse.

I.2. Limitations des hydrolyses enzymatiques

Pour être efficace, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose implique l'utilisation de cocktails de cellulases (endoglucanase, cellobiohydrolase, glucosidase) agissant en synergie. L'emploi de ces cocktails enzymatiques mènent ainsi à l'hydrolyse totale de la cellulose, c'est-à-dire jusqu'au glucose. L'endoglucanase favorise l'hydrolyse massive de la cellulose en agissant à l'intérieur des chaînes amorphes pour libérer des blocs de cellodextrines. Ceux-ci sont alors hydrolysés par les glucosidases et cellobiohydrolases. L'utilisation d'une endoglucanase seule semble donc *a priori* être un bon moyen pour

produire des cellodextrines. Les tailles de ces oligosaccharides sont très dépendantes de la nature de l'endoglucanase (EG). Ainsi les EG III et IV de *T.viride* sont actives sur le celotriose et les oligosaccharides supérieurs, et EG I, II et V d'*H.insolens* sur des oligosaccharides ayant des DP supérieurs^[27]. Comme décrit plus haut, les endoglucanases hydrolysent la cellulose amorphe et les cellodextrines mais sont en revanche très peu actives voire inactives sur la cellulose cristalline^[27]. Les liquides ioniques constituent un moyen efficace pour rendre la cellulose amorphe. Cependant, à notre connaissance peu de références dans la littérature rapportent l'hydrolyse enzymatique de cellulose en liquide ionique. Ceci résulte certainement de la faible compatibilité de la plupart des cellulases, notamment *T.reesei*, avec l'utilisation simultanée de liquides ioniques en raison de leurs propriétés physico-chimiques^[136].

Lors d'essais préliminaires, nous avons observé que les endoglucanases ne conduisent pas à la formation de cellodextrines ni à partir d'Avicel, ni à partir de cellulose régénérée après prétraitement en liquide ionique. Les enzymes ne semblent pas en mesure d'exprimer leurs capacités hydrolytiques sur ces substrats. En revanche, d'autres essais ont montré que les endoglucanases modèles utilisées sont capables d'hydrolyser des cellodextrines solubles en cellodextrines de plus petites tailles de manière rapide et quantitative.

I.3. Stratégie développée

Nous avons pris le parti de privilégier des méthodes d'hydrolyses douces. Dans ce contexte, notre stratégie s'est orientée vers l'utilisation des liquides ioniques pour leurs propriétés de dissolution de la cellulose ainsi que vers la biocatalyse pour son efficacité.

Selon la littérature et nos observations préliminaires, les propriétés de cristallinité, de solubilité et de taille des chaînes de cellulose semblent constituer les principaux verrous pour parvenir à une hydrolyse efficace par des endoglucanases. Dans une première approche, une dépolymérisation partielle des chaînes de cellulose a été envisagée afin de parvenir à des tailles d'oligosaccharides réduites dans le but de favoriser l'accès des enzymes au substrat. Dans une seconde approche, des dérivés de cellulose solubles ont été utilisés dans le même souci de faciliter l'accès des liaisons osidiques aux enzymes.

II. Dépolymérisation contrôlée de cellulose par procédés "verts" : utilisation alternée de liquides ioniques et d'enzymes

II.1. Méthodologie générale

Notre stratégie de synthèse se déroule en deux étapes. Lors de la première étape, la cellulose subit une préfragmentation par catalyse acide en liquide ionique pour produire des oligosaccharides de tailles réduites. L'étape suivante consiste en l'hydrolyse enzymatique sélective des oligosaccharides formés pour la production de cellodextrines de tailles ciblées.

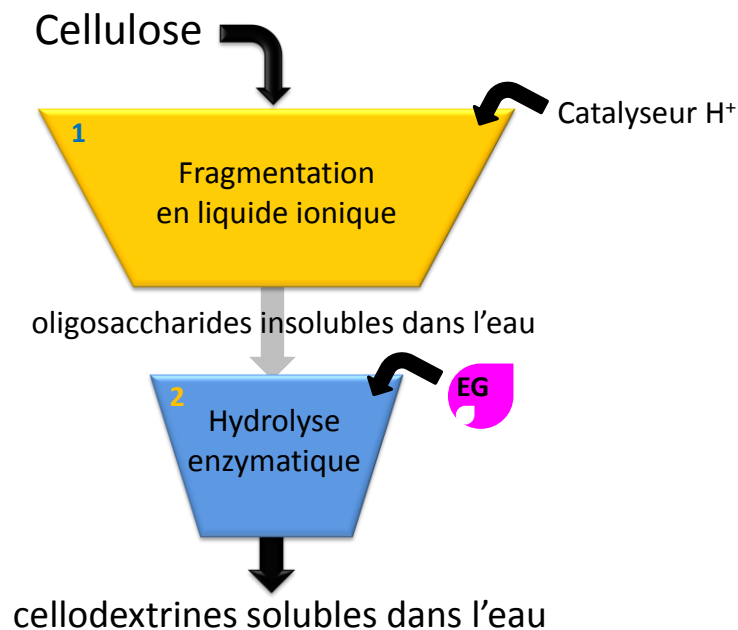


Figure 36 : Stratégie d'obtention de cellodextrines hydrosolubles à partir de cellulose

II.2. Préfragmentation de la cellulose en oligosaccharides insolubles dans l'eau

Les liquides ioniques ont la capacité de dissoudre les polysaccharides, en particulier la cellulose, et constituent un milieu réactionnel "non-dérivatisant". En raison de leur non-volatilité, les liquides ioniques sont qualifiés de solvants verts, ou solvants alternatifs en contraste avec les autres solvants organiques. En particulier, Swatloski *et al.* ont décrit le BMIm-Cl comme un excellent solvant de la cellulose^[99].

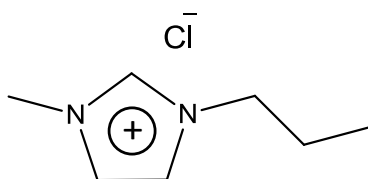


Figure 37 : Structure du BMIm-Cl

De nombreuses références dans la littérature tirent profit des propriétés du liquide ionique BMIm-Cl pour réaliser l'hydrolyse acide de la cellulose^[137, 108, 110, 102, 138]. De plus BMIm-Cl est commercial, peu onéreux et facilement synthétisable par réaction de métathèse^[139]. Ceci a motivé notre choix pour employer ce liquide ionique au cours de cette étude.

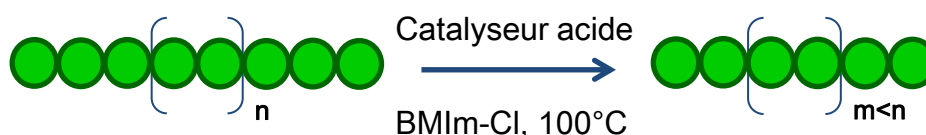


Figure 38 : Réaction d'hydrolyse acide de la cellulose en liquide ionique

La préfragmentation de la cellulose représentée en Figure 38 est réalisée en deux temps :

Dans un premier temps, la cellulose est dissoute à 5 % en poids dans le liquide ionique à 100°C, car le point de fusion de BMIm-Cl est de 70°C. La dissolution en liquide ionique n'a pas d'action hydrolytique sur la cellulose, comme précisé précédemment.

Dans un deuxième temps un catalyseur acide est ajouté afin de réaliser l'hydrolyse. La nature du catalyseur varie selon qu'il soit homogène ou hétérogène. Dans

notre cas, nous avons réalisé en parallèle une hydrolyse en phase homogène et une autre en phase hétérogène. L'hydrolyse en phase homogène a été effectuée à l'aide d'un acide organique, l'acide camphorsulfonique (CSA) qui constitue un acide anhydre fort couramment utilisé en synthèse. Pour l'hydrolyse en phase hétérogène, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Rinaldi *et al.* qui utilisent une résine acide sulfonique Amberlyst 15DRY (AB15) afin de réaliser l'hydrolyse de la cellulose en liquide ionique^[109].

Le chemin réactionnel est récapitulé sur le schéma en Figure 39 :

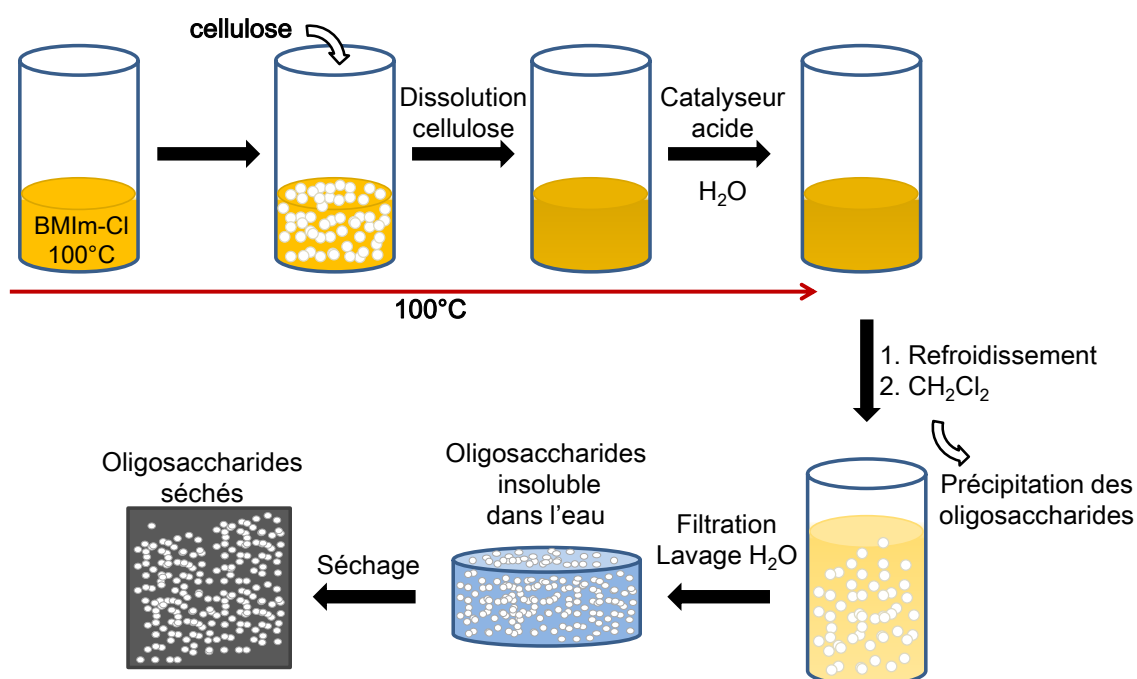


Figure 39 : Schéma réactionnel d'hydrolyse acide de la cellulose en liquide ionique

II.2.1. Dissolution de la cellulose

En s'inspirant des conditions de dissolution reportées dans la littérature^[137, 99], et avec l'appui d'essais préliminaires, une concentration massique en cellulose de 5% par rapport au liquide ionique a été adoptée pour la dissolution, à une température réactionnelle de 100°C. Il est à noter qu'une augmentation de la concentration en cellulose entraîne des temps de dissolution plus longs ainsi qu'une augmentation de la viscosité du mélange résultant. La température influe également sur ces deux paramètres. La cellulose est donc dispersée par portion dans le liquide ionique à 100°C

sous agitation pendant 16 heures jusqu'à dissolution complète du polysaccharide. Le mélange résultant est transparent et visqueux mais sa viscosité permet toutefois une agitation homogène. Dans une réaction de catalyse acide, les molécules d'eau jouent un rôle primordial. Ainsi, l'Avicel est séchée à l'étuve pendant 24h avant utilisation. BMIm-Cl étant hygroscopique, celui-ci est utilisé dans les trois jours suivant l'ouverture du flacon et conservé sous atmosphère inerte afin d'assurer une bonne reproductibilité des expériences.

II.2.2. Caractérisation du substrat de départ

Le degré de polymérisation (DP) des chaînes de cellulose peut être déterminé au moyen de différentes techniques comme le dosage chimique, la GPC ou la RMN. Dans cette étude, l'évaluation des DP repose principalement sur un dosage colorimétrique des sucres réducteurs.

II.2.2.1. Détermination du DP par dosage colorimétrique

La taille d'un polysaccharide peut être facilement déterminée grâce à des dosages chimiques. Le DP correspond au nombre de motifs de répétition d'un polysaccharide. Il est évalué selon l'Équation 1 :

$$DP = \frac{\text{Nombre de sucres totaux}}{\text{Nombre d'extrémités réductrices}}$$

Équation 1 : Calcul du DP d'un polysaccharide

Le nombre de sucres totaux composant le polysaccharide peut être évalué par un dosage de Dubois à l'acide sulfurique. Lors du dosage, l'échantillon est totalement hydrolysé par les réactifs, et la concentration finale en monomère est déterminée par dosage colorimétrique par rapport à une gamme étalon de monomère^[140]. Le nombre d'extrémités réductrices peut ensuite être évalué par différentes techniques de dosage colorimétrique comme les dosages colorimétriques au ferricyanure, à l'acide dinitrosalicylique (DNS) et à l'acide 2,2'-bicinchoninique (BCA). Ces méthodes se différencient par leur sensibilité et leur zone de travail de concentration en sucre^[141, 142].

Pour ces travaux, nous avons choisi d'utiliser le dosage au BCA en raison de sa zone de travail de concentrations en glucose d'ordre nanomolaire (2-12 nmol) et de sa sensibilité^[143]. De plus, cette méthode de dosage est décrite comme peu sensible à la taille des oligosaccharides à doser.

La cellulose est un homopolymère, composé uniquement d'unités glucosidiques. Cela permet de s'affranchir du dosage de Dubois pour la détermination des sucres totaux en utilisant le nombre de moles d'unités AGU contenus dans le poids du polysaccharide à doser, séché et pur. En déterminant le nombre d'extrémités réductrices (ext. réd.) de l'échantillon par dosage colorimétrique au BCA, il est donc possible de calculer son DP suivant l'Équation 2 :

$$DP = \frac{n(\text{AGU})}{n(\text{ext. réd.})} = \frac{m(\text{échantillon})/Mw(\text{AGU})}{n(\text{dosage BCA})}$$

Équation 2: Détermination du DP d'un oligosaccharide de cellulose

Par cette méthode, le DP moyen de l'Avicel a été évalué à 180 ± 5 . Cette valeur moyenne est en accord avec les valeurs de la littérature qui sont comprises entre 120 et 250 ^[61, 144]. Le dosage des extrémités réductrices de la cellulose régénérée nous a permis de déterminer son DP à 177 ± 5 , ce qui représente une déviation de moins de 2% par rapport au DP de départ de l'Avicel. Il est à noter que suivant les méthodes de dosage, les résultats obtenus peuvent varier pour un même oligosaccharide. Ainsi dans cette étude, tous les dosages ont été réalisés par la méthode au BCA par soucis de reproductibilité et d'homogénéité.

Des essais de dosage des extrémités réductrices d'oligosaccharides en liquide ionique ont été réalisés, mais n'ont pas apporté de résultats concluants. En effet le liquide ionique interagit avec les réactifs de dosage, rendant alors celui-ci inexploitable.

II.2.2.2. Caractérisation par DRX des structures d'Avicel et d'Avicel régénérée

Lors de la dissolution, la cellulose passe d'une structure cristalline à une structure amorphe. La cellulose dissoute en liquide ionique puis reprécipitée subit donc un changement de structure par rapport à la structure cristalline de départ de l'Avicel. La comparaison des diffractogrammes obtenus par diffraction des rayons X (DRX) de la cellulose régénérée et de l'Avicel représentés en Figure 40 permet de mettre en évidence cette modification structurale.

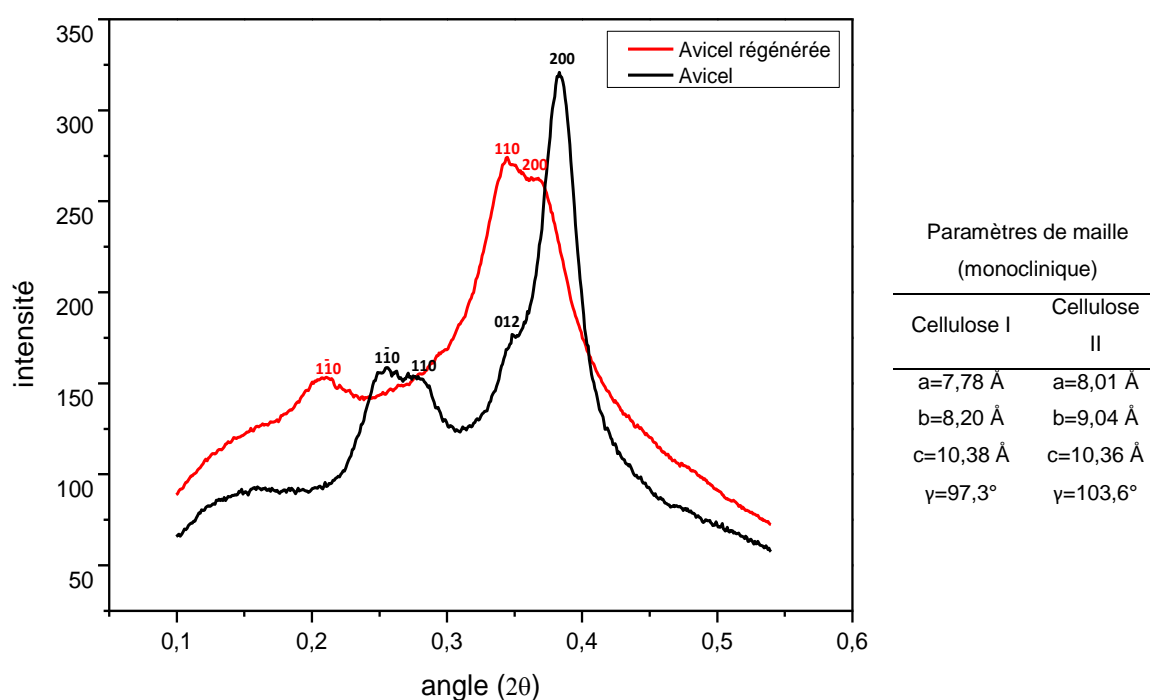


Figure 40 : Diffractogramme DRX de l'Avicel et de l'Avicel régénérée

Avicel et Avicel régénérée présentent deux profils différents en DRX. Avicel (en noir) montre une structure cristalline de type cellulose I, qui se caractérise ici par la présence des pics correspondant aux plans (200), (012) à environ $2\theta = 0,4$ ainsi qu'aux plans (110) et ($1\bar{1}0$) à environ $2\theta = 0,25$ ^[5]. Pour la cellulose régénérée (en rouge), on retrouve un profil de cellulose de type II, caractérisé par la présence des pics de diffraction à environ $2\theta = 0,35$ pour les plans (200) et (110) et à $2\theta = 0,2$ pour le plan ($1\bar{1}0$). Cela met en évidence le passage d'une cellulose de type I à type II après un prétraitement en liquide ionique^[145]. Bien que comme décrit précédemment la longueur des chaînes reste invariable lors de cette étape de prétraitement, la cellulose subit un changement structural.

II.2.2.3. Détermination de l'indice de polymolécularité (I)

L'indice de polymolécularité d'un polymère représente la distribution des masses molaires des différentes molécules au sein du polymère. Un indice de polymolécularité proche de 1 traduit une population monodisperse, c'est-à-dire composée d'une seule population de molécules. Ainsi l'indice de polymolécularité I est calculé suivant l'Équation 3 :

$$I = \frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}}$$

Équation 3 : Indice de polymolécularité

Où $\overline{M_w}$ représente la moyenne des masses molaires pondérée par la masse de chaînes de chaque longueur

et $\overline{M_n}$ représente la moyenne des masses molaires pondérée par le nombre de chaînes de chaque longueur.

L'indice de polymolécularité des oligosaccharides a été évalué par chromatographie de perméation de gel (GPC) en phase DMF (DMF + 0,01M LiCl). Pour cela, les échantillons ont été dérivatisés par nitration^[146] afin de les rendre solubles dans le DMF.

Par manque de standards commerciaux de nitrocellulose, le système a été calibré avec une gamme de standards de polystyrène (PS) de 3000 à 190 000g.mol⁻¹. L'étalonnage étant réalisé avec un polymère différent de nos échantillons, la mesure permet uniquement la comparaison de manière relative des indices de polymolécularité des échantillons. Celle-ci est obtenue par le calcul du rapport décrit en Équation 3, en considérant le facteur de dérivatisation du détecteur par rapport au standard identique pour le calcul de Mw et de Mn.

L'indice de polymolécularité de l'Avicel a donc été déterminé comme égal à 2,25 ($\overline{M_w} = 139006\text{g.mol}^{-1}$; $\overline{M_n} = 61719\text{g.mol}^{-1}$), ce qui est cohérent avec la littérature ($I = 2,34$)^[144]. L'Avicel commerciale possède une forte polydispersité.

II.2.3. Préfragmentation par hydrolyse acide en phase homogène

Une fois la cellulose dispersée et dissoute dans le liquide ionique à 100°C, l'ajout d'un catalyseur permet la dépolymérisation du polysaccharide. L'acide camphorsulfonique (CSA) a été utilisé comme catalyseur acide. Cet acide organique est un acide fort dont le pKa vaut 1,2. Il est en outre soluble dans le liquide ionique, ce qui permet la réalisation d'une catalyse acide en phase homogène.

L'acide est ajouté au mélange réactionnel en quantité catalytique à 20 % molaire par rapport au glucose contenu dans la cellulose, puis une quantité d'eau correspondante à la quantité d'acide est ajoutée au mélange. Les hydrolyses sont menées à différents temps, permettant une hydrolyse partielle de la cellulose. Des oligosaccharides de tailles dépendantes du temps d'hydrolyse sont ainsi formés, et isolés par précipitation du mélange réactionnel dans le dichlorométhane. Une fois précipités et filtrés, les oligosaccharides insolubles sont lavés à l'eau afin de s'affranchir du liquide ionique résiduel, des oligosaccharides de bas poids moléculaire et des éventuels produits de dégradation du glucose. Les oligosaccharides sont ensuite séchés et les rendements sont calculés selon l'Équation 4 :

$$\eta = \frac{m(\text{oligosaccharides insolubles})}{m(\text{Avicel})}$$

Équation 4 : Calcul du rendement en oligosaccharides de cellulose insolubles

Le DP des oligosaccharides est évalué par dosage des extrémités réductrices par la méthode colorimétrique au BCA, en suivant l'Équation 2. Les résultats des hydrolyses menées sont consignés dans le Tableau 3 :

Entrée	Temps d'hydrolyse (minutes)	Rendement en oligosaccharides insolubles dans l'eau (%)	DP moyen
1	0	/	177 ± 5
2	15	97	94 ± 7
3	30	75	63 ± 4
4	35	82	47 ± 1
5	42	48	30 ± 3
6	48	30	23 ± 1

Tableau 3 : Obtention d'oligosaccharides insolubles dans l'eau par hydrolyse au CSA

La catalyse au CSA permet d'obtenir des rendements en oligosaccharides insolubles dans l'eau compris entre 30 et 97% suivant la taille des oligosaccharides. L'augmentation du temps d'hydrolyse implique une diminution des rendements en oligosaccharides insolubles dans l'eau au profit des cellodextrines hydrosolubles. De plus, dans les conditions de température d'hydrolyse appliquées, la cellulose tend à devenir plus sujette à la formation de produits de dégradation solubles dans l'eau (acide levulinique, HMF). Les cellodextrines solubles produites sont cependant difficilement isolables par réprécipitation et se trouvent ainsi en mélange avec d'éventuels produits de dégradation formés. Notre stratégie consiste à produire des oligosaccharides insolubles dans l'eau lors de cette première étape. Ainsi, les quantités négligeables de mélanges de cellodextrines hydrosolubles produites n'ont pas été purifiées, et seuls les oligosaccharides insolubles dans l'eau ont été isolés.

II.2.4. Préfragmentation par hydrolyse acide en phase hétérogène

Selon le même procédé que pour la catalyse au CSA, le catalyseur acide solide est ajouté dans le mélange réactionnel cellulose-liquide ionique à 100°C. Le catalyseur employé est l'Amberlyst-15DRY, qui est une résine échangeuse de cations. La résine est considérée comme un acide fort supporté de type SO₃H ayant une capacité d'échange de proton indiquée de 4,7mécq./mg. La résine est utilisée à la même molarité de proton que pour le CSA, c'est-à-dire à 20 % molaire par rapport au glucose contenu dans la cellulose. Amberlyst-15DRY (AB15) étant une résine sèche, une quantité catalytique de molécules d'eau correspondante à la quantité d'acide a été apportée au mélange pour la réalisation de l'hydrolyse. Les oligosaccharides sont obtenus par

précipitation du mélange réactionnel dans le dichlorométhane à différents temps, puis traités de manière semblable à celle décrite précédemment excepté qu'après la phase de précipitation des oligosaccharides, les billes de résine sont extraites du milieu. Le Tableau 3 rassemble les résultats obtenus pour ces hydrolyses :

Entrée	Temps (minutes)	Rendement en oligosaccharides insolubles dans l'eau (%)	DP moyen
1	0	/	177 ± 5
2	45	88	147 ± 15
3	60	83	108 ± 5
4	75	92	110 ± 9
5	90	80	89 ± 5
6	105	73	79 ± 10
7	150	95	63 ± 7
8	300	80	38 ± 10

Tableau 4 : Obtention d'oligosaccharides insolubles dans l'eau par l'hydrolyse à l'AB15

L'hydrolyse par catalyse hétérogène avec AB15 a permis de produire des oligosaccharides insolubles très efficacement. Les rendements en oligosaccharides insolubles sont compris entre 73 et 95% pour des DP variant entre 38 et 147 en fonction du temps d'hydrolyse.

II.2.5. Comparaison des deux méthodes d'hydrolyse acide

La préfragmentation de la cellulose par hydrolyse acide en liquide ionique en phase homogène ou hétérogène permet la formation d'oligosaccharides insolubles. Le liquide ionique favorise une bonne dissolution de la cellulose, qui devient alors plus facilement hydrolysable.

Indépendamment du type de catalyseur et à des pourcentages d'eau apportée identiques, le DP moyen des oligosaccharides formés est fonction du temps d'hydrolyse. Il est à noter que les hydrolyses menées avec chacun des catalyseurs présentent des cinétiques de réaction différentes. La catalyse homogène permet une hydrolyse plus rapide de la cellulose. En effet, une diminution de 75% du DP de départ intervient en moins de 40 minutes d'hydrolyse. *A contrario*, lors de l'emploi de l'acide supporté, la

cinétique est plus lente. En comparaison, pour une diminution du DP de départ du même ordre de grandeur (75%), le temps d'hydrolyse nécessaire atteint 300 minutes.

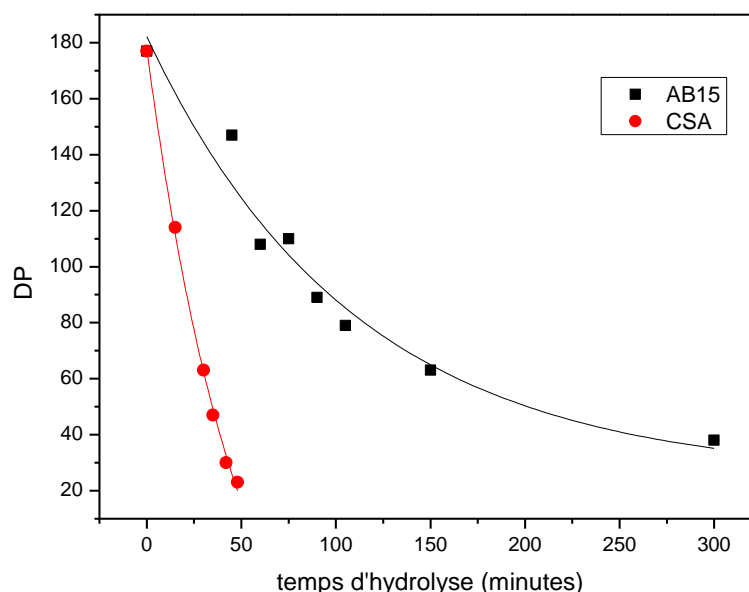


Figure 41 : Evolution du DP des oligosaccharides en fonction du catalyseur et du temps d'hydrolyse

Bien que plus lente, la catalyse sur résine acide permet de produire des oligosaccharides avec de bons rendements, même pour les temps d'hydrolyse plus longs. La cinétique de réaction est ainsi plus facile à maîtriser et peut notamment autoriser le contrôle de la taille des oligosaccharides. De plus, dans ce cas l'utilisation d'une résine peut permettre de limiter l'influence de l'humidité sur l'hydrolyse, en comparaison avec le CSA qui est hygroscopique. Le fait de cibler les oligosaccharides insolubles permet en outre d'obtenir des produits de bonne pureté puisque les éventuels produits de dégradation de la cellulose sont éliminés efficacement lors du lavage à l'eau des oligosaccharides.

II.2.6. Caractérisation des oligosaccharides insolubles

Dans le but de compléter la caractérisation des oligosaccharides insolubles formés, des analyses physico-chimiques ont été réalisées sur une sélection de cellodextrines de plusieurs tailles. L'objectif étant de produire des oligosaccharides insolubles de petites tailles pour réaliser leur hydrolyse par biocatalyse, les oligosaccharides sélectionnés possèdent des DP moyens de 47, 30 et 23. Ils ont été produits par le procédé d'hydrolyse acide en phase homogène. Par souci de clarté, ces

oligosaccharides seront décrits par la suite comme DP 47, DP 30, et DP 23 respectivement.

Lors des hydrolyses acides réalisées, les tailles des oligosaccharides formés ont principalement été maîtrisées en modifiant le temps d'hydrolyse. L'Avicel de départ possédant un indice de polymolécularité déterminé de 2,25 il est légitime de s'attendre à obtenir plusieurs tailles d'oligosaccharides au sein d'un même échantillon après hydrolyse.

II.2.6.1. Indice de polymolécularité

Dans le but d'évaluer leur indice de polymolécularité par GPC, les oligosaccharides DP 47, DP 30 et DP 23 ainsi qu'un standard de cellopentaose (DP 5) ont été modifiés par nitration^[146] afin de les rendre solubles dans le DMF, comme détaillé précédemment.

Le chromatogramme GPC représenté en Figure 42 met en évidence que la population des oligosaccharides de chacun des échantillons est clairement moins polydispersée que celle de l'Avicel : les indices de polymolécularité varient entre 1,13 et 1,23.

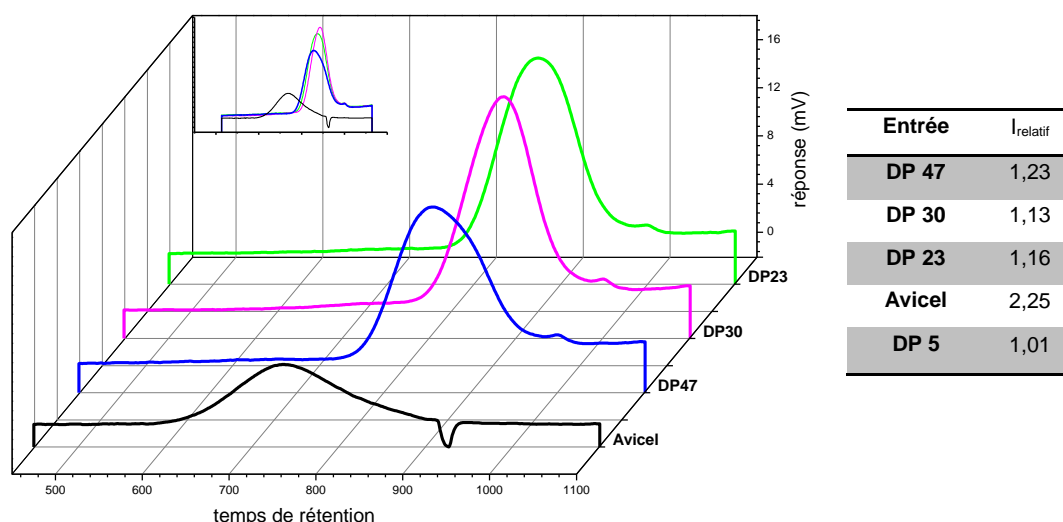


Figure 42 : Chromatogramme GPC en phase DMF des oligosaccharides dérivés

En GPC, les molécules de tailles plus importantes sont moins retenues sur la colonne et sont éluées en premier. Les temps de rétention observés apportent donc une

indication sur la taille des oligosaccharides. Ainsi, les échantillons DP 47, DP 30 et DP 23 sont bien élués après l'Avicel.

La diminution de l'indice de polymolécularité des échantillons par rapport à celui de l'Avicel est assez inattendue. Celle-ci pourrait provenir de l'étape de re-précipitation des oligosaccharides dans le dichlorométhane, qui favoriserait la formation d'une population de cristaux relativement homogène. Cela pourrait ainsi conduire à une population moléculaire qui tendrait à être moins polydisperse que l'Avicel de départ. Comme décrit par Watson *et al.*^[147], la structure de la cellulose régénérée est très dépendante de la manière dont elle a été reprécipitée, ainsi que de la nature du non-solvant employé. Les propriétés de dissolution du liquide ionique autorisent une bonne dispersion et une solubilisation homogène de la cellulose dans le milieu réactionnel. Cette homogénéité pourrait permettre de réaliser une hydrolyse efficace, et de tendre vers la formation d'une population centrée sur une gamme étroite de DP d'oligosaccharides.

II.2.6.2. Diffraction des Rayons X

La structure des oligosaccharides, leur cristallinité ainsi que la taille des cristaux peuvent être évaluées par diffraction des rayons X. La caractérisation par DRX des oligosaccharides a permis d'observer leur caractère cristallin de type cellulose II, comme attendu.

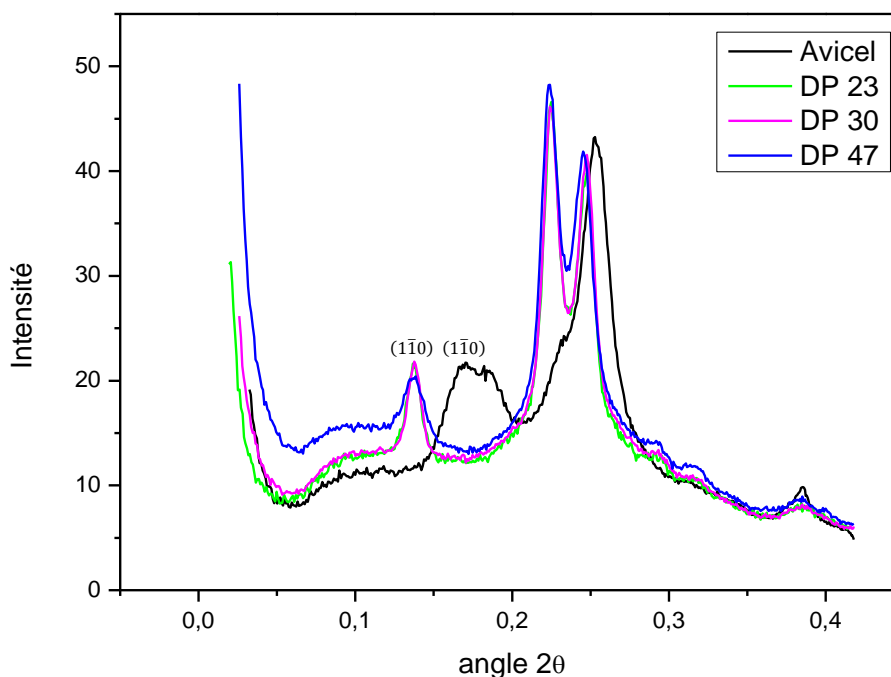


Figure 43 : Diffractogramme DRX des oligosaccharides

Le diffractogramme en Figure 43 montre une différence de largeur des pics du plan $(1\bar{1}0)$ pour chacun des échantillons. La résolution des pics de diffraction donne une indication sur la taille et la qualité des cristaux des oligosaccharides. Ainsi plus l'oligosaccharide est cristallin et forme un monocristal, plus la résolution du pic de diffraction est fine. Sachant que les échantillons DP 47, DP 30 et DP 23 tendent vers une population monodisperse, il est raisonnable de penser que les pics de diffraction DRX reflètent le DP de l'oligosaccharide. En traçant la largeur du pic $(1\bar{1}0)$ à mi-hauteur en fonction du DP, une tendance linéaire est mise en évidence. Sur la zone de DP concernée, il apparaît donc que ceux-ci pourraient être corrélés à la largeur à mi-hauteur du pic de diffraction.

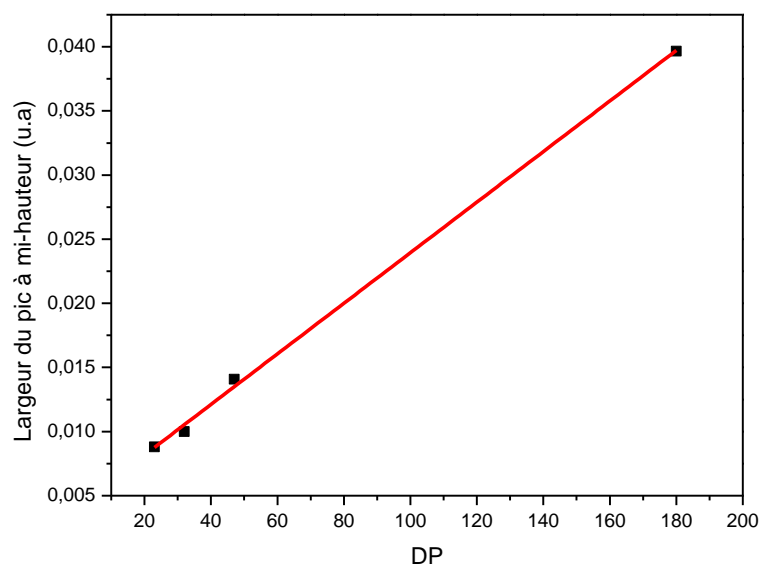


Figure 44 : Largeur à mi-hauteur du pic de diffraction ($1\bar{1}0$) en fonction du DP

L'établissement de cette relation pourrait permettre d'envisager la technique de DRX comme une méthode permettant de déterminer le DP moyen de manière relative, dans le cas d'un échantillon à faible indice de polymolécularité et dans cette gamme de DP. La cristallisation influant sur la résolution du pic, il est à noter que cette relation n'est valable que dans le cas où les échantillons sont cristallisés de la même manière, comme nous l'assumons ici.

II.3. Hydrolyse enzymatique d'oligosaccharides insolubles dans l'eau

La préfragmentation de la cellulose a permis l'obtention d'oligosaccharides de tailles réduites insolubles dans l'eau de type cellulose II. Pour cette seconde étape, la stratégie a été d'utiliser les propriétés hydrolytiques des cellulases afin de produire des cellodextrines de tailles ciblées de DP 3 à 4. Les endoglucanases sont actives sur les substrats amorphes, et les substrats solubles. Le choix de l'enzyme doit reposer sur ses spécificités hydrolytiques, en fonction des tailles de cellodextrines désirées. L'endoglucanase Carezyme 1000® (notée Carezyme) a été sélectionnée pour réaliser l'hydrolyse des oligosaccharides issus de l'étape de préfragmentation.

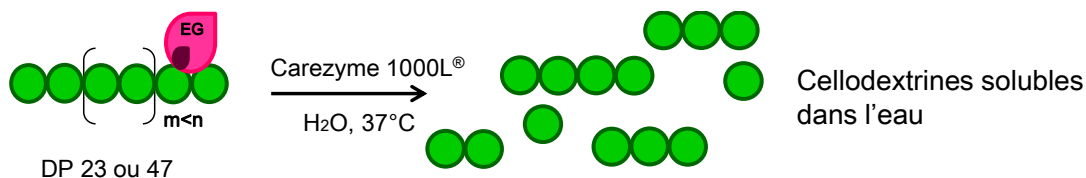


Figure 45 : Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides insolubles dans l'eau

Carezyme est une préparation commerciale contenant une endoglucanase recombinante. Il s'agit de l'EG V d'*Humicola insolens*. Le gel d'électrophorèse de Carezyme est représenté en Figure 46. La présence de plusieurs bandes entre 35kDa et 70kDa sont révélatrices de la présence d'impuretés. Néanmoins, la bande très importante aux environs de 43kDa correspondant à l'endoglucanase atteste qu'elle est largement majoritaire.

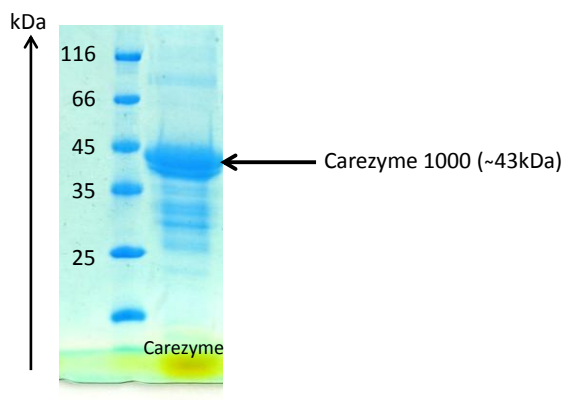


Figure 46 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de Carezyme

Carezyme est largement employée dans les industries du textile et des détergents pour son activité dans l'eau mais aussi pour son efficacité sur la décoloration des tissus et du papier (backstain control) et sur l'abrasion des textiles denim (bio-stoning)^[26]. Selon la littérature cette endoglucanase appartient à la famille d'enzymes EG V, favorisant l'hydrolyse des chaînes de cellulose en cellodextrines de tailles supérieures à DP 3^[148, 27]. Karlsson *et al.* ont décrit EG V comme produisant majoritairement du cellotétraose. De plus, ils ont pu montrer que l'enzyme a une activité hydrolytique quasiment nulle sur les cellodextrines de DP 3, 4 et 5^[149].

Ces caractéristiques devraient permettre de produire efficacement les cellodextrines de DP 3 et 4 ciblés à partir des oligosaccharides de cellulose de tailles réduites. Des tests préliminaires avec Carezyme ont confirmé cette tendance puisque l'hydrolyse d'un mélange de cellodextrines solubles de DP 2 à 10 a permis la production

de cellodextrines de DP 2 à 5. En revanche, l'enzyme s'est avérée inactive sur l'Avicel ainsi que sur l'Avicel régénérée en liquide ionique. Ce résultat conforte notre hypothèse de départ sur la nécessité de réduire la taille des chaînes de cellulose.

II.3.1. Conversion des oligosaccharides insolubles en cellodextrines hydrosolubles

Les hydrolyses enzymatiques des oligosaccharides de tailles réduites obtenus lors de l'étape de préfragmentation ont été réalisées au moyen de Carezyme. Les hydrolyses ont été conduites à plusieurs temps d'hydrolyse sur des échantillons de tailles différentes. Les oligosaccharides de DP 23 et DP 47 ont été sélectionnés afin d'avoir deux tailles de substrat représentatives. Les cellulases étant actives dans l'eau, les hydrolyses ont été réalisées dans l'eau distillée à 37°C afin d'éviter la présence de sels provenant de milieux tamponnés. Dans une hydrolyse type, la concentration du substrat dans l'eau utilisée a été déterminée à 10 % en poids par rapport au volume d'eau et la concentration en enzyme à 1 μ L/mg de substrat (soit 1,2U/mg de substrat). Afin de suivre l'évolution des produits formés, les hydrolyses ont été suivies par CCM (chromatographie sur couche mince), puis stoppées à différents temps par dénaturation thermique de l'enzyme. Le mélange réactionnel a ensuite été soumis à une purification sur charbon afin d'éliminer l'enzyme, puis les espèces ont été séparées par chromatographie d'exclusion stérique ou chromatographie sur gel d'amino-silice.

Ces hydrolyses ne sont pas totales. En effet, une partie de l'échantillon insoluble dans l'eau a toujours été recouvrée après hydrolyse, quelque soit le temps de réaction. Par souci de précision le taux de conversion de l'hydrolyse enzymatique a été calculé à partir de la fraction d'oligosaccharides insolubles récupérée, par rapport à la quantité initiale de substrat. En effet, le glucose et une partie du cellobiose ne s'adsorbent pas sur le charbon lors de la première étape de purification. Le calcul du rendement effectué à partir de la fraction insoluble résultante permet donc d'obtenir des résultats plus justes.

Ainsi, le rendement est calculé après séchage à poids constant de la fraction insoluble dans l'eau en suivant l'Équation 5:

$$\eta (\text{cellodextrines hydrosolubles}) = \left(1 - \frac{m(\text{oligosaccharides insolubles restante})}{m(\text{oligosaccharides insolubles initiale})} \right) \times 100$$

Équation 5 : Taux de conversion en oligosaccharides hydrosolubles par hydrolyse enzymatique

II.3.2. Influence du temps d'hydrolyse

Des hydrolyses à concentrations en substrat à 10mg/mL et en enzyme à 1µL/mg substrat (soit 1,2U/mg substrat) constantes ont été conduites pour différents temps d'hydrolyse. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 5 :

Entrée	Substrat	Temps d'hydrolyse (min)	Taux de conversion
1	DP 23	120	34%
2		180	44%
3		210	54%
4		480	58%
5		240*	70%
6		300**	74%
7	DP 47	120	36%
8		210	43%
9		300	56%
10		300**	64%

*concentration en enzyme x4 ; **enzyme x2 injectée en 5 fois

Tableau 5 : Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides insolubles pour la production de cellodextrines hydrosolubles

Ces valeurs traduisent l'efficacité de l'utilisation d'endoglucanase pour la production de cellodextrines. Des rendements de 74% en cellodextrines hydrosolubles ont été obtenus en 300 minutes en partant d'oligosaccharides de DP 23. Les hydrolyses réalisées avec ajout de l'enzyme en plusieurs fois au cours de l'hydrolyse ont permis d'obtenir les meilleurs résultats, bien que l'effet "accélérateur" attendu demeure relativement faible (+4 à 8% de rendement). Les taux de conversions obtenus à partir de chacun des deux substrats de départ différent peu pour un même temps d'hydrolyse. DP

23 est dépolymérisé sensiblement plus rapidement que DP 47 en cellodextrines solubles, ce qui suit la logique d'hydrolyse puisque l'oligosaccharide est constitué de moins d'AGU. Dans l'éventualité où Carezyme possède un CBM, celui-ci pourrait mieux s'ancrer sur les oligosaccharides de tailles plus importantes et ainsi être plus efficace pour une hydrolyse plus rapide. Lorsque la taille de la chaîne devient trop réduite, le CBM peut avoir des difficultés pour s'y ancrer. L'activité hydrolytique peut alors être affectée et ralentir jusqu'à une taille critique à partir de laquelle elle est stoppée. De plus la présence de fortes concentrations en cellodextrines dans le milieu réactionnel et notamment en cellobiose, connu pour avoir une action inhibitrice sur les endoglucanases, pourrait également causer une diminution de l'activité d'hydrolyse^[150].

II.3.3. Influence de la présence d'espèces inhibitrices

Des tests complémentaires ont été menés afin de définir l'influence de la présence des cellodextrines solubles dans le milieu réactionnel sur l'activité enzymatique. Pour cela, des hydrolyses enzymatiques des oligosaccharides de DP 47 à 2 μ L/mg (soit 2,4U/mg) ont été réalisées au sein d'une cellule d'ultra-filtration dans l'eau avec des membranes en polyethersulfone ayant des seuils de coupure à 1000 et 3000Da. Par cette technique, les cellodextrines solubles formées sont extraites du milieu réactionnel en continu. Ceci permet de s'affranchir *a priori* d'une éventuelle action inhibitrice sur l'endoglucanase. Les résultats d'hydrolyse du DP 47 obtenus sont reportés dans le Tableau 6 :

Entrée	Temps (heures)	Seuil de coupure de la membrane	Conversion en cellodextrines hydrosolubles
1	22	3000Da	54%
2	48	3000Da	56%
3	80	1000Da	77%

Tableau 6: Hydrolyse enzymatique du DP 47 en cellule d'ultra-filtration

Malgré des temps de réaction beaucoup plus longs ainsi que l'extraction et la collecte dans le filtrat du cellobiose formé, les taux de conversion obtenus restent peu améliorés en comparaison à une hydrolyse menée en réacteur conventionnel. La présence de cellobiose et de cellodextrines hydrosolubles dans le milieu réactionnel ne

semble donc pas être la cause de l'hydrolyse partielle des oligosaccharides de départ. En revanche, le taux de conversion est comparable pour un temps doublé et lorsque la cellule est équipée d'une membrane d'ultra-filtration avec un seuil de coupure plus faible (Tableau 6, entrée 3). Cette dernière permet d'extraire du milieu réactionnel les cellodextrines formées jusqu'au DP 6 ($MW = 990g.mol^{-1}$), favorisant alors l'hydrolyse des cellodextrines de tailles supérieures exclues lors des hydrolyses précédentes avec la membrane de 3000Da. Pour cette entrée, l'hydrolyse est plus longue que celles menées en réacteur conventionnel, mais les rendements sont toutefois similaires. Il apparaît donc que l'hydrolyse enzymatique des oligosaccharides se heurte à un palier au-delà duquel la conversion change peu. Les substrats étant insolubles, les endoglucanases agissent en premier lieu à la surface du solide. Il est ainsi *a priori* envisageable de penser que les oligosaccharides insolubles comportent des zones inaccessibles aux endoglucanases, et donc pour partie non-hydrolysés. La détermination du DP par dosage permet uniquement d'accéder aux extrémités réductrices des chaînes en surface des cristaux. Il est cependant probable qu'à l'intérieur de ceux-ci se trouvent des chaînes plus longues et par conséquent plus difficilement hydrolysables par l'enzyme. Il est également possible qu'après un certain temps d'hydrolyse l'enzyme atteigne une zone plus cristalline ayant résisté au prétraitement ou ayant cristallisé de manière particulière, demeurant alors récalcitrante à l'hydrolyse enzymatique.

La récalcitrance des oligosaccharides insolubles dans l'eau à l'hydrolyse enzymatique soulève deux hypothèses selon lesquelles les cristaux d'oligosaccharides contiendraient des chaînes de cellulose plus longues à cœur ; ou les cristaux régénérés contiendraient des zones très cristallines ayant résisté au prétraitement en liquide ionique.

Afin de vérifier ces hypothèses, les oligosaccharides résiduels collectés après hydrolyse enzymatique ont été analysés.

Le DP des résidus a été évalué par dosage colorimétrique et comparé à celui du substrat de départ. Il apparaît que le résidu après hydrolyse du substrat DP 47 subit une diminution de DP de 30%. Une diminution de 10% a également été observée pour le substrat DP 23. Ceci exclut donc l'hypothèse selon laquelle des chaînes d'oligosaccharides plus longues puissent se trouver au cœur des cristaux.

Les résidus ont été analysés par DRX afin d'identifier une éventuelle variation de la cristallinité par rapport au substrat de départ. De manière qualitative, les pics de diffractions des résidus apparaissent plus résolus, alors que le DP n'a quasiment pas

changé. Cette observation tend à corroborer l'hypothèse d'existence d'une zone très cristalline au cœur du substrat défavorable à l'action des endoglucanases. Ainsi, l'hydrolyse suivrait le modèle schématisé en Figure 47 :

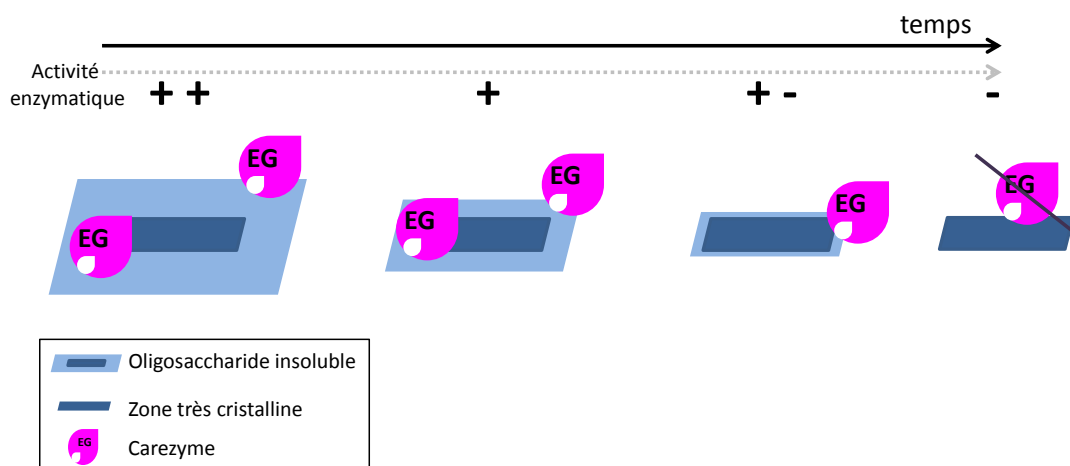


Figure 47 : Modèle hypothétique de l'hydrolyse des oligosaccharides insolubles par carezyme

Dans la littérature, Ilankovan *et al.* ont observé le même phénomène lors de l'hydrolyse enzymatique de chitine prétraitée à l'acide par la pepsine bovine^[151]. Ces auteurs ont également proposé que la pepsine ait rencontré des zones très cristallines ayant résisté au prétraitement.

II.3.4. Influence de la concentration enzymatique

La concentration en enzyme est un paramètre important, qui a été évalué par des tests d'hydrolyse à différentes concentrations de Carezyme pour un temps d'hydrolyse de 5 heures et à une concentration en oligosaccharides de DP47 constante à 10mg/mL. Les résultats sont compilés dans le Tableau 7 :

entrée	Concentration enzymatique (U/mg substrat)	Conversion en cellodextrines solubles
1	0,48	64%
2	1,2	56%
3	2,4	64%
4	2,4*	64%

*enzyme injectée en 5 fois, 0,48U/mg substrat/heure

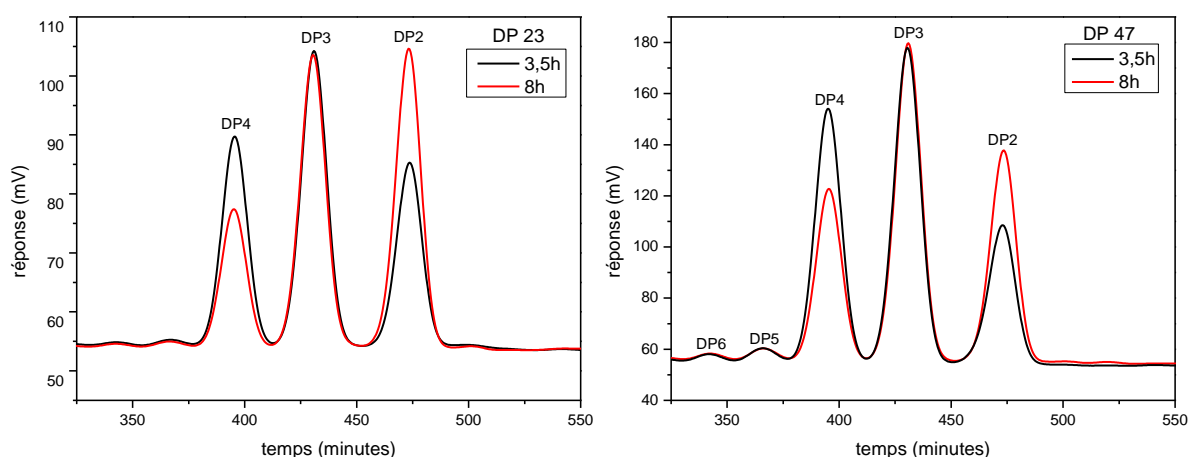
Tableau 7 : Influence de la concentration enzymatique sur la conversion en cellodextrines hydrosolubles

Les taux de conversions obtenus pour chacune des concentrations sont comparables. La concentration enzymatique n'apparaît pas déterminante pour la transformation des oligosaccharides insolubles en cellodextrines.

II.3.5. Distribution des cellodextrines formées lors de l'hydrolyse enzymatique

L'endoglucanase se comporte de manière différente suivant son substrat. Sur des substrats solubles, l'enzyme exprime pleinement ses propriétés hydrolytiques et produit dans notre cas des cellodextrines de DP compris entre 2 et 5. En revanche, nous avons mis en évidence que sur des substrats insolubles, ses propriétés hydrolytiques sont contraintes. L'enzyme est alors inefficace et ne produit que du glucose et du cellobiose en quantités insignifiantes (déterminé par CCM). Des oligosaccharides insolubles de DP réduits ont été obtenus avec de bons rendements lors de la première étape de préfragmentation. Sur de tels substrats, il est attendu que l'enzyme soit plus active afin de produire sélectivement des cellodextrines de DP 2 à 5. Les mélanges de cellodextrines obtenus après hydrolyse ont été purifiés par charbon actif puis séparés par chromatographie d'exclusion stérique, ou par chromatographie automatique sur gel de silice-amino. L'étape d'adsorption des cellodextrines sur charbon actif permet d'éliminer l'enzyme et ses contaminants non-adsorbés. Après lavage à l'eau, les cellodextrines sont ensuite désorbées du charbon par élution à l'éthanol à 50%. Lors de cette étape de filtration sur charbon, le glucose et une partie du cellobiose ne sont pas adsorbés. L'étude des distributions de cellodextrines produites n'est donc pas absolue quant aux proportions de glucose et de cellobiose.

La Figure 48 représente la distribution des espèces isolées par chromatographie d'exclusion stérique sur biogel P2 après purification sur charbon actif d'hydrolyses de 3,5 et 8 heures sur les oligosaccharides de DP 23 et DP 47. Les rendements en espèces exprimés sont calculés à partir du pourcentage isolé de l'espèce au sein du mélange de cellodextrines et rapportés ensuite au taux de conversion en cellodextrines hydrosolubles de l'hydrolyse.



	Hydrolyse 3,5h	Cellotriose	Cellotétraose
DP 23		16 %	13 %
DP 47		16 %	15 %

Figure 48 : Evolution de la distribution en cellodextrines en fonction du temps d'hydrolyse et du substrat

Ces chromatogrammes mettent en évidence qu'à des temps d'hydrolyse égaux, l'action de l'endoglucanase entraîne la formation de cellodextrines plus longues à partir d'un substrat de départ de DP important. En effet, bien que les taux de conversion en cellodextrines soient moins élevés avec un tel substrat, les rendements globaux en cellotriose et cellotétraose sont comparables.

L'hydrolyse enzymatique des oligosaccharides insolubles permet une diminution rapide et contrôlée de leurs tailles. De plus, les espèces solubles sont préférentiellement hydrolysées par l'endoglucanase. Ainsi comme représenté sur le chromatogramme en Figure 48, l'augmentation du temps d'hydrolyse implique une diminution des tailles des

espèces produites. Pour un même substrat, la proportion de cellotriose varie cependant très peu avec le temps d'hydrolyse. Afin d'évaluer l'évolution de sa formation au sein de l'hydrolysats, des suivis cinétiques ont été réalisés par analyse HPLC. Après un étalonnage, la concentration en cellotriose a ainsi pu être déterminée. Les hydrolyses réalisées pour le suivi cinétique reprennent les conditions utilisées précédemment à savoir une concentration en substrat de $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et une concentration enzymatique de $1,2\text{U}/\text{mg}$ substrat. En HPLC à partir du cellotriose les anomères α et β des cellodextrines sont séparés. Le pic de l'espèce est ainsi dédoublé, et l'anomère α est élué en premier.

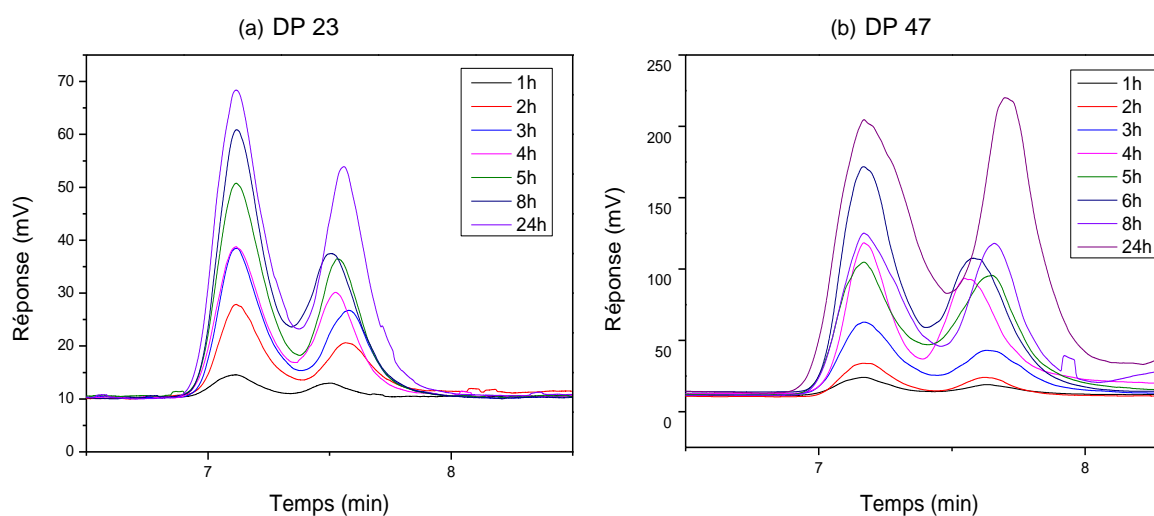


Figure 49 : Suivi cinétique par HPLC de la formation de cellotriose lors de l'hydrolyse enzymatique d'oligosaccharides de DP 23 (a) et DP 47 (b)

Sur la Figure 49, les chromatogrammes HPLC obtenus superposés mettent en évidence l'augmentation de la concentration en cellotriose dans l'hydrolysats avec le temps d'hydrolyse, pour les deux tailles de substrat de départ. L'analyse quantitative des données avec une gamme étalon de concentrations connues en cellotriose a permis de déterminer la concentration dans le milieu à différents temps. Ainsi, le tracé de l'évolution de la concentration en cellotriose en fonction du temps (Figure 50) montre un ralentissement de la production de l'espèce après 5 heures, qui tend vers une valeur asymptotique.

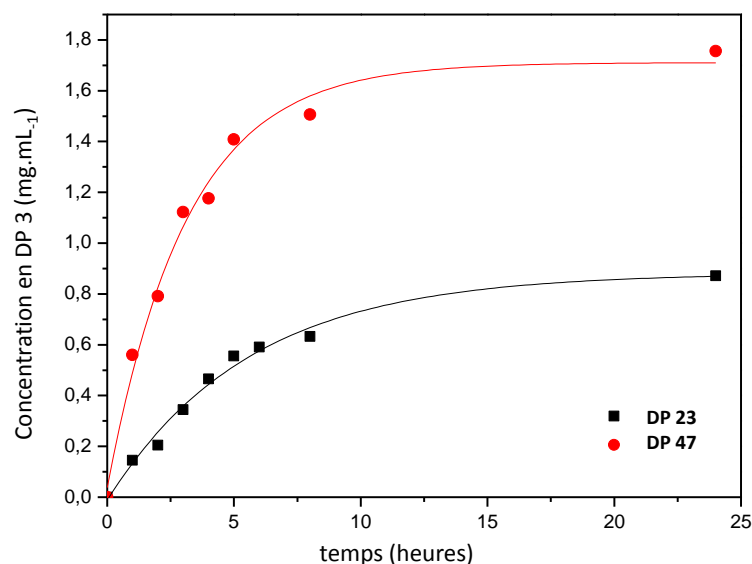


Figure 50 : Evolution de la concentration en cellotriose lors de l'hydrolyse enzymatique de DP 23 et DP 47

Pour chacun des substrats, l'augmentation de la concentration en cellotriose dans le milieu semble suivre une loi exponentielle croissante pour atteindre un palier au bout de 8 heures d'hydrolyse.

La concentration en cellotriose semble donc moins affectée par l'hydrolyse secondaire des cellodextrines formées. Ce substrat est en effet potentiellement non-hydrolysable par l'endoglucanase en raison de sa plus faible affinité pour l'enzyme que les cellodextrines de DP supérieures à 4^[149]. Il est donc raisonnable de penser que les cellodextrines de tailles supérieures à DP 3 sont à l'inverse plus susceptibles d'être hydrolysées après avoir été formées.

II.4. Bilan

La stratégie développée dans ce travail permet la production contrôlée de cellodextrines par combinaison d'hydrolyses successives. La première étape permet l'obtention d'oligosaccharides par hydrolyse acide de cellulose en milieu liquide ionique. Le procédé permet d'obtenir des oligosaccharides de tailles bien définies selon le temps de réaction, avec de très bons rendements et une faible distribution de population.

La seconde étape d'hydrolyse enzymatique de ces oligosaccharides permet leur conversion contrôlée en cellodextrines solubles avec de bons rendements allant jusqu'à

77%. Des cellodextrines de DP 3 et DP 4 sont majoritairement formés, avec des rendements totaux autour de 16% en chacune des espèces. Ces résultats constituent une amélioration significative des procédés existants, qui permettent d'obtenir dans le meilleur des cas 17% en mélange de cellodextrines de DP 3 et 4, comme détaillé dans l'introduction du chapitre.

La méthode de purification des cellodextrines hydrosolubles par combinaison d'adsorption sur charbon et purification sur Biogel P2 ou chromatographie automatique sur gel d'amino-silice permet l'isolation efficace des cellodextrines avec une excellente pureté.

La stratégie globale a permis la conversion rapide et contrôlée de la cellulose en cellodextrines en employant des conditions réactionnelles plus douces et respectueuses de l'environnement que les méthodes conventionnelles. Ce travail met également en évidence le rôle déterminant de la taille et de la cristallinité de la cellulose dans le processus d'hydrolyse enzymatique.

Bien qu'ayant subi un prétraitement, une partie de la cellulose semble demeurer très cristalline et n'est pas hydrolysée par l'enzyme. L'étape de prétraitement de la cellulose reste à optimiser afin d'encore améliorer les rendements en cellodextrines hydrosolubles. Les liquides ioniques pourraient permettre de réaliser des hydrolyses enzymatiques sur la cellulose en solution. Ceci requiert toutefois de développer des liquides ioniques plus biocompatibles. Une alternative consiste à utiliser un dérivé de cellulose soluble dans l'eau et hydrolysable par les enzymes.

III. Hydrolyse enzymatique de cellulose acétate hydrosoluble pour la production contrôlée de cellodextrines

Comme décrit précédemment, l'hydrolyse contrôlée de la cellulose est limitée par ses propriétés physico-chimiques intrinsèques. Les principaux freins à sa dépolymérisation par les enzymes sont sa structure très cristalline et son insolubilité dans l'eau. Ces deux facteurs sont principalement responsables de l'inactivité des enzymes et en particulier des endoglucanases, car ils rendent les liaisons osidiques difficilement accessibles. Pour palier à ces inconvénients, nous avons cherché à utiliser un dérivé soluble de cellulose pouvant être hydrolysé enzymatiquement pour l'obtention de cellodextrines.

III.1. Cellulose acétate : brève introduction

La cellulose triacétate est un dérivé de cellulose insoluble dans l'eau. Elle est communément appelée cellulose acétate et représente le principal dérivé ester de cellulose produit dans le monde. La cellulose acétate est préparée par réaction de l'anhydride acétique sur la cellulose. Le degré de substitution (DS) des hydroxyles dépend directement de la quantité d'anhydride acétique apportée à la réaction. La cellulose acétate fait partie de la catégorie des matériaux biosourcés et biodégradables. Elle possède de nombreuses applications dans les industries textiles, d'emballages ou des films. Afin de pouvoir être dégradée par des enzymes, la première étape enzymatique implique l'action d'estérases en raison de ses groupements substituants ester^[152]. Une fois franchi un seuil de désacétylation critique, les cellulases sont alors capables de poursuivre la dégradation. Sakai et al. ont démontré en 1996 que ces deux enzymes agissent efficacement en synergie pour dégrader le polymère^[153]. En effet la cinétique de dégradation d'ester de cellulose où les endoglucanases agissent seules est plus longue que la combinaison d'endoglucanases et d'acétylestérases.

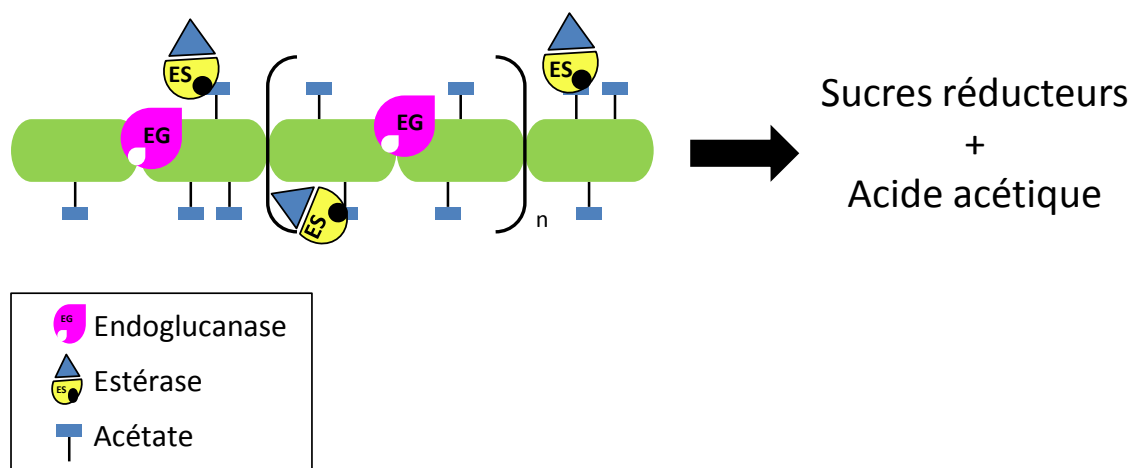


Figure 51 : Biodégradation de la cellulose acétate, d'après Sakai et al.^[153]

D'autres méthodes existent également pour dégrader l'acétate de cellulose comme la photo-dégradation (par oxydation photocatalytique, par dégradation photosensible) impliquant la formation de radicaux amorcés par l'irradiation de la lumière. Les différents types de mécanismes de dégradation chimique et enzymatique peuvent également être combinés^[154].

En faisant varier le DS de la cellulose acétate, les propriétés du polymère changent. Ici, l'une des propriétés est particulièrement intéressante pour notre étude : il s'agit de sa solubilité dans l'eau à de faibles DS. En effet, la cellulose acétate substituée présentant des DS compris entre 0,5 et 1,1 est soluble dans l'eau^[155]. Il est à noter que les propriétés de solubilité et de réactivité fluctuent en fonction de la distribution des groupements acétate sur les trois positions hydroxyles de l'AGU mais aussi en fonction de la distribution le long de la chaîne de cellulose^[156]. Goodlett *et al.* ont notamment décrit les positions C₆ et C₂ comme plus réactives à la désacétylation que la position C₃^[157]. L'approche sélective désirée pour l'hydrolyse de la chaîne en cellodextrines implique l'utilisation de cellulases, et en particulier d'endoglucanases. Wirick *et al.* ont montré que pour être actives sur des dérivés de cellulose portant des groupements ether, les endoglucanases nécessitent au moins un groupement hydroxyle libre par unité AGU afin de réaliser la coupure glycosidique^[158]. Les endoglucanases sont capables d'hydrolyser la cellulose partiellement acétylée jusqu'à des valeurs de DS de 1,6 en dépit de l'encombrement stérique formé par ses groupements acétate^[159, 160]. Notre stratégie de synthèse a donc été de réaliser l'hydrolyse enzymatique de cellulose faiblement acétylée et donc soluble dans l'eau, afin de parvenir après désacétylation à la production sélective de cellodextrines. D'après la littérature, cette stratégie n'a jamais été appliquée à la synthèse contrôlée de cellodextrines. Par cette approche, le dérivé de cellulose est solubilisé dans l'eau, ce qui devrait permettre un meilleur accès des

enzymes à ses liaisons osidiques. Il pourrait alors être dégradé par le moyen d'une endoglucanase seule.

III.2. Synthèses de cellulose acétate hydrosoluble

Il existe plusieurs méthodes pour produire la cellulose partiellement acétylée. Dans le cadre de ce travail, le but étant de produire un dérivé de cellulose soluble dans l'eau il convient de préparer des substrats ayant un DS inférieur à 1,1. Deux stratégies majeures existent :

- l'acétylation de la cellulose,
- la désacétylation partielle de cellulose triacétate.

L'acétylation de la cellulose est de manière générale réalisée en présence d'anhydride acétique ou de chlorure d'acétyle, dans un milieu dérivatisant (TFA, N_2O_4 /DMF..) ou dans un milieu non-dérivatisant (solvants classiques de la cellulose : DMA/LiCl, liquides ioniques..)^[104].

La désacétylation de la cellulose acétate est dans la plupart des cas réalisée par hydrolyse acide en présence d'acide acétique, ou par désacétylation en milieu basique. Heinze et Liebert ont publié une revue de ces procédés en 2004^[155]. D'après la littérature, il apparaît que le degré de substitution de la cellulose acétate est fortement corrélé au procédé utilisé. Ainsi, les substrats avec les DP les plus faibles sont obtenus plus facilement par désacétylation de la cellulose triacétate. Miyamoto *et al* ont étudié l'influence de la méthode de production sur la distribution des groupements acétate pour de faibles DS, et décrivent une répartition plus homogène pour les procédés de désacétylation de la cellulose triacétate que pour l'acétylation de la cellulose^[161].

La cellulose acétylée soluble dans l'eau (WSCA : water soluble cellulose acetate) a été produite au laboratoire par méthanolyse de la cellulose triacétate dans l'acide acétique selon les conditions reportées par Edgar et Buchanan^[162]. La cellulose triacétate commerciale de départ possède une masse molaire moyenne de $30000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour un taux d'acétate de 40%, ce qui correspond à un DS de 2,5 et un DP de 112.

III.3. Caractérisation de la cellulose acétate.

III.3.1. Rendement et détermination du DS

La fonctionnalisation des groupements hydroxyle par des groupements acétate intervient de manière relativement aléatoire sur chaque AGU et le long de la chaîne. Ainsi, chaque unité peut porter entre 0 et 3 fonctions acétate. Afin de déterminer le DS de la cellulose, plusieurs techniques peuvent être utilisées. Une des plus courantes reste la technique de spectroscopie RMN, avec la détermination par RMN du ^1H initiée par les travaux pionniers de Goodlett *et al* en 1971^[163], et par RMN du ^{13}C par Kamide *et al*^[164]. Le DS est évalué simplement en effectuant le rapport des intégrations des pics de protons anomère et des protons provenant des groupements acétate.

La cellulose partiellement acétylée est produite à partir de la cellulose. Afin de calculer la masse molaire d'une unité substituée par un ester, il convient d'appliquer l'Équation 6 :

$$C_{6+\sum DSi.Ni} H_{10+\sum DSi.(Mi-1)} O_{5+\sum DSi.Li}$$

Équation 6 : Formule brute d'une unité anhydroglucose substituée ester

où DSi est le degré de substitution, Ni est le nombre d'atomes de carbone par substituant, Mi est le nombre d'atomes d'hydrogène du substituant et Li le nombre d'atomes d'oxygène.

Ici pour une fonction acétate CH_3CO , les constantes sont Ni=2, Mi=3 et Li=1.

Le Tableau 8 rassemble les masses molaires d'une AGU pour différents degrés de substitution.

DS	Formule brute	Masse Molaire	% MW Acétate
DS 0	C ₆ H ₁₀ O ₅	162 g/mol	0%
DS 0,4	C _{6,8} H _{10,8} O _{5,4}	178,8 g/mol	9%
DS 0,5	C ₇ H ₁₁ O _{5,5}	183 g/mol	11%
DS 0,6	C _{7,2} H _{11,2} O _{5,6}	187,2 g/mol	13%
DS 0,7	C _{7,4} H _{11,4} O _{5,7}	191,4 g/mol	15%
DS 0,8	C _{7,6} H _{11,6} O _{5,8}	195,6 g/mol	17%
DS 2,5	C ₁₁ H ₁₅ O _{7,5}	267 g/mol	39%
DS 3	C ₁₂ H ₁₆ O ₈	288 g/mol	44%

Tableau 8 : Masses molaires des AGU acétylées ayant différents DS

Quatre séries de WSCA ayant des DS différents ont été produits. Dans le cadre du partenariat avec la société ERAS Labo, deux des composés ont été synthétisés au sein de leur laboratoire. Les WSCA ont été préparés par dissolution de cellulose triacétate dans l'acide acétique et le méthanol. La réaction a été conduite à 150°C dans un appareil de Parr pendant une nuit. Le DS est dépendant des concentrations en méthanol et en acide ajoutées. Les DS ont ensuite été déterminés par RMN du ¹H, ce qui a permis l'évaluation des rendements de désacétylation. Les résultats sont consignés dans le Tableau 9 :

Entrée	DS	Rendement (%)
Cellulose triacétate	2,5	(commercial)
1	0,5	~80% (produit par Eras)
2	0,6	~80% (produit par Eras)
3	0,7	79%
4	0,8	82%

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats de synthèse et DS de cellulose acétate soluble

La méthode de désacétylation par méthanolyse a permis la production d'une gamme de WSCA à différents DS, avec des rendements de l'ordre de 80%. Les celluloses acétate produites par ERAS ont été préparées suivant le même protocole qu'au laboratoire.

Le DS des WSCA produites a été évalué par RMN 1H selon l'Équation 7, en calibrant à 1 l'intégration des protons anomères :

$$DS = \frac{1}{3} \times \int H_{acétate}$$

Équation 7 : Détermination du DS des WSCA

Pour exemple, le spectre RMN du DS 0,8 est représenté en Figure 52 :

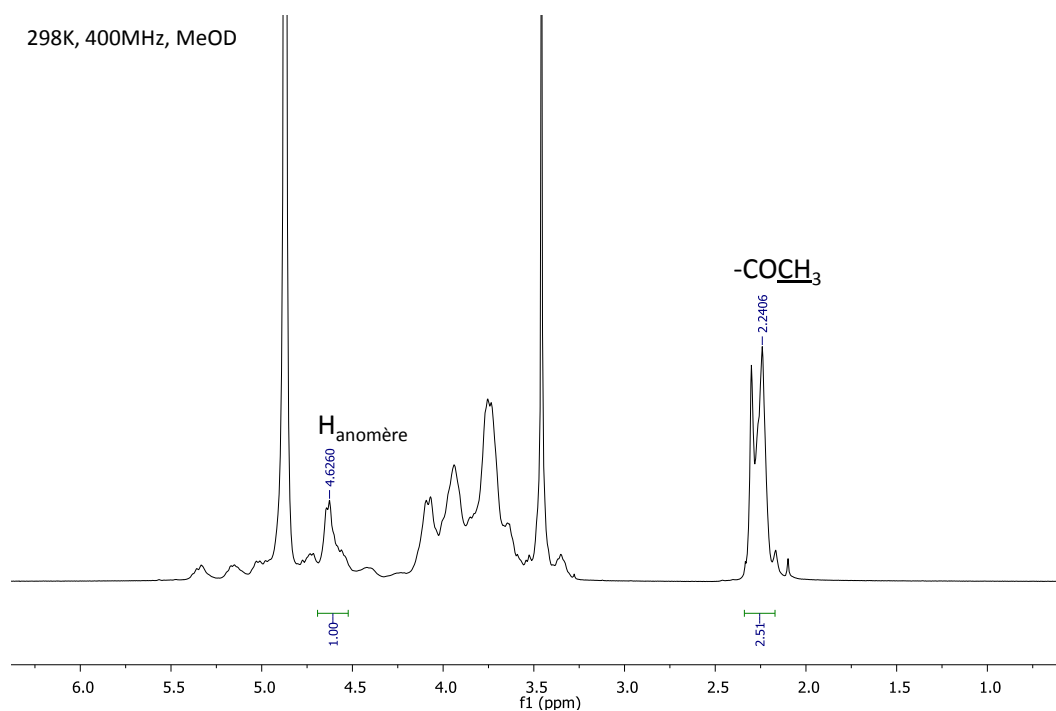


Figure 52 : Spectre RMN 1H de la WSCA DS 0,8

Le DS a été déterminé en appliquant l'Équation 7 par laquelle :

$$DS = \frac{1}{3} \times 2,5 = 0,8$$

III.3.2. Détermination du DP

Le DP moyen de chaque échantillon de cellulose acétate soluble est déterminé en réalisant le ratio entre la masse molaire du polymère et la masse d'un monomère constitutif au DS approprié selon l'Équation 8 :

$$\overline{DP}_i = \frac{Mw \text{ cellulose acétate soluble } (i)}{Mw \text{ AGU } (i)}$$

Équation 8 : Calcul du DP moyen de cellulose acétate soluble

Des analyses par chromatographie d'exclusion stérique (GPC) en phase aqueuse ont été réalisées afin d'évaluer les masses molaires M_w et M_n . Les résultats sont reportés dans le Tableau 10 :

entrée	DS	M_w (g.mol ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	DP moyen	Réduction/DP initial	I
1	0,5	7189	5046	39	65 %	1,425
2	0,6	8683	4506	46	59 %	1,927
3	0,7	13900	4731	73	35 %	1,806
4	0,8	10210	6554	52	54 %	1,558

Tableau 10 : DP de la cellulose acétate soluble

La méthode de désacétylation partielle utilisée permet la formation de WSCA. La gamme d'oligosaccharides à disposition est comprise entre les DS 0,5 et 0,8, et possède des indices de polymolécularité relativement élevés. Ces indices traduisent l'existence d'une population moyenne assez large autour du DP moyen calculé. La réaction de désacétylation a également engendré une diminution du DP initial de plus de 50% pour la plupart des échantillons. Cette étape de désacétylation partielle de la cellulose acétate permet donc également de réaliser la préfragmentation de la chaîne d'oligosaccharides de départ en oligosaccharides de tailles inférieures.

III.4. Hydrolyse enzymatique de la cellulose acétate hydrosoluble

Les hydrolyses enzymatiques des échantillons de WSCA de DS 0,5 à 0,8 ont été réalisées au moyen de l'endoglucanase Carezyme décrite dans les travaux précédents. Les réactions ont été menées à 37°C dans l'eau. Typiquement, la concentration en enzyme utilisée était de 2,4U/mg de substrat et la concentration en substrat de 20mg/mL. Les cellodextrines produites étant partiellement acétylées, elles ont été désacétylées par ajout d'une solution d'ammoniaque. Cette dernière étape a conduit à la formation d'un précipité correspondant à des oligosaccharides libres de tailles trop importantes pour être solubles dans l'eau.

III.4.1. Conversion de la WSCA en cellodextrines hydrosolubles

Le rendement en cellodextrines hydrosolubles produites est déterminé en effectuant le rapport entre le nombre de moles de cellodextrines insolubles recueillies après hydrolyse et la quantité de matière de WSCA engagée dans la réaction.

Soit n_1 le nombre de moles de WSCA initial où :

$$n_1 = \frac{m(WSCA)}{M_w AGU(DS)}$$

Soit n_2 le nombre de moles d'oligosaccharides insolubles désacétylés restant où :

$$n_2 = \frac{m(oligosaccharide\ insoluble)}{M_w AGU(DS\ 0)}$$

Le taux de conversion de la WSCA en cellodextrines hydrosolubles a été déterminé selon l'Équation 9 :

$$\text{taux de conversion} = 100 \times \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1} \right)$$

Équation 9 : Taux de conversion de la WSCA en cellodextrines hydrosolubles

Des hydrolyses ont été réalisées à des temps de réaction de 1 heure, 2,5 heures et 4,5 heures afin d'évaluer l'évolution cinétique de réaction. L'évolution du taux de conversion en cellodextrines en fonction du temps, pour chacune des populations d'échantillon est représentée en Figure 53.

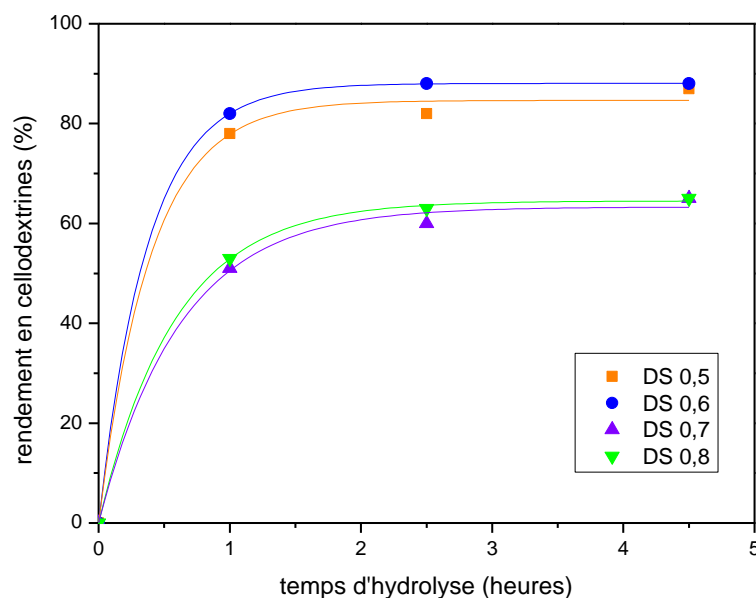


Figure 53 : Evolution du taux de conversion de WSCA en cellodextrines hydrosolubles en fonction du temps d'hydrolyse

L'évolution des taux de conversion atteint pour chacun des échantillons un palier après 2 à 3 heures d'hydrolyse. Cette valeur asymptotique varie suivant le DS du substrat. Ainsi le taux de conversion maximal atteint 65% pour les DS 0,7 et 0,8 respectivement. De manière similaire, des rendements de 87 et 88% ont été obtenus à partir des DS 0,5 et 0,6. Comme attendu, les rendements en cellodextrines solubles sont meilleurs lorsque la WSCA de départ possède un plus faible DS. Le substrat naturel des endoglucanases est la cellulose. Plus le substrat d'hydrolyse se rapproche du substrat naturel de l'enzyme, meilleure est l'affinité pour celle-ci. Dans la littérature, plusieurs exemples montrent que plus le DS de la WSCA est faible, plus l'hydrolyse enzymatique est performante^[160].

Le DS moyen traduit la distribution aléatoire des groupements acétate sur chacune des unités le long de la chaîne. Cette distribution aléatoire engendre la formation de fragments comportant des unités portant de 0 à 3 acétates. Ainsi il est possible que la chaîne comporte des fragments de plusieurs unités successives ne portant aucun acétate. Auquel cas, l'endoglucanase est très active sur ce fragment. De

la même façon, la chaîne peut comporter des unités portant plus d'un acétate, et dans ce cas l'enzyme n'est pas capable de l'hydrolyser. Selon leur taille, ces fragments non-hydrolysés sont insolubles dans l'eau, et précipitent lors de la désacétylation.

En résumé, plus le DS de la cellulose acétate est important, plus la probabilité de rencontrer des zones comportant un taux de groupements acétate élevé augmente. Cette hypothèse pourrait permettre d'expliquer en partie les taux de conversion de la cellulose acétate en cellodextrines solubles plus faibles pour les DS plus élevés.

III.4.2. Distribution de tailles des cellodextrines hydrosolubles produites

Après hydrolyse, les mélanges de cellodextrines partiellement acétylées produits sont déprotégés par ajout d'ammoniaque. Les oligosaccharides libres insolubles dans l'eau précipitent et la fraction soluble est séparée et purifiée sur charbon actif pour s'affranchir de l'enzyme. Comme décrit précédemment, cette étape engendre la perte d'une quantité de glucose et cellobiose qui ne s'adsorbe pas sur le charbon. Après désorption à l'éthanol à 50%, les mélanges de cellodextrines sont purifiés par SEC sur biogel P2 afin d'isoler chaque espèce.

Les cellodextrines produites sont isolées avec une excellente pureté, et ont été caractérisées par spectrométries de masse et de RMN. Pour exemple, en Figure 54 est présenté le spectre de masse ESI⁺ du cellotriose.

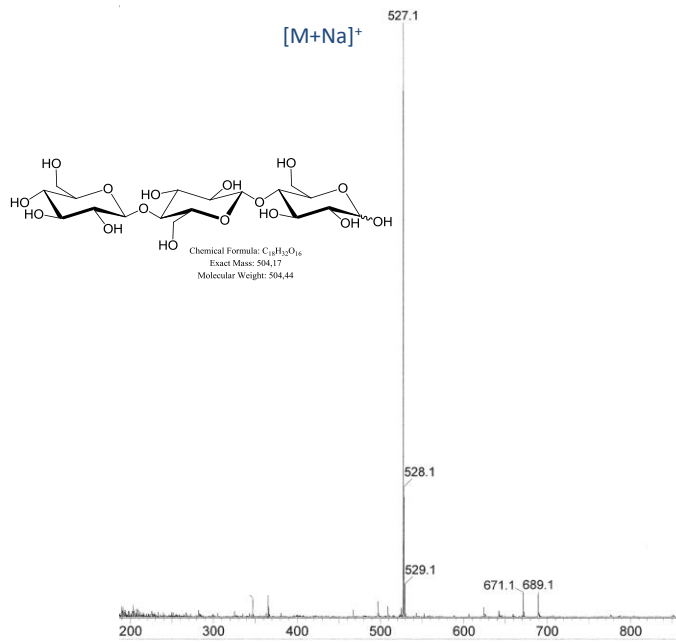


Figure 54 : Spectre ESI⁺ du cellulose

Le spectre RMN du ¹H du cellulose se trouve en Figure 55, et correspond bien aux données de la littérature^[19].

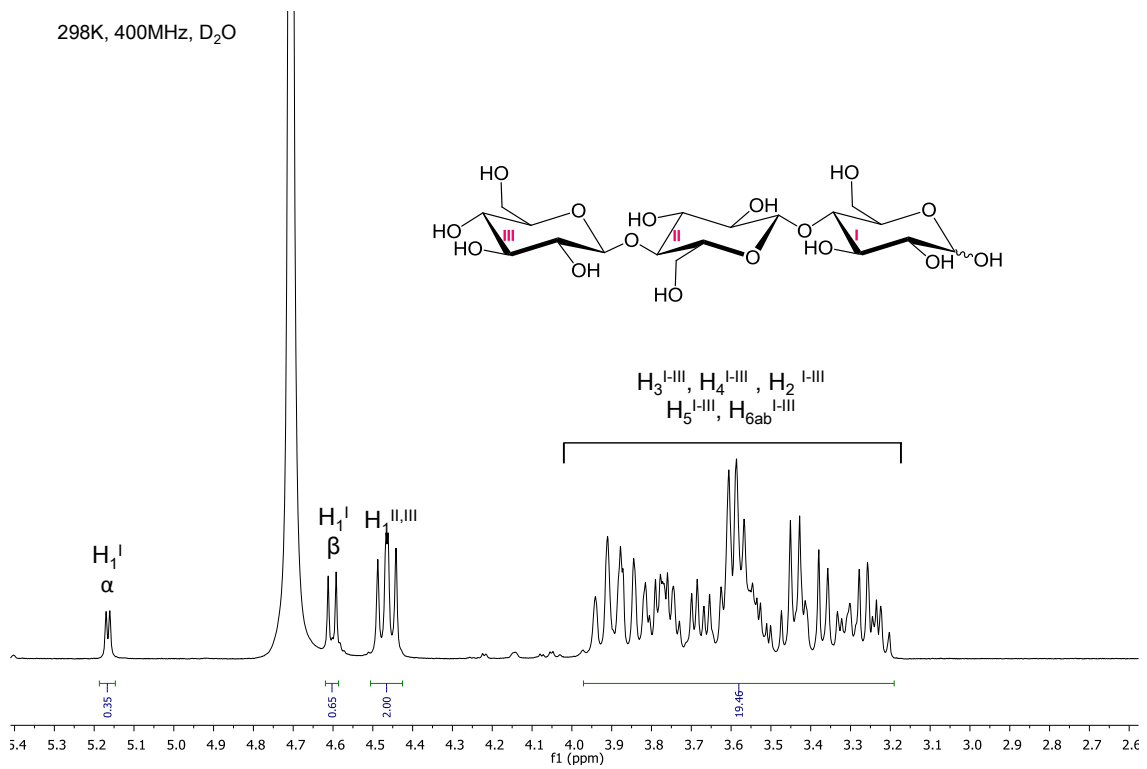


Figure 55 : Spectre RMN ¹H du cellulose

III.4.2.1. Influence de l'enzyme sur la distribution

La nature de l'enzyme est un paramètre important pour la conversion enzymatique, mais aussi pour la distribution des espèces formées. Les endoglucanases EG V, dont Carezyme, possèdent la capacité de former des cellodextrines de tailles comprises entre les DP 2 et 5. Des tests préliminaires sur des cellodextrines solubles ont permis de le vérifier.

Afin d'évaluer les différences de distribution des cellodextrines suivant la nature de l'enzyme, des hydrolyses enzymatiques de 60 minutes dans les mêmes conditions de concentrations ont été réalisées sur WSCA DS 0,5. Les enzymes utilisées sont l'endoglucanase Carezyme, une endoglucanase d'*Aspergillus niger* commerciale et Celluclast 1,5L qui est un mélange de cellulases. Pour ces tests, l'analyse a été réalisée sans filtration sur charbon afin de mieux observer l'évolution des distributions. Ici l'enzyme et les cellodextrines insolubles ont été éliminés après centrifugation.

Le suivi HPLC des hydrolyses a permis de tracer le chromatogramme en Figure 56 :

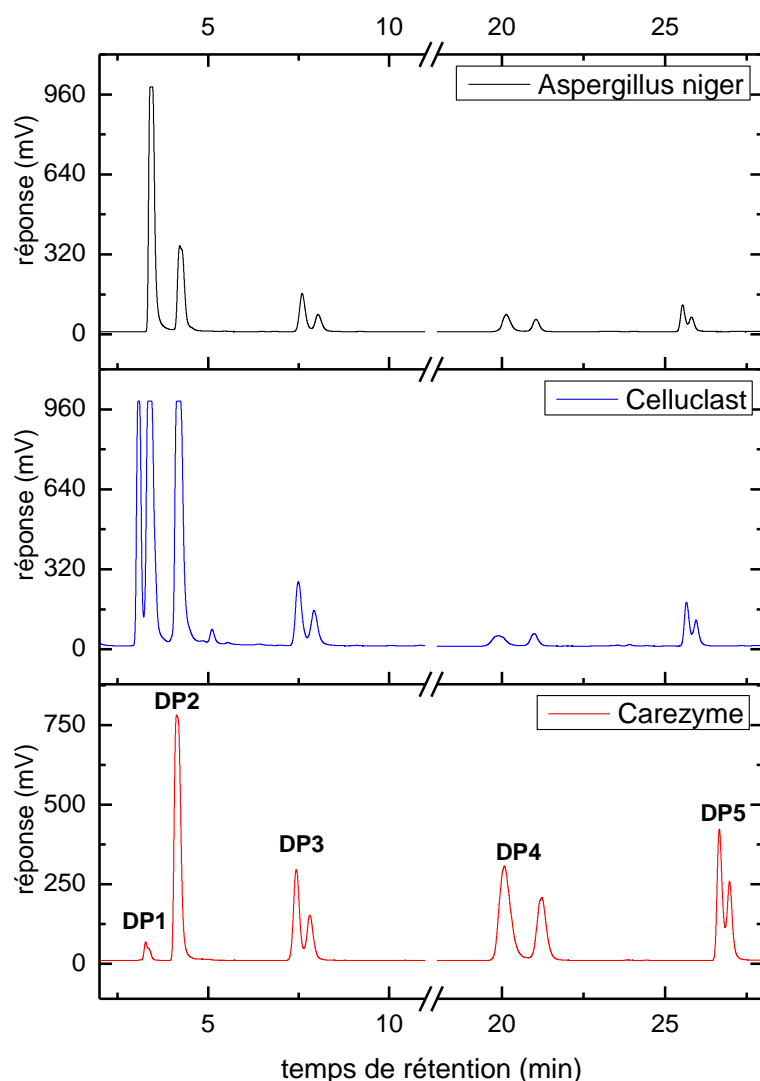


Figure 56 : Profil HPLC de mélanges de cellodextrines hydrosolubles obtenus après hydrolyse enzymatique de WSCA DS 0,5 en 60 minutes par EG d' *Asp.Niger* (noir), Celluclast (bleu), Carezyme (rouge)

Les trois hydrolyses ainsi que les analyses des hydrolysats ont été réalisées de la même manière. Les intensités des pics de produits sont donc directement proportionnelles à la quantité de l'espèce dans l'hydrolysat. Dans la Figure 56, le chromatogramme bleu représente l'hydrolyse de WSCA par le mélange d'enzymes Celluclast. Le chromatogramme indique que les espèces majoritairement formées sont les DP 1, 2 et 3, ce qui était prévisible. Néanmoins, deux faibles pics correspondant aux DP 4 et 5 sont observables. En comparaison, les chromatogrammes en noir et en rouge représentent des hydrolyses réalisées avec des endoglucanases (Carezyme, EG d'*A.niger*). Ces hydrolyses montrent des pics correspondant aux DP 3, 4 et 5 qui semblent en toute logique plus importants qu'avec Celluclast. En comparant les chromatogrammes, Carezyme semble produire des cellodextrines de DP 3 à 5 avec des

rendements supérieurs. De plus, d'après le chromatogramme, l'enzyme Carezyme ne produit presque pas de glucose. Cette observation a d'ailleurs été confirmée par une analyse en CCM. En revanche, au regard de l'intensité du pic sur le chromatogramme, Carezyme semble produire du cellobiose de manière conséquente avec ce substrat.

En résumé, Carezyme produit majoritairement des oligosaccharides de DP 2 à 5 sur la WSCA DS 0,5. Ainsi, les concentrations en cellotriose, cellotétraose et cellopentaose sont nettement supérieures qu'avec les deux autres enzymes testées.

III.4.2.2. Influence du temps d'hydrolyse

Les mélanges de cellodextrines solubles obtenus sont purifiés par SEC sur Biogel P2 dans le but d'isoler les espèces en présence et d'évaluer l'évolution de leurs tailles en fonction du temps. Les rendements en chaque espèce constituant le mélange sont représentés pour trois différents temps d'hydrolyse d'une WSCA de DS 0,7 (Figure 57) :

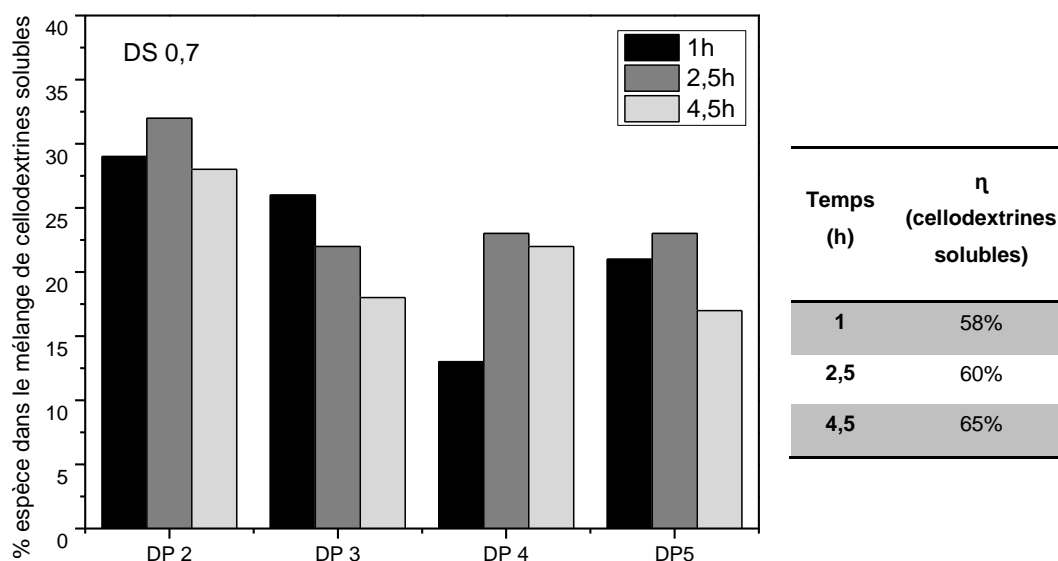


Figure 57 : Evolution de la distribution des cellodextrines hydrosolubles en fonction du temps d'hydrolyse (WSCA DS 0,7)

Le graphe en Figure 57 met en évidence une faible diminution des tailles de cellodextrines avec le temps d'hydrolyse. Comme observé sur la Figure 53 (page 129), la cinétique de conversion de la cellulose acétate en cellodextrines solubles est rapide puisqu'en moins d'une heure, environ 50% du substrat de départ est hydrolysé. Une fois

l'hydrolyse initiée, l'enzyme est en présence de cellodextrines de faibles DP et d'oligosaccharides de départ en cours de fragmentation. Les deux espèces entrent alors en compétition puisque chacune est hydrolysable par l'enzyme. L'enjeu ici est de se placer dans des conditions de temps telles que l'enzyme ait suffisamment hydrolysé la cellulose acétate, sans refragmenter les cellodextrines d'intérêt de DP 3 et 4 qu'elle produit. Bien que l'hydrolyse soit rapide, la conversion totale de la WSCA de départ est limitée par la présence des groupements acétate.

Une étude cinétique qualitative des espèces formées lors de la première heure d'hydrolyse de WSCA de DS 0,5 a été réalisée. Les mêmes conditions de concentrations ont été utilisées pour chacune des hydrolyses, et l'évolution a été suivie par HPLC. Pour ces tests, l'analyse a été réalisée sans filtration sur charbon préalable afin de mieux observer l'évolution des distributions de glucose et cellobiose au cours du temps.

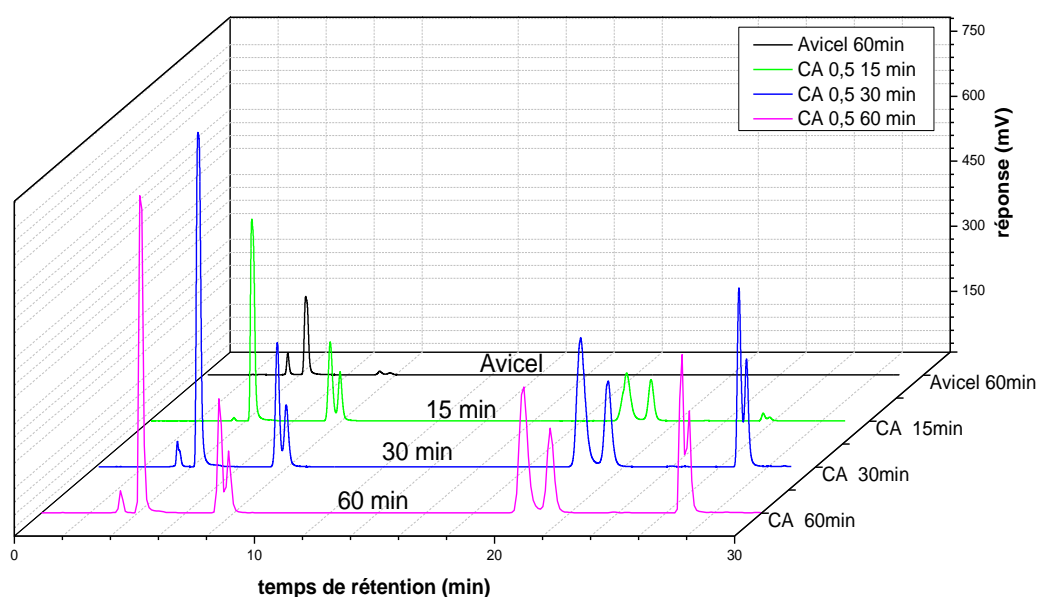


Figure 58 : Profils HPLC des mélanges de cellodextrines hydrosolubles formés par l'hydrolyse de WSCA DS 0,5 par Carezyme en fonction du temps

Le chromatogramme en Figure 58 montre ici une augmentation des concentrations en chacune des espèces avec le temps. Les espèces majoritaires, déterminées par l'aire sous la courbe du pic correspondant sont le cellotriose, le cellotétraose et le cellopentaose.

Cette étude montre qu'à des temps d'hydrolyse courts, les espèces majoritairement formées ont des tailles supérieures à un DP 2. En compilant les données, il semble que les cellodextrines de DP 3, 4 et 5 se forment rapidement et commencent à subir une faible hydrolyse après 2,5 heures.

III.4.2.3. Influence du DS sur la distribution

Dans la partie III.4.1 (p 128) il a été mis en évidence que le DS influence le taux de conversion final de cellulose acétate en cellodextrines solubles. Ainsi, il est légitime d'attendre une relation entre le DS et la distribution des cellodextrines pour un même temps d'hydrolyse. Les hydrolyses de WSCA des différents DS ont été réalisées dans des conditions réactionnelles identiques pendant 2,5 heures.

Les mélanges de cellodextrines produits ont été purifiés par adsorption sur charbon puis par Biogel P2 afin de déterminer leur composition et obtenir le rendement global en DP 3, 4 et 5. Les résultats sont représentés par l'intermédiaire de l'histogramme représenté en Figure 59, et expriment les rendements globaux en DP pour chaque WSCA de départ. A titre d'indication les rendements d'hydrolyse en cellodextrines solubles sont précisés dans dans le tableau de la Figure 59.

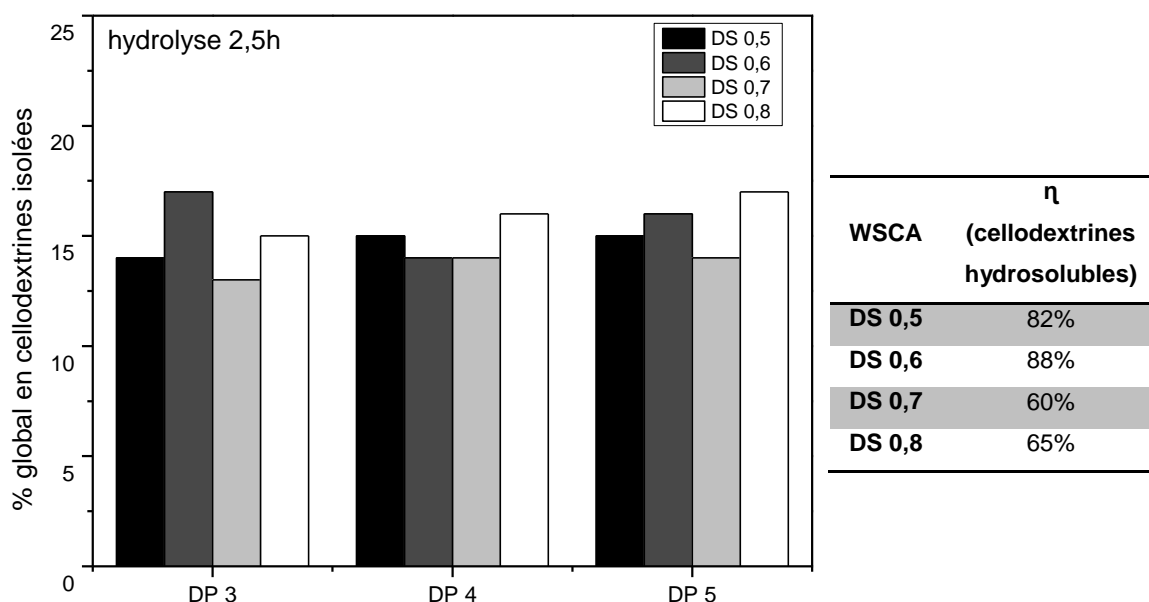


Figure 59 : Evolution de la distribution des cellodextrines isolées en fonction du DS

Les résultats obtenus montrent que malgré des taux de conversion en cellodextrines solubles meilleurs à partir de WSCA plus faiblement substituées (DS 0,5 et 0,6), les

rendements en cellodextrines de DP 3, 4 et 5 sont comparables pour chacun des DS. Ainsi, les rendements en DP 3, DP 4, et DP 5 obtenus sont en moyenne de 15%. Par exemple, pour une hydrolyse de 2,5 heures avec une WSCA de DS 0,8 de départ, des rendements de 15% en DP 3, 16% en DP 4 et 17% en DP 5 ont été obtenus.

En conclusion, sur la globalité du procédé, bien que les taux de conversion en cellodextrines solubles ne soient pas identiques pour les WSCA de différents DS à chacune des étapes, les rendements en cellodextrines de DP 3, 4 et 5 sont très comparables. Le DS influence bien le taux de conversion global en cellodextrines solubles, car la présence des groupements acétate limite l'hydrolyse enzymatique. Le procédé permet d'obtenir de bons rendements en cellotriose, cellotétraose et cellopentaose d'environ 15% en chacune des espèces, ce qui constitue une nette amélioration des rendements obtenus par hydrolyse chimique.

IV. Conclusion et perspectives

L'obtention de cellodextrines à partir de la cellulose a jusqu'à présent été peu étudiée. Le moyen le plus rapide d'accéder à de tels substrats reste l'hydrolyse par les acides minéraux. Ces méthodes ont l'inconvénient d'être dangereuses de part la corrosivité des réactifs impliqués, mais elles sont surtout peu contrôlables quant aux tailles d'espèces formées. Les rendements globaux moyens en cellodextrines restent modestes de l'ordre de 40% en DP1 à 9, et le sont d'autant plus concernant les cellodextrines de DP 3 et 4, avec des rendements de moins de 15% en mélange des deux espèces^[64].

La méthode développée ici pour la production contrôlée de cellodextrines en deux étapes à partir de l'Avicel représente une alternative intéressante aux procédés existants. La première étape de préfragmentation de la cellulose par hydrolyse acide en milieu liquide ionique permet de s'affranchir de milieux réactionnels toxiques et corrosifs. Les liquides ioniques ont en effet montré leur efficacité pour la dissolution de la cellulose. Les conditions de catalyse acide élaborées permettent de préfragmenter la cellulose et

de produire efficacement des oligosaccharides insolubles de tailles ciblées, avec des distributions de populations fines et avec d'excellents rendements.

Ces oligosaccharides constituent alors des substrats plus propices à l'hydrolyse enzymatique réalisée dans le deuxième temps du procédé. Celle-ci a permis de produire sélectivement des cellodextrines de DP 2 à 4 à partir de ces oligosaccharides insolubles au moyen d'une endoglucanase. L'hydrolyse enzymatique permet de contrôler la taille des cellodextrines produites et de limiter le nombre d'espèces dans le mélange, ce qui contribue largement à faciliter leur purification.

Le procédé de production permet d'obtenir de bons rendements globaux en cellodextrines hydrosolubles puisque la combinaison des deux étapes a converti la cellulose en cellodextrines de DP 1 à 4 avec des rendements moyens de 15% et 16% en cellotriose et cellotétraose respectivement.

Les travaux ont permis de mettre en évidence le rôle déterminant de la cristallinité de la cellulose et de la taille des chaînes. L'étape de préfragmentation reste à optimiser pour obtenir des oligosaccharides aux propriétés cristallines homogènes afin d'améliorer les rendements enzymatiques. Afin d'optimiser le procédé, il serait intéressant de combiner les hydrolyses en une réaction "one pot" par catalyse hétérogène suivie directement après précipitation des oligosaccharides par l'hydrolyse enzymatique. Cela pourrait permettre de diminuer la formation des oligosaccharides non-hydrolysables par l'enzyme. Pour des raisons pratiques, il est envisageable pour cela de réaliser l'hydrolyse avec un acide supporté magnétisé afin de l'extraire plus facilement du milieu réactionnel pour ensuite performer l'hydrolyse enzymatique. Le développement de liquides ioniques plus compatibles avec l'utilisation des enzymes pourraient également constituer une optimisation intéressante. Les liquides ioniques dérivés de la biomasse ou à base de choline^[165, 166] pourraient être une option à développer.

Le procédé de production de cellodextrines à partir WSCA permet d'isoler des cellodextrines de tailles ciblées entre DP 2 et 5 de manière rapide et sélective. La réaction d'hydrolyse catalysée par l'endoglucanase Carezyme permet l'obtention de très bons rendements en cellodextrines solubles (15% en cellotriose, 16% en cellotétraose et 17% en cellopentaose pour une hydrolyse de 2,5 heures avec WSCA DS 0,8). En effet, l'endoglucanase utilisée a montré une très bonne activité sur la WSCA, bien que ce substrat ne soit pas son substrat naturel. Les travaux ont permis de mettre en évidence que le degré de substitution de WSCA influence le taux de conversion global en cellodextrines, mais en revanche influence peu la distribution des espèces formées. Les

rendements en cellodextrines sur la globalité du procédé sont toutefois très comparables entre les différents DS. La solubilité du substrat permet à l'enzyme d'être efficace et a permis l'obtention de cellopentaose avec de très bons rendements, en comparaison avec la méthode d'hydrolyse en deux étapes précédentes qui permet surtout l'obtention de celotriose et de celotétraose. La conversion de la WSCA est surtout limitée par la présence des groupements acétate et donc par le DS, qui rend le substrat récalcitrant à l'activité enzymatique.

Ce travail a permis de surmonter la propriété d'insolubilité de la cellulose qui constitue une barrière importante vers l'exploitation de la biomasse et notamment vers la production de cellodextrines. La méthode est optimisable, car la distribution des groupements acétate étant aléatoire, les rendements peuvent varier suivant les substrats pour un même DS, mais également suivant l'enzyme utilisée. Il est envisageable de penser qu'en maîtrisant l'homogénéité de la substitution en acétate le long de la chaîne, les taux de conversion seront améliorés. Afin d'y parvenir et au vu de la littérature, les liquides ioniques semblent indiqués pour réaliser l'acétylation partielle homogène de cellulose ou la désacétylation de la cellulose triacétate.

Les deux procédés développés dans ce travail permettent l'obtention rapide et contrôlée de celotriose et de celotétraose avec des rendements moyens de 15%, ainsi que de cellopentaose avec le même ordre de rendement par la méthode d'hydrolyse de WSCA. Ces méthodologies d'hydrolyse présentent l'avantage d'être modifiables pour l'obtention d'oligosaccharides de tailles différentes suivant l'enzyme utilisée. De plus ils sont potentiellement applicables à d'autres polysaccharides, comme la chitine.

Chapitre 3 :

Synthèse d' analogues de
Lipo-Chitooligosaccharides
à squelette cellodextrine

Chapitre 3 : Synthèse d'analogues de Lipo-Chitooligosaccharides à squelette cellodextrine **147**

I. Les lipo-chitooligosaccharides **147**

I.1. Généralités	147
I.2. Structure des LCO	149
I.3. Activité des LCO	150
I.3.1. Facteurs de nodulation	152
I.3.2. Facteurs de mycorhization	154
I.3.3. Perception et reconnaissance des LCO	155
I.4. Synthèse de LCO	156
I.4.1. Dépolymérisation chimique et chimio-enzymatique de la chitine	156
I.4.2. Synthèse chimique	156
I.4.3. Synthèse biotechnologique	158
I.4.3.1. Synthèse par les glycosyl-transférases	158
I.4.3.2. Synthèse par "bacterial coupling"	159
I.4.3.3. Synthèse par l'usine cellulaire	160
I.4.4. Synthèse d'analogues de LCO	161

II. Synthèse d'analogues de LCO à squelette cellodextrine **164**

II.1. Stratégies de synthèse du squelette saccharidique	164
II.2. Synthèse du squelette saccharidique à l'aide de cellulases	166
II.2.1. Synthèse du squelette par une glycosynthase	166
II.2.1.1. Synthèse du disaccharide α -fluorure	168
II.2.1.1.a. Synthèse du donneur de glycosylation	170
II.2.1.1.b. Synthèse des accepteurs de glycosylation	171
II.2.1.1.c. Réaction de glycosylation	174
II.2.1.1.d. Préparation de l' α -fluorure de disaccharide	175
II.2.1.2. Glycosylation du disaccharide GlcNHTroc- β (1-4)-Glc- α F (14) sur le cellotriose	179
II.2.1.3. Synthèse du disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- α F	182
II.2.1.4. Glycosylation du disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- α F sur le cellotriose	185
II.2.2. Synthèse du squelette par une cellulase sauvage	187

II.2.2.1.	Synthèse du disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F	188
II.2.2.2.	Transglycosylation du disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F sur le cellobiose	190
II.3.	Synthèse du squelette par la β-N-acétyl-hexosaminidase d'<i>Aspergillus oryzae</i>	196
II.3.1.	Transglycosylations catalysées par une β -N-acétyl-hexosaminidase	196
II.3.2.	Transglycosylation d'une unité GlcNHAc sur une cellodextrine par la β -N-acétyl-hexosaminidase d' <i>A.oryzae</i>	198
II.4.	Synthèse du squelette avec du lysozyme	201
II.4.1.	Synthèse d'un disaccharide GlcNHAc- Glc- β -SPh avec du lysozyme	202
II.4.2.	Synthèse du tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc) ₃ avec du lysozyme	208
II.5.	Acylation du squelette saccharidique pour la synthèse de l'analogue de LCO	211
II.5.1.	Déprotection de l'unité N-acétylglucosamine du squelette saccharidique	212
II.5.2.	Acylation du tétrasaccharide GlcNH ₂ -(Glc) ₃	214
II.5.2.1.	Acylation du tétrasaccharide GlcNH ₂ -(Glc) ₃ par l'agent activant guanidinium	217
II.5.2.2.	Acylation du tétrasaccharide GlcNH ₂ -(Glc) ₃ par l'agent activant DMTMM-BF ₄	218
III.	<u>Conclusion et perspectives</u>	221

Chapitre 3 : Synthèse d'analogues de Lipo-Chitooligosaccharides à squelette cellodextrine

Les cellodextrines sont des biomolécules dotées de propriétés biologiques intéressantes, elles présentent en outre des intérêts en tant que bloc saccharidique pour la synthèse de composés à valeur ajoutée. Au laboratoire, l'équipe s'est notamment intéressée à la fonctionnalisation de cellodextrines pour la synthèse de sondes et d'inhibiteurs destinés à l'étude des cellulases ^[33, 34, 167, 168]. Dans ce travail, nous nous sommes engagés dans la synthèse d'analogues de lipo-chitooligosaccharides qui sont des biomolécules naturelles possédant une activité de fertilisant chez les plantes. Les résultats ci-après portent sur la synthèse multi-approches d'analogues de ces biomolécules, différant des molécules originales par la nature du squelette saccharidique qui est ici composé de cellodextrines.

I. Les lipo-chitooligosaccharides

I.1. Généralités

Le système racinaire est un lieu stratégique pour le processus de croissance et de nutrition des plantes. L'environnement du sol proche des racines de la plante, la rhizosphère, est le lieu où se réalisent les échanges nutritifs entre le sol et la plante. C'est également le lieu d'échanges entre certains micro-organismes présents et leur hôte. La rhizosphère reçoit de nombreuses molécules exsudées par les racines de la plante et peut ainsi compter jusqu'à plus de 10^5 molécules de bas poids moléculaires^[35]. Ces molécules comprennent des sucres, des acides aromatiques, aliphatiques et organiques, des acides gras, des enzymes, des protéines, des régulateurs de croissance et des métabolites secondaires. Ce phénomène d'émission de molécules est appelé la rhizodéposition, et celle-ci est responsable de la diversité de la communauté des micro-organismes présents dans la rhizosphère (Figure 60).

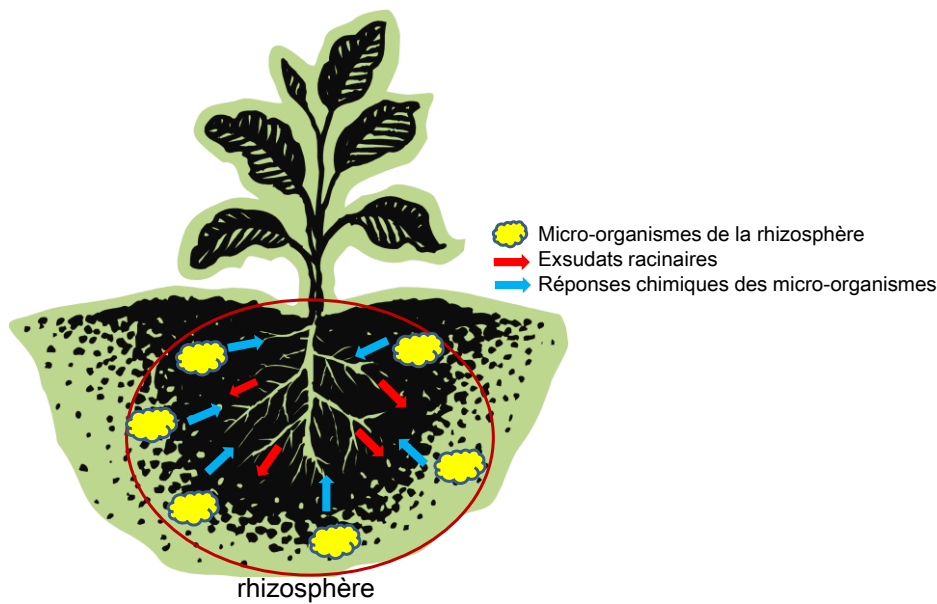


Figure 60 : Représentation schématique de la rhizosphère de la plante

Cette richesse permet notamment à la plante de vivre et croître *via* une multitude de mécanismes directs et indirects. L'exsudation d'acides organiques constitue un exemple d'interaction directe, qui permet à la plante d'assimiler le phosphore par la transformation des composés phosphatés naturellement présents^[169, 170]. Les réactions indirectes sont plus complexes. Ces dernières dépendent en effet de la diversité et de la spécificité des organismes présents dans la rhizosphère. Leur présence au sein de la zone racinaire est liée à la nature du sol ainsi qu'aux caractéristiques de la plante. Ces interactions sont le fruit d'un dialogue chimique spécifique entre l'organisme et la plante, résultant en le déclenchement de mécanismes réactionnels chez chacun. Dans le cas où cette communication déclenche des réactions bénéfiques, il s'agit d'échanges mutualistes. Une symbiose entre la plante et le micro-organisme s'établit alors, où chacun tire profit de cette association symbiotique. Dans le cas contraire où ce dialogue chimique est nuisible à l'une des parties, les échanges sont dits "de compétition" ou parasitaires.

Les lipo-chitooligosaccharides (LCO) sont des biomolécules signal impliquées dans l'association symbiotique de certains de ces micro-organismes avec les plantes. Depuis la première description de l'activité de ces LCO sur certaines légumineuses par Lerouge *et al.* en 1990^[171], l'intérêt pour cette famille de molécules ne cesse de croître. Les LCO se distinguent en deux catégories suivant le micro-organisme dont ils sont issus.

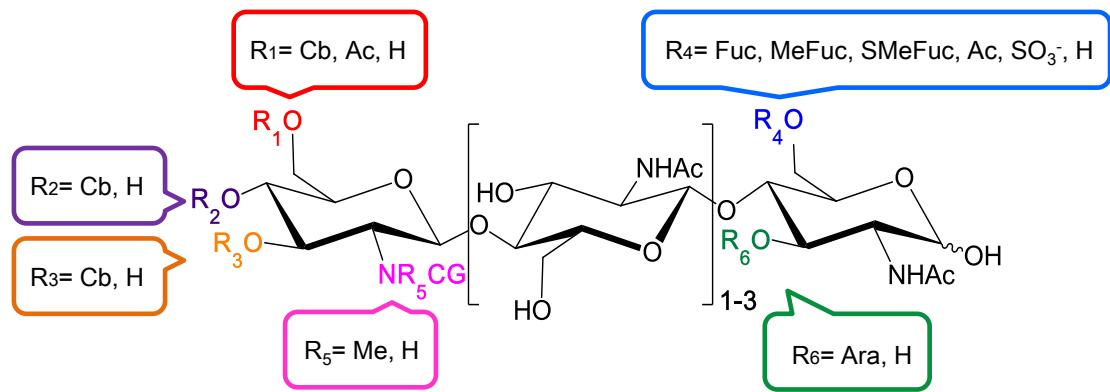
- Les facteurs de nodulation sont des molécules signal produites par les bactéries du sol de la famille des *Rhizobia*^[171]. La symbiose rhizobienne induit la formation de nodules racinaires chez les légumineuses au sein desquels l'azote atmosphérique est transformé en ammoniac. L'assimilation de l'azote par la plante sous la forme ammoniac est essentielle pour sa phase de croissance.

- La seconde famille de LCO provient de champignons *Glomeromycota* et a été identifiée très récemment par Maillet et al.^[172] en 2011. De manière similaire aux bactéries, ces champignons favorisent l'établissement d'interactions avec la plante. Les LCO produits appelés facteurs de mycorhization induisent une endomycorhization arbusculaire. Cette dernière permet à 80% des plantes d'améliorer leurs apports en eau et en nutriments du sol par le développement de leurs racines secondaires. En retour, jusqu'à 20% du carbone fixé par la plante sont délivrés au champignon^[173].

Les symbioses micro-organismes/plante sont très anciennes ; elles sont apparues il y a 58 millions d'années pour la nodulation^[174] et il y a plus de 400 millions d'années pour la mycorhization arbusculaire^[175]. La mycorhization arbusculaire est la symbiose micro-organisme/plante la plus répandue sur Terre puisqu'elle concerne la grande majorité des végétaux. Les LCO et leurs structures spécifiques jouent un rôle important dans ce dialogue chimique entre la plante et son hôte.

I.2. Structure des LCO

Les LCO sont composés majoritairement d'un squelette saccharidique de 3 à 6 unités de *N*-acétylglucosamine dont l'extrémité non réductrice est *N*-acylée. Suivant la souche du micro-organisme, d'autres fonctionnalités peuvent être apportées à la chaîne pouvant induire ainsi une spécificité de l'hôte^[176]. De plus la nature de la chaîne grasse portée par le squelette est variable. Elle peut comprendre des longueurs de chaînes de 16 à 22 carbones et 0 à 4 insaturations pour les facteurs de nodulation^[177].



CG (chaîne grasse)

Cb (Carbamoyle), Ac (Acétyle), Ara (Arabinosyle),
 Me (Méthyle), Fuc (Fucosyle), MeFuc (méthylfucosyle),
 SMeFuc (Méthylfucosyle sulfaté), AcFuc (Fucosyle acétylé),
 AcMeFuc (Méthylfucosyle acétylé), S (Sulfate), H (Hydrogène)

C16:0, C16:1, C16:2, C16:3
 C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C18:4
 C20:0, C20:1, C20:2, C20:3, C20:4
 C22:1

Figure 61 : Structure générale des LCO, adapté de Cullimore *et al.*^[178]

Les fonctionnalités portées par le squelette saccharidique le plus souvent retrouvées sont les groupements acétate en R₁, ainsi que les groupements fucosyle, acétate et sulfate en R₄. D'haeze *et al.* ont passé en revue les principales structures de facteurs de nodulation. Près d'une quarantaine de souches bactériennes sont ainsi répertoriées, rapportant également l'activité biologique des LCO qu'elles produisent^[179].

La gamme des facteurs de nodulation connus est plus large que celle des facteurs de mycorhization identifiés très récemment. Les facteurs de nodulation et de mycorhization présentent des structures chimiques similaires et diffèrent surtout par la nature des groupements portés par le squelette saccharidique. L'une de ces différences réside dans la nature de leur chaîne grasse.

Cependant, en l'état des connaissances actuelles, les facteurs de nodulation et de mycorhization possèdent en commun la chaîne grasse C16:0 (acide palmitique)

I.3. Activité des LCO

Bien qu'ils aient des structures chimiques proches, les facteurs de nodulation et de mycorhization ne possèdent pas la même activité sur la plante. Les molécules signal induisent des processus à vocations distinctes.

La symbiose rhizobienne est initiée par des flavonoïdes synthétisés par les légumineuses, qui déclenchent en retour chez la bactérie la production de LCO. Il se produit alors une cascade de mécanismes de réponse engendrant la formation de nodules racinaires.

La symbiose endomycorhizienne fonctionne de manière comparable. La plante synthétise des molécules de la famille des strigolactones, qui amorcent la formation de LCO chez le champignon. La plante déclenche alors des mécanismes réactionnels entraînant la formation et la croissance de racines secondaires permettant l'assimilation de l'eau et des nutriments dont elle a besoin.

Les processus impliqués dans la symbiose sont représentés en Figure 62 :

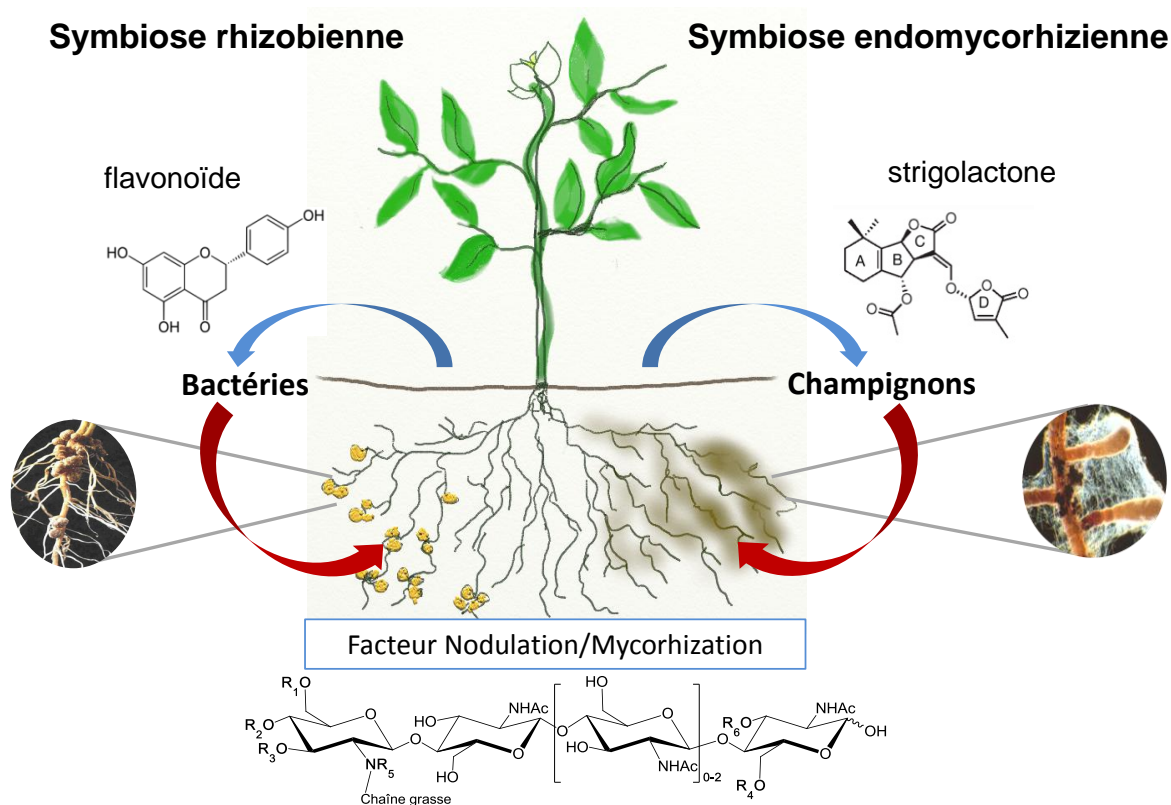


Figure 62 : Représentation schématique des symbioses rhizobienne et endomycorhizienne

I.3.1. Facteurs de nodulation

La synthèse de LCO chez la bactérie est un processus complexe, déclenché par l'exsudation racinaire de composés de la famille des flavonoïdes. Ces molécules sont reconnues par la protéine de régulation NodD de la bactérie induisant la synthèse de facteurs de nodulation. Cette synthèse est réalisable grâce à l'expression des gènes de nodulation *nodABC* présents chez toutes les nod-bactéries *Rhizobia*^[180]. La protéine NodC présente la fonction de chito-oligosaccharide synthase, NodB de chitine-désacétylase et NodA d'acyltransférase. Les autres fonctionnalités des LCO sont apportées par l'expression d'autres gènes *nodEFGHL*. Par exemple, le gène *nodH* permet l'expression de la sulfotransférase NodH, nécessaire pour apporter le groupement sulfate au squelette^[181] ou l'expression du gène *nodL* pour la O-acétyltransférase NodL. En retour, la perception de ces facteurs de nodulation par la plante déclenche plusieurs réponses symbiotiques concomitantes au sein des racines de la plante. Ces réponses interviennent au niveau de l'épiderme et au niveau du cortex. Elles comprennent par exemple des variations de concentrations de Ca²⁺ au sein des cellules épidermiques menant à l'invasion bactérienne. Elles impliquent également des déformations racinaires de type division cellulaire au sein du cortex, provoquant la formation de nodules^[182] (Figure 63).

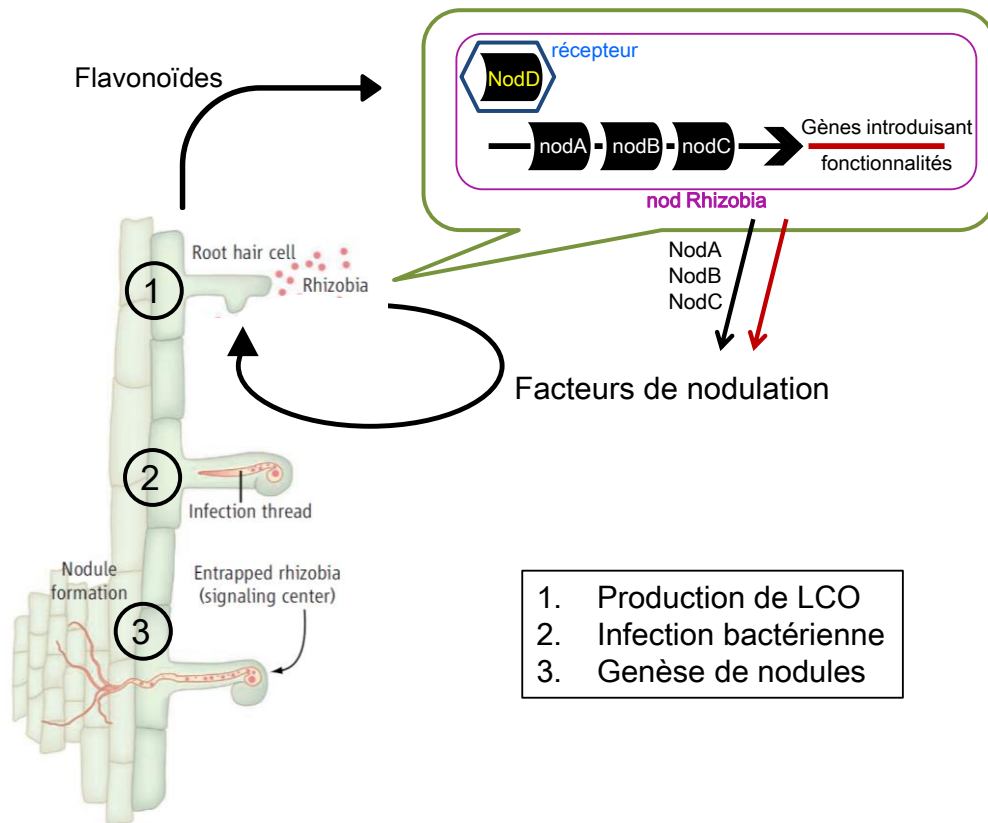


Figure 63 : Représentation schématique du mécanisme de formation de nodules racinaires, adapté de J.A.Downie^[183]

La nodulation implique la progression simultanée de l'invasion bactérienne et du développement des nodules. Pour cela, des mécanismes de division cellulaires des cellules du cortex interviennent dès les premières étapes de la symbiose^[184], comme schématisé sur la Figure 64 :

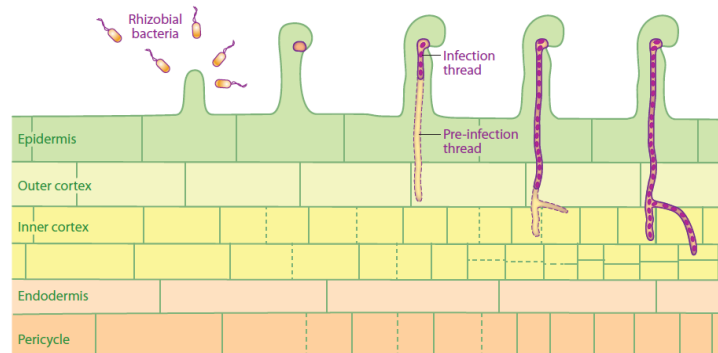


Figure 64 : Représentation schématique du développement des nodules chez les légumineuses, d'après Oldroyd et al.^[184]

I.3.2. Facteurs de mycorhization

Dans la symbiose endomycorhizienne, la plante produit des molécules de la famille des strigolactones qui induisent chez le champignon, la germination de spores et le développement d'hyphes, ainsi qu'une croissance de son activité physiologique. Le mécanisme de mycorhization est représenté sur la Figure 65 :

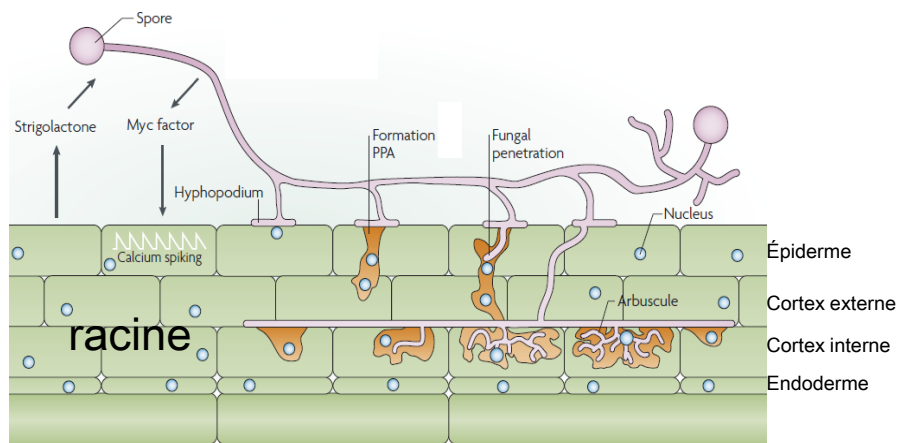
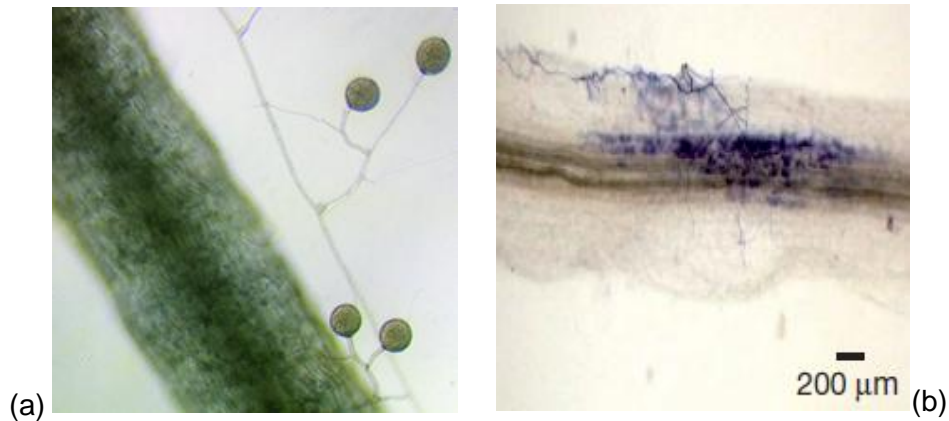


Figure 65 : Représentation schématique du mécanisme de mycorhization, adapté de Parniske^[175]

En réponse aux strigolactones, le champignon produit des facteurs de mycorhization qui induisent des oscillations en Ca^{2+} dans l'épiderme des cellules de la plante qui activent les gènes de la symbiose^[185]. Le champignon développe alors une connexion avec l'épiderme de la plante appelée hypophode qui par stimulation de la plante lui permet de développer un appareil de pré-pénétration (PPA) de l'épiderme. Le champignon développe alors ses hyphes grâce au PPA jusqu'au cortex de la racine, où il peut se brancher et développer des racines latérales à partir de la racine principale. Au sein de son branchement sur la racine principale, le champignon développe alors son réseau arbusculaire. Il s'agit d'un phénomène d'endomycorhization car le champignon pénètre au sein de la racine. La formation des racines latérales permet à la plante d'améliorer ses capacités d'assimilation de l'eau et des nutriments.



(a) Photo de spores d'intraradicelles de *Glomus* lors de la phase de pré-infection de la plante, crédit photo A. Haouy (b) Photo d'intraradicelles de *Medicago Truncatula*, Maillet *et al.*^[172]

Figure 66 : Photos de formation de racines secondaires par mycorhization

Sur la photo (a), les spores de champignon, sphériques, présents lors de l'étape de pré-infection sont très distinguables. La photo (b) illustre le développement au sein de la racine des radicelles de champignon colorées ici en violet.

I.3.3. Perception et reconnaissance des LCO

Le dialogue symbiotique entre les plantes et les micro-organismes du sol passe dans un premier temps par la reconnaissance mutuelle des signaux produits. L'arborisation mycorhizienne racinaire et la symbiose *Rhizobia*-légumineuses ne se réalisent qu'une fois ce dialogue instauré, impliquant la présence de récepteurs dédiés à la reconnaissance de LCO. Les mécanismes d'interaction et de perception ne sont pas intégralement connus à ce jour, et cela est d'autant plus vrai pour les facteurs de mycorhization très récemment découverts. Gough et Cullimore ont établi en 2011 que les molécules signal LCO sont perçues par l'intermédiaire de récepteurs kinases à motif lysine (LysM) communs permettant l'activation de la symbiose pour l'arborisation mycorhizienne, et l'endosymbiose nodulaire bactérienne^[186].

Les LCO sont des molécules très actives puisqu'elles présentent une activité à des concentrations nanomolaires^[178, 187]. Les LCO sont impliqués dans les mécanismes de développement et de survie de la plante. Ces molécules naturelles constituent une alternative douce pour apporter les éléments nutritifs nécessaires au développement du végétal. Ils sont d'ailleurs d'ores et déjà intégrés dans certaines formulations d'engrais

commerciaux, comme Optimize® et LCO Promoter Technology® de chez Novozymes sous la forme d'extraits bactériens. Produits naturellement, ces molécules ne sont toutefois isolables que sous forme de mélanges et en quantités analytiques. L'obtention de molécules pures représente donc un enjeu essentiel afin de comprendre les différents types d'interactions en jeu dans l'établissement de ces associations symbiotiques. Une meilleure compréhension des mécanismes et de l'influence des composants structuraux de ces molécules pourra permettre de mieux maîtriser la symbiose. Cela pourrait ainsi conduire au développement d'une agriculture plus respectueuse de l'environnement.

I.4. Synthèse de LCO

I.4.1. Dépolymérisation chimique et chimio-enzymatique de la chitine

L'obtention d'oligomères de chitine, polymère composé d'unités β -D-N-acétylglucosamine liées en $\beta(1,4)$ est délicate de par ses caractéristiques physico-chimiques particulières. Ses propriétés telles que son insolubilité dans l'eau et sa faible réactivité sont du même ordre que celles de la cellulose. Les procédés chimiques et enzymatiques actuels ne permettent pas de contrôler l'hydrolyse et génèrent des mélanges de chito-oligosaccharides, rendant leur purification fastidieuse (Aam, #431; Bosso, 1986 #302; Rupley, 1964 #305). La N-désacétylation de l'unité non-réductrice par voie enzymatique est peu courante car elle nécessite l'utilisation de chitine-désacétylases, qui sont peu disponibles. Une alternative consiste à construire le squelette saccharidique par blocs.

I.4.2. Synthèse chimique

La synthèse de LCO représente un challenge au vu de la régio- et stéréosélectivité de la structure et de la variété de ses groupements fonctionnels. La conduite d'une réaction chimique sur une position ciblée requiert de multiples étapes de protection/déprotection des autres positions n'entrant pas en jeu dans la réaction. Pour exemples, en 1992 Nicolaou *et al.* ont décrit la première synthèse totale de facteurs de nodulation de *Rhizobium meliloti* ^[191]. Ces molécules ont été produites par l'assemblage des quatre unités constitutives, à partir de trois synthons de départ activés par un fluorure (Figure 67).

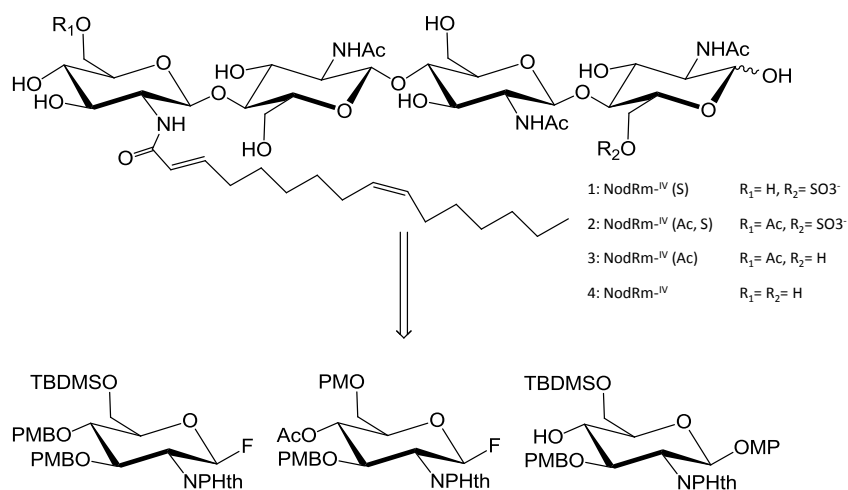


Figure 67 : Rétrosynthèse pour l'obtention de facteurs de nodulation de *Rhizobium meliloti*, d'après Nicolaou *et al.*^[191]

Cette synthèse a nécessité 16 étapes, et a permis d'obtenir les facteurs de nodulation avec un rendement de 0,8%. En 1993, Wang *et al.* ont décrit la synthèse totale d'un de ces mêmes LCO sulfaté de *Rhizobium meliloti* de luzerne (NodRm-IV(S)) avec une approche différente en 17 étapes pour un rendement global de 0,7%^[192]. De même en 1994, Tailler *et al.* ont reporté la synthèse totale par voie chimique de NodRm^{IV}(S) ainsi que de deux analogues. Leur approche diffère des précédentes synthèses par l'assemblage des blocs glycosidiques réalisé par la glycosylation itérative d'un accepteur 1,6-anhydroglucose, par une méthode de couplage impliquant l'activation du donneur de glycosylation par un groupement imidate.

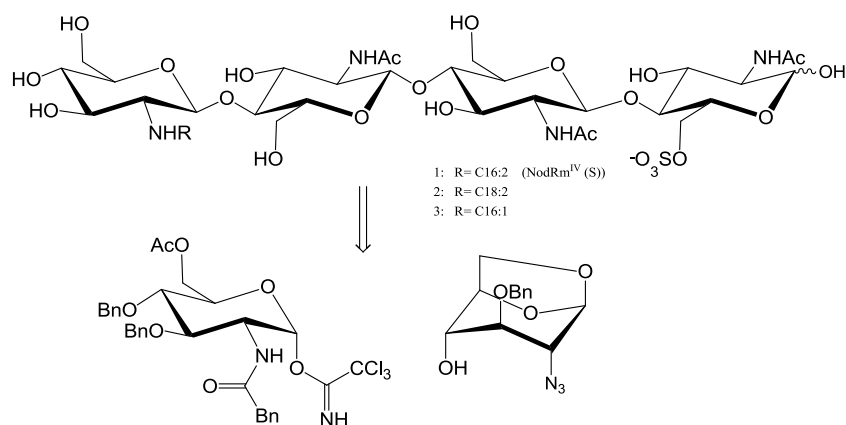


Figure 68 : Rétrosynthèse pour l'obtention de facteur de nodulation de *Rhizobium meliloti* et de deux analogues, d'après Tailler *et al.*^[193]

Le facteur de nodulation NodRm^{IV} (S) a ainsi pu être synthétisé avec un rendement de 8%^[193] nettement supérieur aux précédentes synthèses.

Ces synthèses totales sont longues et impliquent de nombreuses étapes et sont de ce fait caractérisées par des rendements totaux assez voire très faibles. Bien que les quantités nécessaires pour observer l'activité biologique des LCO soient très faibles, les méthodes chimiques n'apparaissent pas adaptées à une production à de plus grandes échelles. D'autres stratégies mettant en œuvre des procédés biotechnologiques plus sélectifs permettent de réaliser la synthèse de LCO de manière plus efficace.

I.4.3. Synthèse biotechnologique

Les méthodes biotechnologiques de préparation d'oligosaccharides sont une alternative avantageuse, car elles reposent sur la spécificité des enzymes, ce qui permet de s'affranchir des étapes de protection/déprotection des glycosides.

I.4.3.1. Synthèse par les glycosyl-transférases

Les glycosyl-transférases de Leloir constituent un outil de choix pour la synthèse d'oligosaccharides. Par exemple, Atkinson *et al.* ont décrit la synthèse d'un squelette saccharidique de LCO par transfert d'un résidu glucosamine en position 4 d'un

chitotriose^[194]. Ce transfert est réalisé par une $\beta(1,4)$ -galactosyl-transférase bovine à partir d'UDP-glucosamine, comme représenté sur le Schéma 4 :

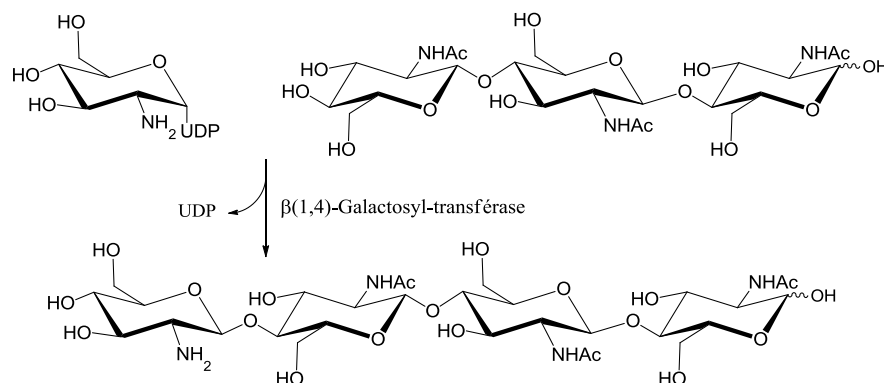


Schéma 4 : Synthèse d'un squelette tétrasaccharidique de LCO par une $\beta(1,4)$ -galactosyl-transférase, d'après Atkinson *et al.*^[194]

Lors du transfert, l'enzyme libère une molécule d'UDP provenant de l'UDP-glucosamine. Ce squelette tétrasaccharidique peut ensuite être fonctionnalisé et acylé pour produire des LCO. Bien qu'efficace, l'utilisation des glycosyl-transférases est limitée par la difficulté à synthétiser le donneur de départ UDP-glycoside, entraînant notamment un coût de synthèse important. De plus, le nucléoside libéré lors du transfert inhibe l'activité de la glycosyl-transférase. Une alternative consiste à mimer les voies biologiques naturelles et de recycler ou de dégrader le nucléoside. Le recyclage permet en outre d'améliorer la productivité et les rendements en glycosylation.

I.4.3.2. Synthèse par "bacterial coupling"

Dans ce contexte, Koizumi *et al.* ont développé le procédé de "bacterial coupling", par lequel les oligosaccharides sont produits par culture d'*E.coli* recombinante exprimant les gènes de glycosyl-transférases (Figure 69). Les membranes des bactéries sont rendues perméables et ainsi les réactifs et produits peuvent pénétrer et sortir des cellules. Un procédé de recyclage *in situ* des nucléotides sucres permet l'obtention des oligosaccharides avec de très bons rendements^[195, 196].

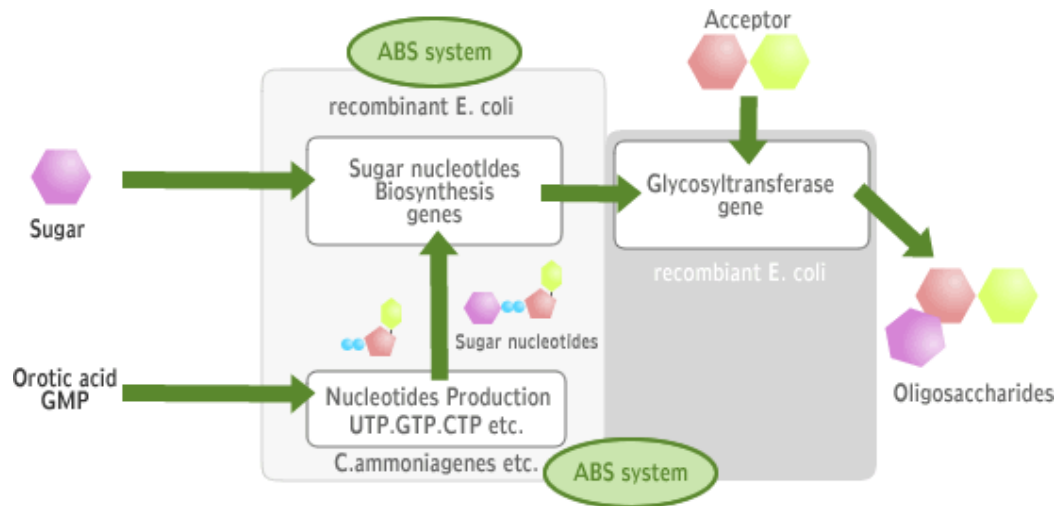


Figure 69 : Biosynthèse artificielle de sucre (Système ABS : Artificial biosynthesis of sugar), d'après Koizumi et al. (Kyowa Hakko Bio Co. Ltd)

Ces synthèses sont avantageuses, mais à ce jour elles ne sont que peu utilisées pour produire des oligomères de chitine ou des cellodextrines.

I.4.3.3. Synthèse par l'usine cellulaire

Samain *et al.* ont développé au CERMAV la synthèse biotechnologique de chitooligosaccharides ainsi que de squelettes saccharidiques de LCO par le procédé de l'usine cellulaire. Cette méthode emploie la culture à haute densité d'*Escherichia coli* recombinantes coexprimant les gènes *nodC* et *nodB* d'*Azorhizobium caulinodans*^[197] pour produire des oligosaccharides dans les cellules en croissance.

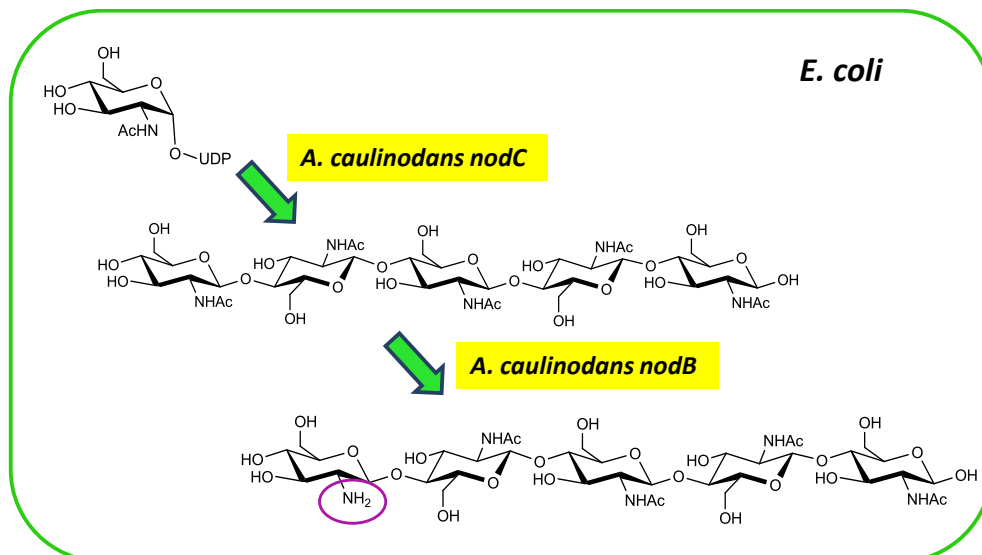


Schéma 5 : Synthèse de précurseurs de LCO par l'usine cellulaire

En utilisant l'UDP-*N*-acétyl-glucosamine endogène comme donneur, la bactérie modifiée possède la capacité de réaliser l'élongation de la chaîne en chitopentasaccharide grâce à l'expression de NodC. Ensuite, NodB permet de catalyser la *N*-désacétylation de l'unité non-réductrice pour produire le tétra-*N,N^I,N^{II},N^V*-acétyl-chitopentaose. Ainsi après purification, des rendements en penta-*N*-acétyl-chitopentaose et en précurseur de LCO tétra-*N,N^I,N^{II},N^V*-acétyl-chitopentaose respectivement de 2,1g et 0,55g par litre de culture ont été obtenus. Par le même procédé, les tétramères ont été produits en exprimant les gènes *nodC* de *Rhizobium meliloti* à la place d'*A. caulinodans*^[198].

Afin de synthétiser le LCO, l'acylation du squelette saccharidique est ensuite réalisée par synthèse chimique^[199].

I.4.4. Synthèse d'analogues de LCO

Le mode d'action des LCO et notamment les rôles joués par les différents groupements chimiques ne sont pas encore intégralement connus. Afin d'élucider ces mécanismes, l'utilisation d'analogues possédant une modification structurale par rapport aux LCO originaux permet de déterminer l'importance de cette même fonctionnalité. Pour exemples parmi les analogues, Grenouillat *et al.* ont décrit en 2004 la synthèse de dérivés portant un motif aromatique sur la chaîne grasse^[200] à la place d'une

insaturation. Malgré la présence du groupement benzamide, cet analogue a montré une activité de nodulation. En 1996, Bec-Ferté *et al.* ont décrit un LCO produit par *Rhizobium fredii* comportant une molécule de glucose à la place d'une unité *N*-acétylglucosamine au centre de la chaîne saccharidique^[201] (Figure 70).

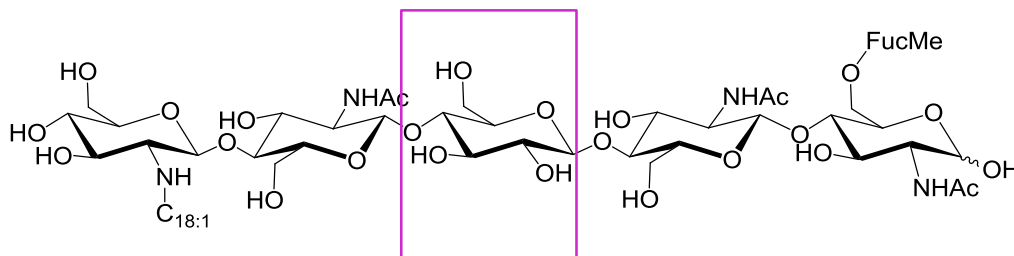


Figure 70 : LCO produit par *Rhizobium fredii* portant une unité glucose au centre de la chaîne saccharidique^[201]

Ce résultat a permis d'envisager la synthèse d'analogues de LCO portant des unités saccharidiques différentes des *N*-acétylglucosamine au sein du squelette saccharidique.

Dans ce contexte, Robina *et al.* ont synthétisé deux analogues de chito-oligosaccharides (représentés en Figure 71) portant une ou deux unités glucose^[202, 203].

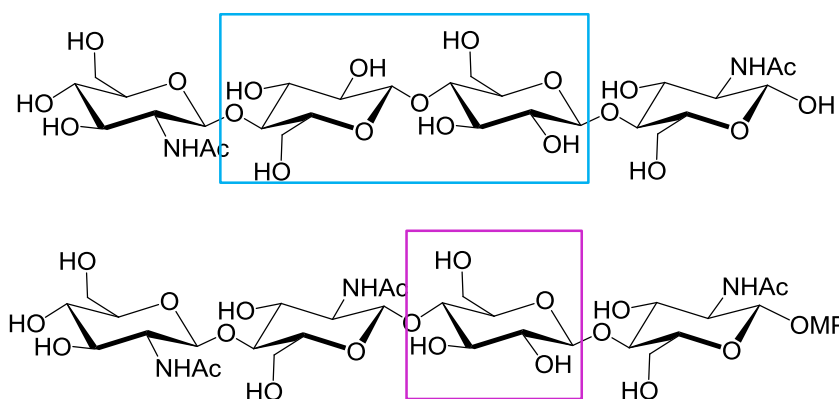


Figure 71 : Analogues de chito-oligosaccharides synthétisés par Robina *et al.*^[202]

L'analogue portant une unique unité glucose a été synthétisé par couplages chimiques selon le schéma rétrosynthétique représenté en Figure 72 :

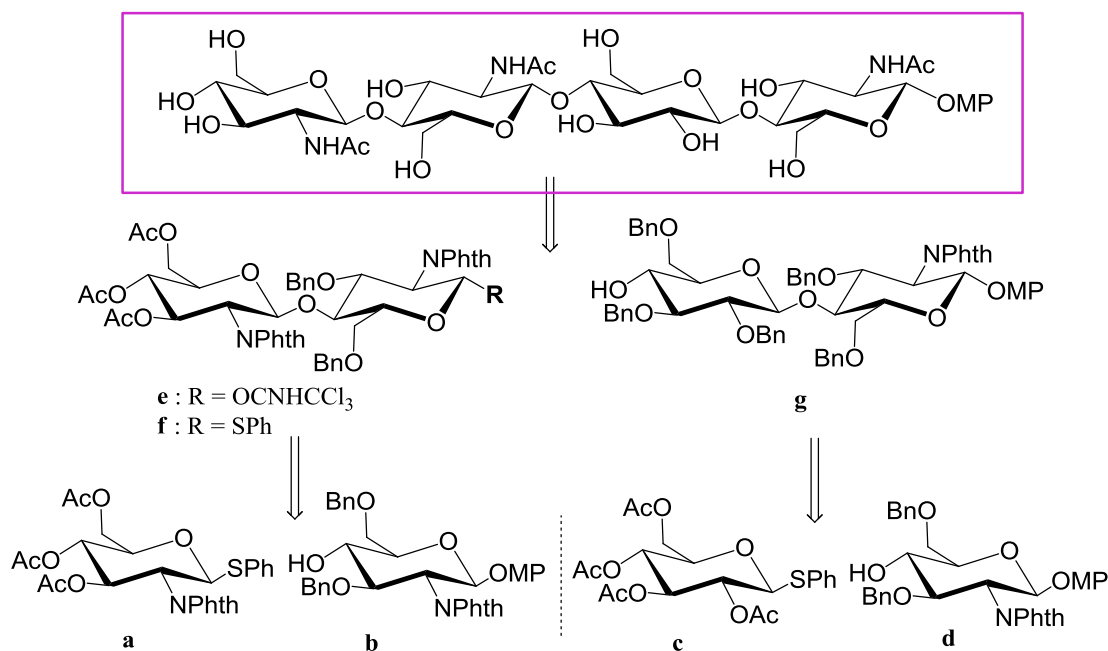


Figure 72 : Schéma rétrosynthétique pour l'obtention d'un analogue de chito-oligosaccharide, d'après Robina et al.^[202]

Des tests biologiques permettant de détecter le déclenchement du chimio-tropisme des racines nécessaire à la nodulation ont été réalisés sur ces deux molécules^[204]. Le composé contenant deux unités glucosidiques n'a pas présenté de réponse positive. En revanche le composé contenant une unité glucosidique a montré une activité comparable à un standard de tétramère de chitine. Cela démontre l'influence de la composition du squelette saccharidique sur l'activité biologique de la molécule, et cela permet d'envisager d'autres structures de LCO pouvant avoir une activité biologique.

A notre connaissance, il n'existe pas d'exemples à ce jour de LCO dont le squelette serait composé d'unités de glucose. A la vue de ces résultats et puisque les cellodextrines possèdent naturellement une activité élicitrice^[205], il est légitime de supposer que de telles molécules puissent être biologiquement actives.

II. Synthèse d'analogues de LCO à squelette cellodextrine

Les mécanismes de reconnaissance des LCO par les plantes ne sont pas tous élucidés. Ainsi, le rôle de chaque fonction de la molécule sur son activité biologique reste à définir.

Dans ce contexte, nous avons cherché à développer de nouvelles molécules analogues des LCO possédant un squelette saccharidique composé exclusivement d'unités de glucose à l'exception de l'unité à l'extrémité non-réductrice. Afin de produire ces molécules, nous avons envisagé plusieurs voies de synthèse. Pour cela, nous avons privilégié des approches chimio-enzymatiques ou enzymatiques.

Le principal avantage d'utiliser les enzymes par rapport aux réactifs chimiques réside dans leur régiosélectivité. Les enzymes permettent de travailler dans des conditions douces, et surtout avec des mono- ou oligosaccharides non protégés permettant ainsi de s'affranchir de multiples étapes de protection/déprotection. Une fois le squelette saccharidique synthétisé, la chaîne grasse pourra alors être greffée sur celui-ci par une réaction d'acylation chimique.

II.1. Stratégies de synthèse du squelette saccharidique

Dans le but de réaliser la synthèse de squelettes saccharidiques, nous avons élaboré plusieurs stratégies impliquant l'utilisation de glycoside-hydrolases. Cette classe d'enzymes décrite précédemment permet la réalisation de réactions de glycosylation. Afin de synthétiser les squelettes d'analogues de LCO ciblés, il est nécessaire d'utiliser un donneur comportant une unité glucosamine à l'extrémité non-réductrice et un accepteur cellodextrine.

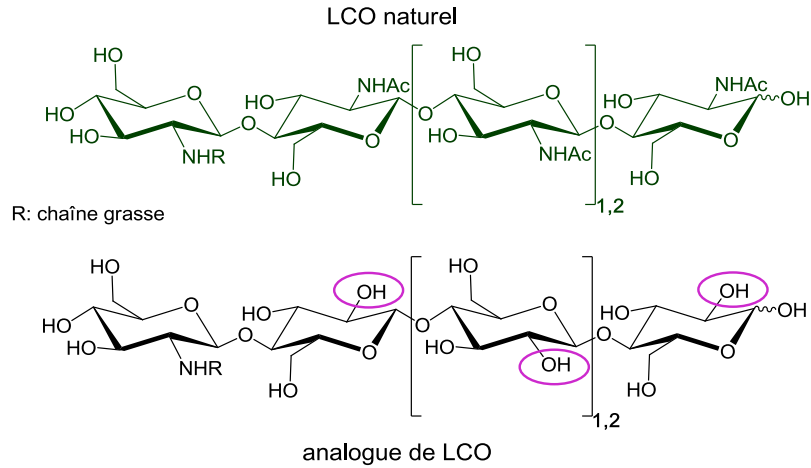


Figure 73 : Structures de LCO naturel et d'analogue à squelette cellodextrine

La première voie de synthèse utilise des cellulases, ce qui requiert un disaccharide possédant une unité réductrice glucose portant un bon groupement partant en position anomère. La seconde voie de synthèse envisagée utilise des β -*N*-acétyl-hexosaminidases comme les "*N*-acétyl-glucosaminidase", ou le lyzozyme de HEW (Hen egg white). Ces enzymes catalysent le transfert d'une *N*-acétylglucosamine à partir de chitobiose (GlcNHAc- β (1-4)-GlcNHAc) ou d'un glucosaminide activé en position anomère par un groupement partant.

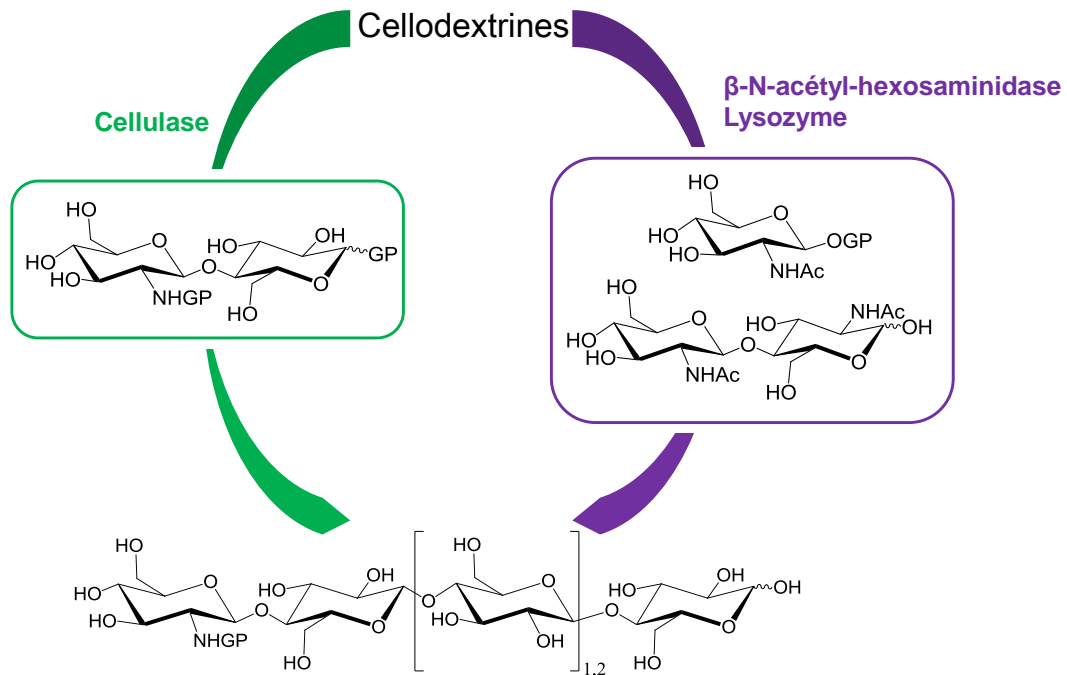


Figure 74 : Stratégies de synthèse enzymatique du squelette saccharidique d'analogue de LCO

Le squelette des molécules cibles sera composé de $\text{GlcNH}_2\text{-(Glc)}_3$. Pour cela, la première approche envisagée consiste à utiliser l'activité de $\beta(1-4)$ transglycosylation de cellulases et nécessite la synthèse d'un donneur disaccharidique $\text{GlcNHR-}\beta(1-4)\text{-Glc}$ activé en position anomère par un fluorure.

II.2. Synthèse du squelette saccharidique à l'aide de cellulases

Les cellulases appartiennent à la classe des glycoside-hydrolases, comme mentionné plus haut et ont pour activité principale la coupure hydrolytique des liaisons osidiques $\beta(1-4)$. Dans certaines conditions les cellulases présentent une activité de transglycosylation permettant la synthèse d'oligosaccharides. Les glycosynthases sont une catégorie particulière de cellulases ayant subi une mutation d'un des acides aminés du site catalytique. Cette mutation engendre une perte totale de leur fonction hydrolytique en faveur de leur fonction de transglycosylation. Cela permet ainsi d'améliorer les rendements en transglycosylation par rapport à une cellulase sauvage. Elles constituent donc des outils performants pour la synthèse d'oligosaccharides.

L'objectif de ce travail consistait dans un premier temps à synthétiser le disaccharide donneur formé d'une unité glucosamine protégée à l'extrémité non-réductrice, et d'un glucose à l'extrémité réductrice. Pour cela, plusieurs outils sont disponibles et permettent d'envisager différentes stratégies. Dans un premier temps, nous avons cherché à produire le squelette d'analogue à l'aide d'une glycosynthase. Les cellulases prennent pour donneur un disaccharide activé en position anomère. Ce groupement est généralement un groupement aryle ou fluorure ^[206, 207], dans ce travail la position anomère sera fonctionnalisée par un fluorure.

II.2.1. Synthèse du squelette par une glycosynthase

Au CERMAV, Fort *et al.* ont développé une glycosynthase issue de la cellulase EG I (Cel7B) d'*Humicola insolens* dont l'acide aminé nucléophile a été remplacé par une alanine. Cette mutation entraîne la délétion totale de son activité hydrolytique au profit exclusif de son activité de transfert. Les donneurs de glycosyle utilisés par cette enzyme sont activés en position anomère par un fluorure en position axiale. La glycosynthase

Cel7B E197A a notamment permis la synthèse *in vitro* d'oligosaccharides de cellulose par le transfert de l'accepteur β -cellobioside de méthyle sur l' α -fluorure de cellobiosyle protégé en position C₄^{II} afin d'éviter la polymérisation^[134]. Cette réaction catalysée par la glycosynthase a permis de produire le β -cellotétraoside de méthyle avec un rendement de 90% (Figure 75).

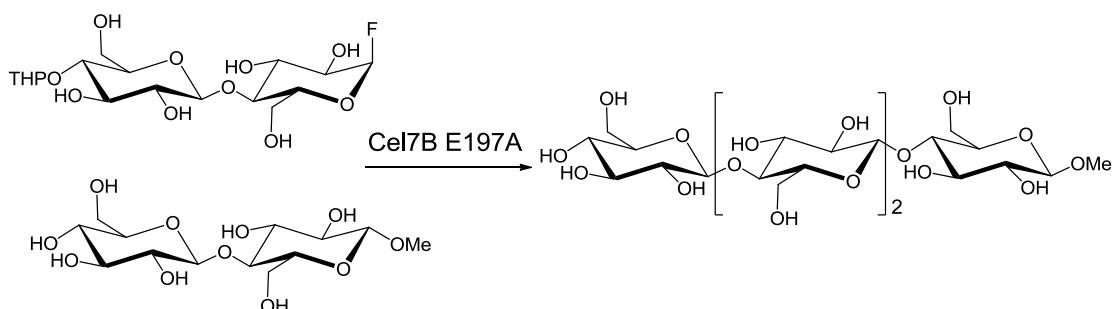


Figure 75 : Réaction de transfert de β -cellobioside de méthyle sur l' α -fluorure de cellobiosyle protégé en C₄^{II} catalysée par Cel7B E197A^[134]

Cette glycosynthase permet donc de catalyser la transglycosylation d' α -fluorure de glycosyle comme le cellobiosyle ou le lactosyle sur des monosaccharides mais aussi sur des oligosaccharides avec de bons rendements^[208-210]. Cette capacité démontre une certaine tolérance de la glycosynthase par rapport à la nature du donneur. Des travaux antérieurs menés au laboratoire lors de la thèse de N. Mantegazza semblaient également indiquer que Cel7B E197A est capable de catalyser le transfert d'un fluorure de disaccharide dont l'unité non-réductrice est une glucosamine (résultats non publiés).

Dans un premier temps, nous nous sommes inspirés de ces travaux et nous avons entrepris la synthèse d'un donneur disaccharide GlcNHR- β (1-4)-Glc activé en position anomère par un groupement fluorure en position axiale (Figure 76).

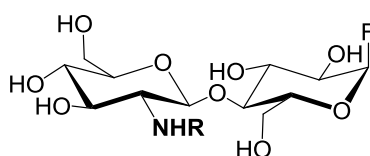


Figure 76 : Disaccharide donneur de glycosylation

II.2.1.1. Synthèse du disaccharide α -fluorure

Afin de réaliser la synthèse du disaccharide donneur GlcNHR- β (1-4)-Glc- α F (Figure 77), il convient de préparer les deux monosaccharides à assembler. La synthèse chimique du disaccharide nécessite la mise en place d'une stratégie de protection/déprotection des groupements protecteurs co-existants compatibles. Dans cette optique, il a été décidé de protéger l'amine en formant un carbamoyle par un groupement trichloroéthoxycarbamoyle (Troc), car sa déprotection se réalise facilement dans des conditions douces par réduction au Zinc^[211]. De plus, la glycosylation avec des donneurs de glycoside *N*-protégés avec un groupement Troc permet généralement de parvenir à de bons rendements^[212, 213]. En effet, le Troc est un bon groupement participant pour les glycosylation *trans* 1-2 comme celle que nous souhaitons réaliser.

Le groupe de Demchenko a décrit le -SBox comme groupement protecteur stable et comme excellent groupement partant anomère pour la synthèse d'oligosaccharides^[214].

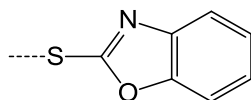


Figure 77 : Groupement -S-benzoxazole (SBox)

En 2006, ils ont publié des travaux portant sur la glycosylation chimique de 2-désoxy-2-aminosaccharides activés par un groupement anomère -SBox. Ces travaux décrivent des réactions de glycosylation de 4 différents *N*-glucosaminyles sur 4 accepteurs dont les groupements hydroxyle n'entrant pas en jeu dans la réaction sont protégés par des groupements benzyle^[215]. Ils décrivent notamment la synthèse permettant d'obtenir un disaccharide 2-désoxy-2-(trichloroéthoxycarbamoyle)glucosyl- β (1-4)-glucoside de méthyle (GlcNHTroc- β (1-4)-Glc- α OMe) avec de bons rendements par glycosylation avec un promoteur électrophile modéré comme le triflate d'argent (AgOTf), le triflate de méthyle (MeOTf) ou encore le système acide *N*-succinimide/acide triflique (NIS/TfOH)^[216] (Schéma 6).

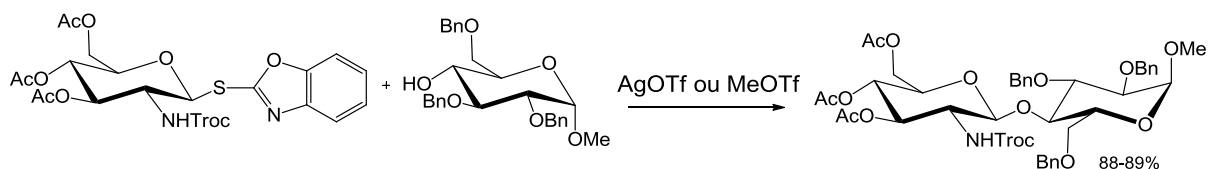


Schéma 6 : Synthèse d'un disaccharide de 2-désoxy-2-aminosaccharide protégé par un groupement Troc, par Bongat *et al.*^[215]

Nous avons donc construit notre synthèse en nous appuyant sur ces travaux. Afin de synthétiser le disaccharide, nous avons donc préparé un donneur protégé par un groupement *N*-troc et activé en position anomère par un groupement S-benzoxazole (SBox), et trois accepteurs ayant leurs groupements hydroxyles protégés.

Ainsi, notre stratégie suit le schéma rétrosynthétique représenté en Figure 78 :

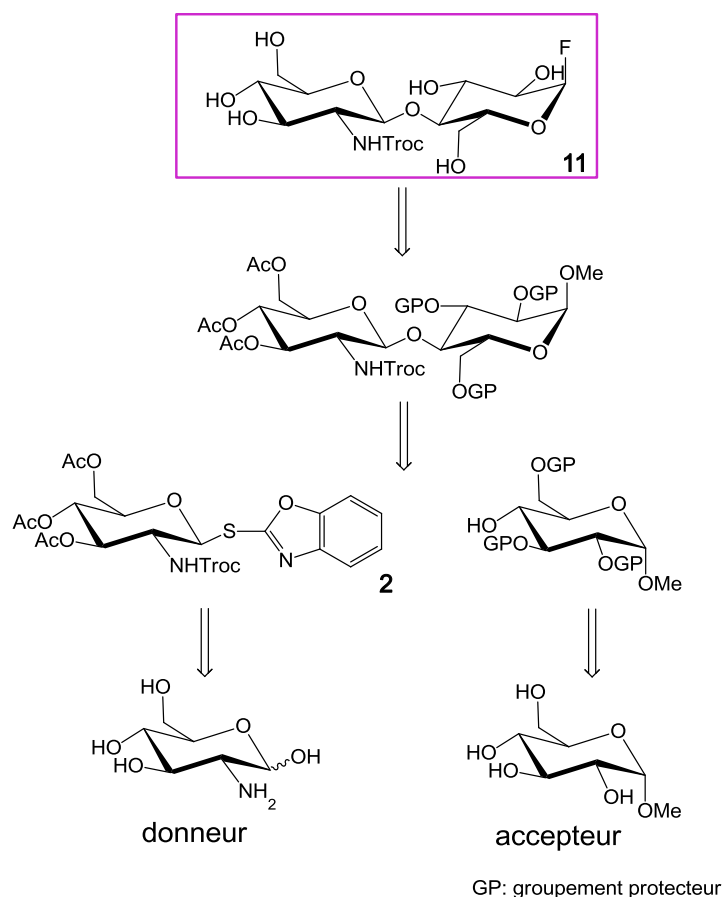


Figure 78 : Rétrosynthèse pour l'obtention du disaccharide donneur de glycosylation (11)

Une fois le donneur **11** (GlcNHTroc- β (1-4)-Glc- α F) synthétisé, il sera donc utilisé comme donneur de glycosylation. Ce donneur associé avec l'accepteur cellobiose doit permettre de réaliser la synthèse d'un tétrasaccharide au moyen de Cel7B E197A.

II.2.1.1.a. Synthèse du donneur de glycosylation

La synthèse du donneur a été réalisée en s'appuyant sur les conditions de synthèse décrite par Bongat *et al.*^[215] dans lesquelles le chlorhydrate de D-glucosamine est *N*-protégé par réaction du 2,2,2-trichloroéthylchloroformate en présence d'hydrogénocarbonate de calcium^[217]. Le 2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbonyl)- β -D-glucose est ensuite peracétylé en présence d'anhydride acétique dans la pyridine en présence de catalyseur DMAP (diméthylaminopyridine) pendant 2 heures à température ambiante pour obtenir la molécule **1** avec 79% de rendement. La position anomère est ensuite fonctionnalisée en 2 étapes. Dans un premier temps, la molécule **1** est mise en solution dans l'acide bromhydrique pour former le bromure de glycoside. Ensuite, l'ajout de sel de potassium *S*-benzoxazole permet la substitution du bromure par le -SBox pour l'obtention de la molécule **2** avec 94% de rendement.

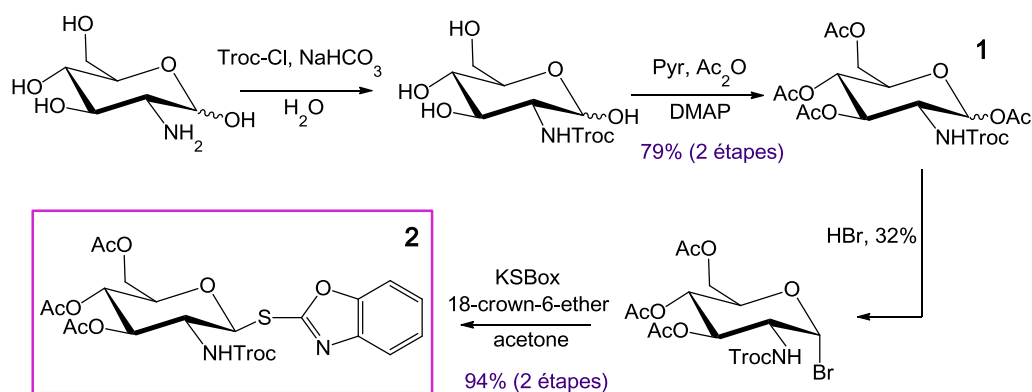


Schéma 7 : Synthèse du donneur de glycosylation (**2**)

La réaction de fonctionnalisation de la position anomère par le sel de KSBox conduit à la formation majoritaire de l'isomère β . Malgré tout l'isomère α se forme et a pu être isolé à hauteur de 4% de rendement. Cette étape de fonctionnalisation de la position anomère est également réalisable directement à partir de la molécule **1**, au moyen du *S*-benzoxazole en présence d' AlCl_3 . Cependant, les rendements obtenus par cette méthode sont inférieurs à ceux obtenus par la méthode précédemment décrite. Les

rendements atteignent 40 à 60% mais surtout une formation plus importante de l'isomère α est observée, dans des proportions α/β de 6/4.

Le rendement global de la synthèse du donneur de glycosylation **2** est de 75% à partir du chlorhydrate de D-glucosamine.

II.2.1.1.b. Synthèse des accepteurs de glycosylation

Nous avons réalisé les synthèses de trois différents accepteurs de glycosylation (Figure 79). Tout comme pour le donneur, les groupements protecteurs des fonctions hydroxyle de l'accepteur ont une influence sur la réalisation de la glycosylation.

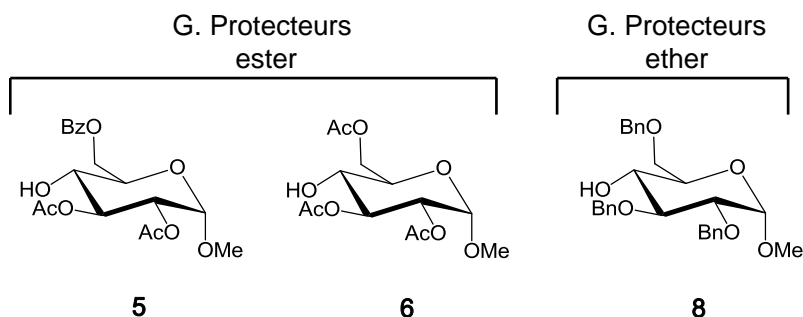


Figure 79 : Accepteurs de glycosylation (5), (6) et (8) pour la synthèse du disaccharide

La synthèse d'accepteurs différents pourra permettre d'évaluer l'influence des groupements protecteurs de l'accepteur lors de la réaction de glycosylation avec le donneur. Nous avons choisi de synthétiser un accepteur protégé par des groupements benzyle, reconnu comme bon groupement pour la glycosylation, mais aussi de synthétiser deux accepteurs protégés par des groupements ester. Ce choix a été motivé par leur déprotection plus facile que pour les groupements ether mais également pour ne pas multiplier les types de groupements protecteurs présents sur la molécule, synonymes d'étapes de synthèse supplémentaires.

• Synthèse de l'accepteur 5

La synthèse de la molécule **5** a été réalisée en partant d' α -glucoside de méthyle suivant la synthèse représentée sur le Schéma 8. Dans un premier temps, les positions en C₄ et C₆ sont protégées par la formation d'un benzylidène par action du α - α -diméthoxytoluène en présence d'acide camphorsulfonique dans l'acétonitrile. Les

hydroxyles en position C₂ et C₃ sont ensuite acétylés par un mélange d'anhydride acétique et de pyridine en présence de catalyseur DMAP. La molécule **3** est isolée avec un rendement de 63%. La déprotection du benzylidène est ensuite réalisée en présence d'acide tétrafluoroborique pour former le diol **4**. La position en C₆ est ensuite sélectivement protégée au moyen d'un benzoate, formé par la réaction du diol avec le 1-(benzoyloxy)benzotriazole (Bz-Bzt) en présence d'une base. Le Bz-Bzt permet de fonctionnaliser sélectivement l'alcool primaire en position C₆ par un groupement benzyle. L'accepteur **5** est alors isolé avec un rendement de 54%.

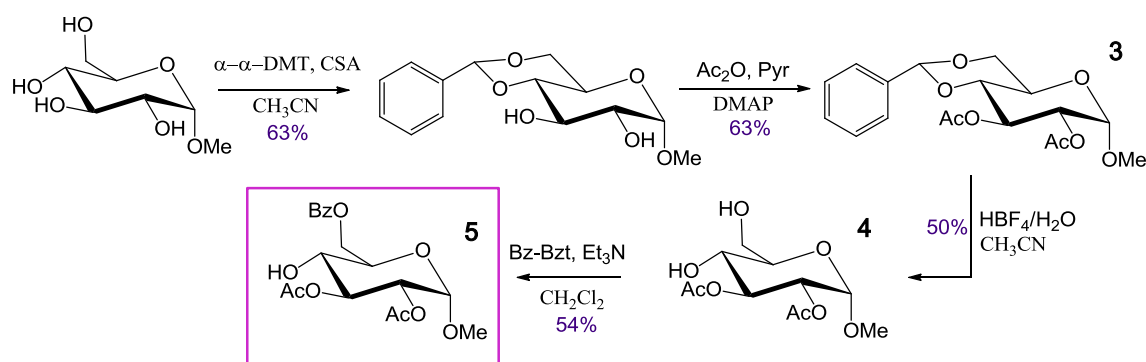


Schéma 8: Synthèse de l'accepteur (5)

Le rendement global de la synthèse de la molécule **5** est de 11% à partir de l' α -glucoside de méthyle commercial.

• Synthèse de l'accepteur 6

La synthèse de la molécule **6** été réalisée par désacétylation sélective de l'hydroxyle en position C₄ du 2,3,4,5-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranoside de méthyle au moyen d'une lipase de *Candida antarctica*.

Les lipases possèdent une activité estérase, et ont la capacité de réaliser des désacétylations sélectives au départ de α -D-glucoside de méthyle peracétylé. La position primaire en C₆ est plus réactive et stériquement moins encombrée que les 2 autres positions secondaires en C₄ et C₃. Fink *et al.* ont décrit que la désacétylation par une lipase de germe de blé d'un glucose peracétylé suit l'ordre de déprotection C₆>C₄>C₃>C₂ [218]. Lors de la réaction, la position C₆ est donc désacétylée en premier lieu, puis la migration 4→6 du groupement acétate permet de libérer l'hydroxyle en C₄ [219, 220]. Ce phénomène de migration des groupements acétate favorise en effet la protection de l'hydroxyle primaire dans des conditions de solvant organique {Angyal, 1965 #389} et de

forte concentration en enzyme. Horrobin *et al.* ont décrit la migration sélective de la position C₄ vers C₆ de l'α-D-glucoside de méthyle acétylé en C₂, C₃ et C₄ au moyen d'une estérase de *R.toruloides*. Le composé libre en C₄ est ainsi synthétisé avec un rendement de 35%^[220]. Au même titre d'exemple, Kirk *et al* ont décrit la désacétylation sélective de dérivés de α-D-glucoside au moyen de la lipase B immobilisée de *Candida antarctica* (Novozym435) reportant ainsi l'excellente activité de cette lipase sur les dérivés glucosidiques^[222]. En s'appuyant sur ces travaux,^[222] nous avons donc réalisé la synthèse de l'accepteur **6** en utilisant la lipase Novozym435 en solvant organique (Schéma 9).

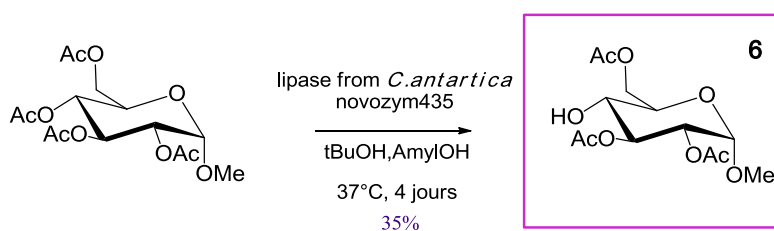


Schéma 9 : Synthèse de l'accepteur 6

La réaction est réalisée dans un mélange d'alcools tert-butyle et amylique à 37°C pendant 4 jours. Un mélange de produits composés de diol, de glucosides libres en position 4 ou en position 6 est alors obtenu. L'accepteur **6** est isolé avec 35% de rendement au départ de l'α-D-glucoside de méthyle peracétylé.

- **Synthèse de l'accepteur 8**

La molécule **8** a été synthétisée en partant d'α-D-glucoside de méthyle. Dans un premier temps la protection des positions en C₄ et C₆ est réalisée par la formation d'un benzylidène comme décrit précédemment. Le sucre issu est ensuite directement remis en réaction afin de protéger les positions C₂ et C₃ par des groupements benzyle. Cette réaction est réalisée au moyen de bromure de benzyle et d'hydrure de sodium dans le DMF, pour produire la molécule **7** avec 63% de rendement pour les 2 étapes. Ensuite la dernière étape est l'ouverture régiosélective du benzylidène au moyen du réducteur cyanoborohydrure de sodium et de l'acide hydrochlorique. L'accepteur **8** est isolé avec 79% de rendement.

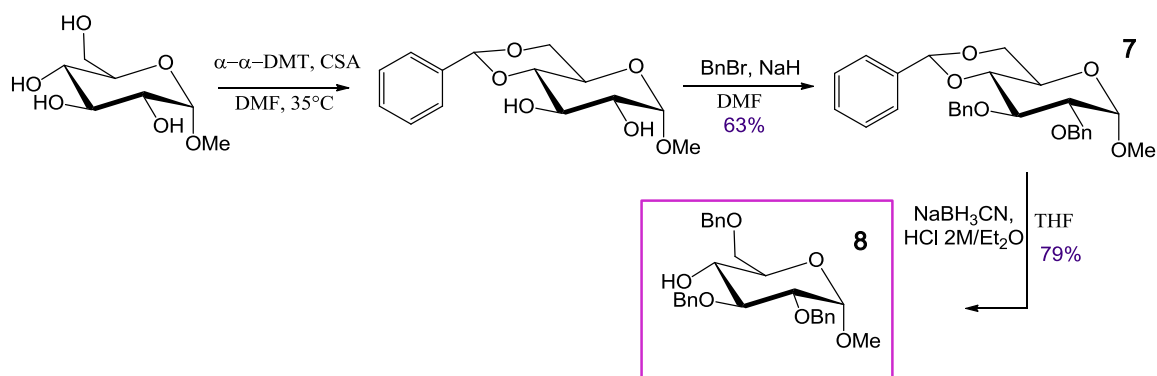


Schéma 10 : Synthèse de l'accepteur 8

Le rendement global de la synthèse de la molécule **8** est de 50% au départ de l' α -D-glucoside de méthyle commercial.

II.2.1.1.c. Réaction de glycosylation

Afin de réaliser la synthèse du disaccharide, nous nous sommes appuyés sur les conditions réactionnelles de Bongat *et al.*^[215]. Des essais de glycosylation avec le donneur **2** et chacun des accepteurs ont été réalisés, en utilisant le triflate d'argent comme promoteur (Schéma 11). Les réactions sont conduites à température ambiante sous atmosphère inerte et en présence ou non de tamis moléculaire. Les résultats obtenus pour cette synthèse sont rassemblés dans le Tableau 11 :

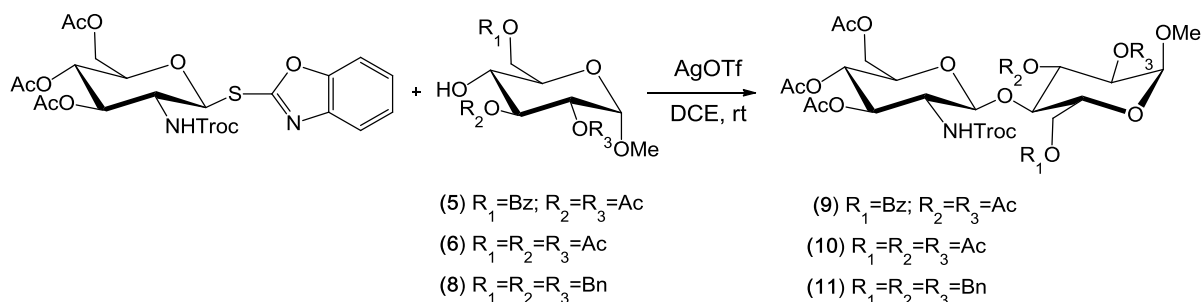


Schéma 11 : Réaction de glycosylation du donneur (**2**) avec les accepteurs (**5**), (**6**) et (**8**)

Entrée	Nombre d'équivalents donneur (2)	Accepteur	Nombre d'équivalent accepteur	tamis moléculaire	Nombre d'équivalent promoteur	Temps (heures)	η (%)
1	1	5	1.5	Oui	3	1.5	10%
2	1	5	3	Oui	4	1.5	15%
3	1.1	6	1	Oui	2.2	1.5	15%
4*	1.6	6	1	Oui	3.2	2	14%
5	2	6	1	Oui	4	2.5	17%
6	1	8	1.1	Oui	2.2	1	37%
7	1	8	1	Oui	2.2	1	35%
8	1.1	8	1	Oui	2.2	1	39%
9	1.1	8	1	Non	2.2	1	39 à 45%
10	2	8	1	Non	2.2	1	39%

*réaction conduite à -20°C

Tableau 11 : Récapitulatif des résultats de glycosylation

Les essais de glycosylation avec les accepteurs **5** et **6**, protégés par des groupements ester, ont des rendements faibles en comparaison avec ceux obtenus avec l'accepteur **8** protégé par des groupements benzyle. Les groupements ester sont des groupements moins activants que les groupements ether, impactant ainsi les rendements de glycosylation. De plus, l'étape de purification est délicate pour chacune de ces réactions car les espèces en présence possèdent des mobilités sur silice très proches. Ces résultats démontrent l'influence de l'activation de l'accepteur par ses groupements lors de la réaction de glycosylation.

En comparaison avec les rendements reportés autour de 88% pour une glycosylation avec l'accepteur **8** ^[215], nous avons obtenu des rendements plus modestes atteignant 45% en produit **11**. Bien qu'en travaillant dans des conditions anhydres, nous avons systématiquement observé une hydrolyse très rapide du donneur. Pour pallier à cela, des essais de glycosylation avec une stoechiométrie inverse ont été réalisés afin de travailler en excès de donneur et améliorer la conversion en disaccharide. Ces conditions n'ont malgré tout pas permis d'améliorer les rendements. L'accepteur benzylé **8** n'ayant pas réagi a été isolé et recyclé à hauteur de 40 à 45%, ce qui est cohérent avec le rendement en disaccharide obtenu.

II.2.1.1.d. Préparation de l' α -fluorure de disaccharide

Afin de préparer le disaccharide pour la glycosylation enzymatique, plusieurs étapes sont nécessaires. Il convient de procéder à la déprotection sélective de chacune des fonctionnalités de la molécule **11**. Pour cela, nous avons suivi le schéma synthétique représenté sur le Schéma 12:

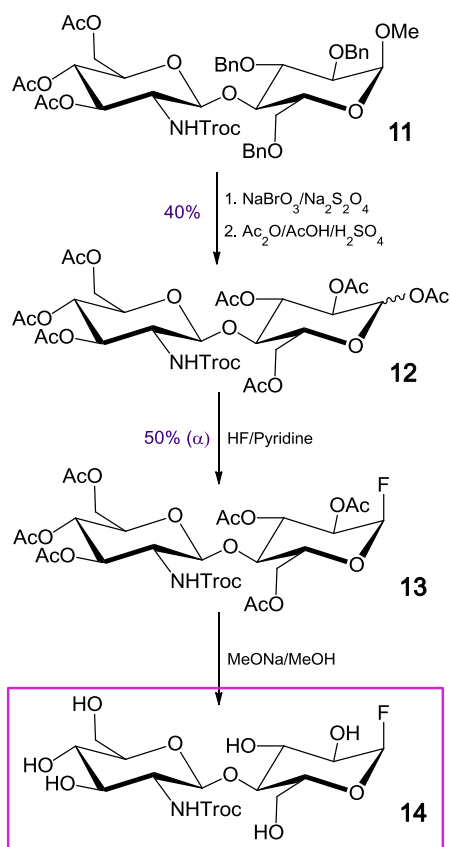
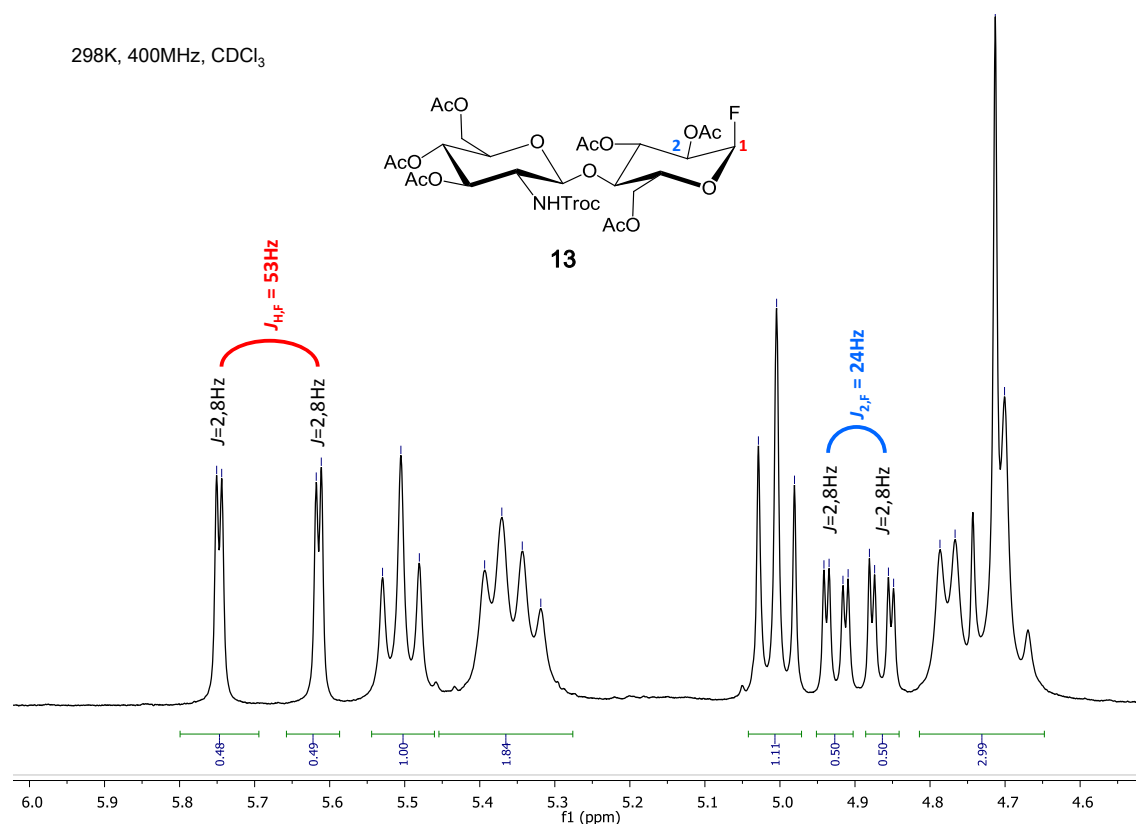


Schéma 12 : Synthèse du disaccharide 14

Les premières étapes à réaliser portent sur les groupements benzyle de l'unité réductrice. Cette étape a été réalisée en adaptant des conditions reportées par Niemietz *et al.* qui ont réalisé la déprotection sélective de groupements benzyle de sucres portant un groupement azide^[223]. Cette méthode alternative à l'hydrogénation catalytique semblait intéressante au vu de la présence du groupement carbamoyle sur notre disaccharide. La débenzylation est ainsi réalisée en présence d'un système biphasique constitué d'une combinaison de bromate de sodium et d'hydrosulfite de sodium. Une fois déprotégé, le produit formé est soumis à un traitement d'acétolyse par un mélange d'anhydride acétique, d'acide acétique et d'acide sulfurique^[224]. La molécule **12** est obtenue avec un rendement de 40% sur les deux étapes. Ce rendement faible s'explique probablement par une perte en produit lors de l'extraction du mélange biphasique. La fluoration du disaccharide est ensuite exécutée par un traitement avec une solution d'acide fluorhydrique à 70% dans la pyridine^[134]. Un mélange α/β de fluorure de disaccharide est obtenu, et le disaccharide **13** est isolé avec 50% de rendement.

La présence du fluorure en position anomère axiale a été confirmée par spectrométrie RMN ¹H et ¹³C par les signaux de couplage avec le fluorure

caractéristique de cette configuration^[225]. L'agrandissement de la zone concernée du spectre de RMN ¹H de la molécule est représenté en Figure 80.



La présence du fluorure en configuration α sur le disaccharide **13** se traduit ici par la présence des pics de doublet de doublet à 5,6ppm ($J_{1,2} = 2,8\text{Hz}$; $J_{\text{H},\text{F}} = 53\text{Hz}$) correspondant au H_1^1 et de doublet de doublet de doublet à 4,9ppm ($J_{1,2} = 2,8\text{Hz}$; $J_{2,\text{F}} = 24\text{Hz}$) correspondant au H_2^1 .

La constante de couplage $J_{\text{C},\text{F}}$ varie selon la configuration dans laquelle se trouve le groupement porté par le carbone anomère. Ainsi un C_1 portant un fluore en position axiale a un déplacement chimique autour de 106ppm et une constante de couplage $J_{\text{C},\text{F}}$ d'environ 220 Hz tandis que lorsque le fluore est en position équatoriale son déplacement chimique se trouve autour de 110ppm pour une constante de couplage $J_{\text{C},\text{F}}$ d'environ 210Hz^[226]. Sur l'agrandissement de la zone des C_1 sur le spectre de RMN ¹³C représenté en Figure 81, la constante de couplage $J_{\text{C},\text{F}} = 227\text{Hz}$ correspond bien avec la valeur caractéristique d'une constante de couplage avec un fluorure de configuration axiale.

298K, 400MHz, CDCl₃

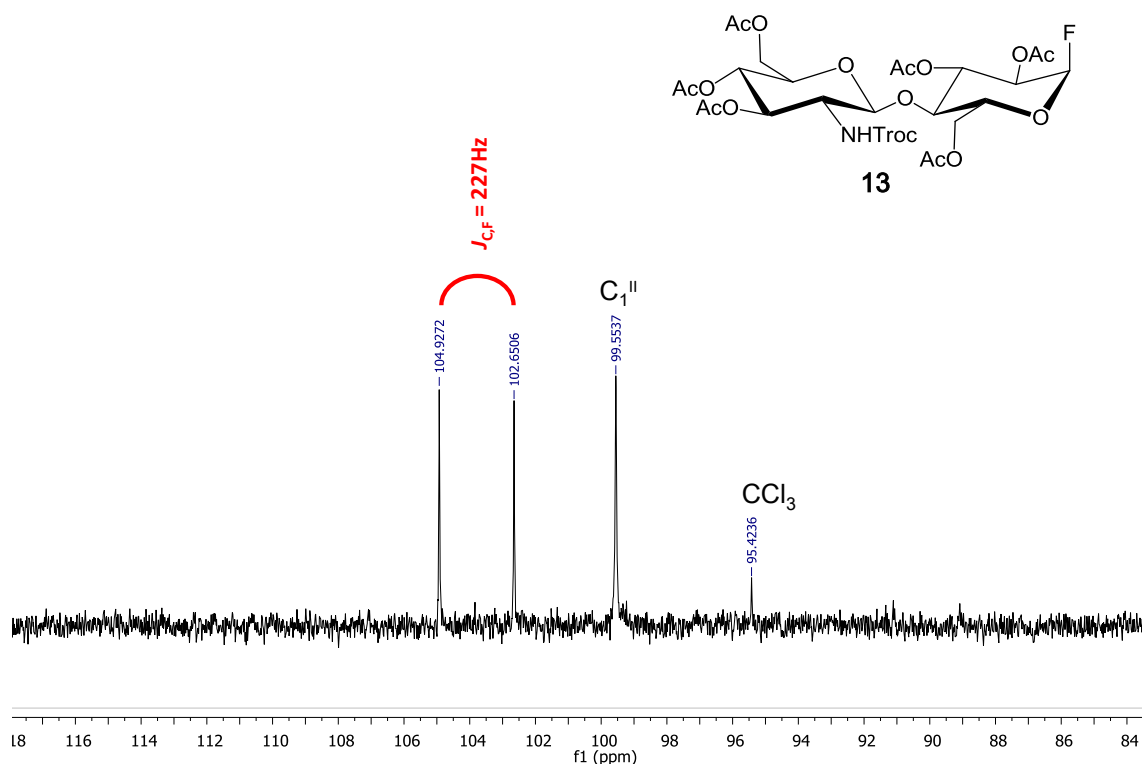


Figure 81 : Spectre RMN ¹³C partiel du disaccharide (**13**)

Le composé **14** est ensuite obtenu de manière quantitative par méthanolyse en présence de méthanoate de sodium dans les conditions classiques de Zemplén [227]. Le disaccharide est caractérisé par spectrométrie de masse ESI⁺ comme l'indique le spectre de masse en Figure 82, ainsi qu'en spectrométrie RMN du ¹H.

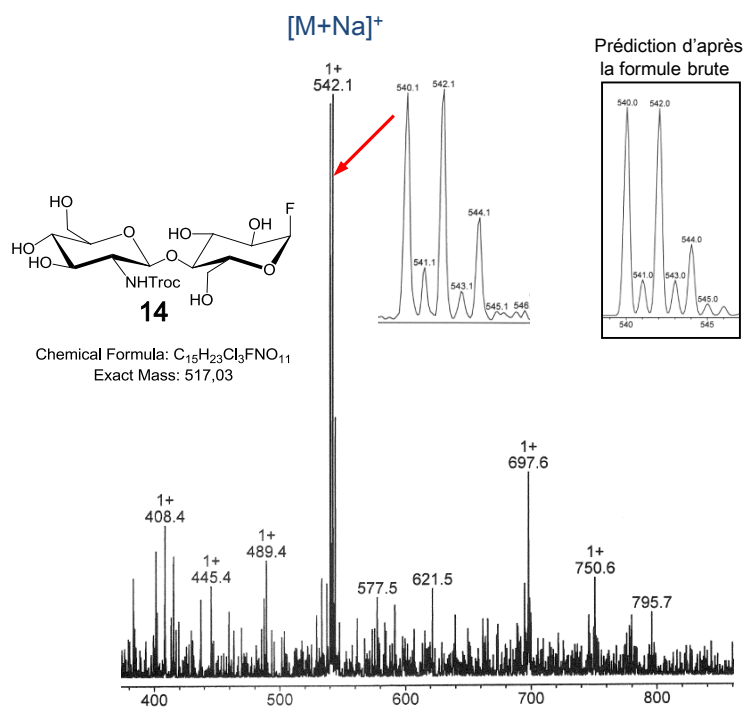


Figure 82 : Spectre de masse en ESI⁺ du produit 14

Sur le spectre de masse, la masse obtenue correspond avec celle attendue pour le produit **14**, et la simulation théorique du spectre coïncide. En RMN du 1H , la position du fluorure en position anomère α est confirmée par la présence caractéristique du doublet de doublet à 5,6ppm avec $J_{1,2} = 2,2Hz$ et $J_{H,F} = 53Hz$.

Le rendement global de ces étapes de préparation du produit **14** est de 20% à partir du composé **11**. Ce disaccharide donneur de glycosylation synthétisé ici a ensuite été testé pour la glycosylation enzymatique par la glycosynthase Cel7B E197A.

II.2.1.2. Glycosylation du disaccharide GlcNHTroc- β (1-4)-Glc- α F (**14**) sur le cellotriose

La réaction de glycosylation est conduite au moyen de Cel7B E197A^[210]. La gamme de pH de travail de l'enzyme se situant entre 6 et 10, des essais aux pH 7 et 10 ont été réalisés, à 40°C. Des essais de glycosylation ont été menés avec le cellotriose comme accepteur afin de produire le pentasaccharide GlcNHTroc-(Glc)₄. Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (CCM). Des réactions contrôle avec de l' α -fluorure de cellobiosyle ont été mises en place dans les mêmes conditions

afin de vérifier l'activité enzymatique. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 12 :

Entrée	Donneur	Accepteur	Milieu	Temps	Observations
1	14 (1,2éq.)	Cellotriose (1éq.)	Phosphate pH7 ; 0,1M	20 h	Pas d'évolution
2	α -Fluorure de cellobiosyle	/	Phosphate pH7 ; 0,1M	1 h	Formation précipité (cellulose)
3	14 (1,2éq.)	Cellotriose (1éq.)	Carbonate pH10 ; 0,1M	20 h	Dégradation du donneur
4	α -Fluorure de cellobiosyle	/	Carbonate pH10 ; 0,1M	1 h	Formation précipité (cellulose)
5	14 (1éq.)	Cellotriose (1éq.)	Acétate pH5 ; 0,1M	20 h	Pas d'évolution

Tableau 12 : Récapitulatif des essais de glycosylation par Cel7B E197A avec le donneur (14)

Les différents essais n'ont pas permis de produire le pentasaccharide attendu (Schéma 13). A pH7, nous n'avons pas observé d'évolution de la réaction, les réactifs de départ semblent ne pas réagir. En revanche, à pH10, le donneur subit une dégradation observable après 1 heure de réaction et la quasi totalité du donneur de départ disparaît après 24h.

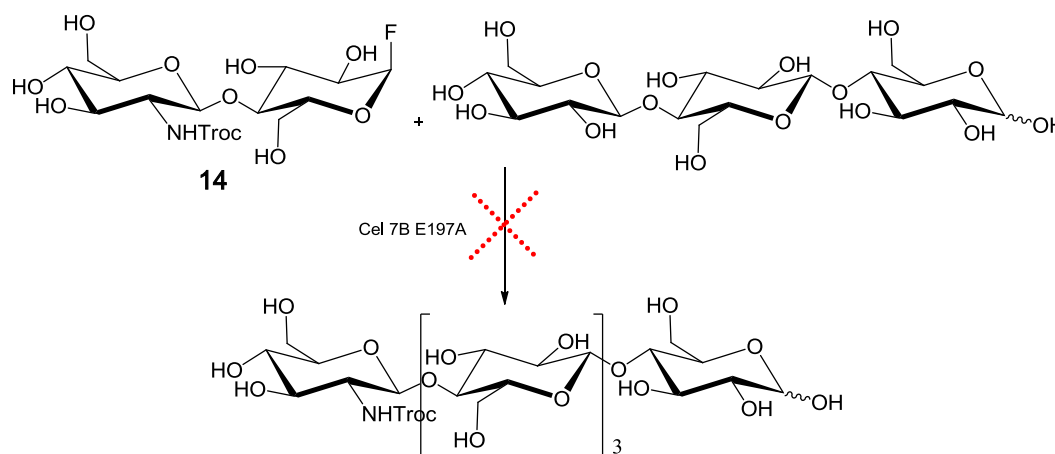


Schéma 13 : Essai de synthèse du GlcNHTroc-(Glc)₄ par la glycosynthase

Des essais complémentaires ont été réalisés à des pH7, pH8 et pH10 sur du 2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthylcarbamoyl)glucopyranoside afin d'évaluer la stabilité du

groupement Troc. Après 30 minutes, le composé commence à se dégrader aux pH basiques et une dégradation totale intervient après 15 heures. Il apparaît donc que le groupement n'est pas stable dans cette gamme de pH. Il est surprenant qu'à pH7, la réaction de glycosylation n'évolue pas. Le groupement fluorure est un groupement réactif qui tend à s'hydrolyser rapidement dans l'eau, or ici aucune évolution des produits de départ n'est observable en CCM. L'analyse par spectrométrie de masse du brut réactionnel après 20h confirme la présence du fluorure (Figure 83).

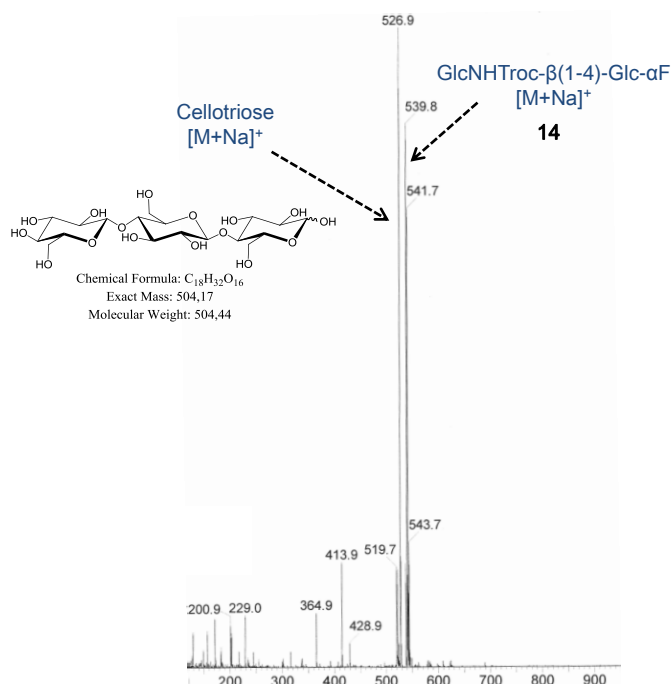


Figure 83 : Spectre de masse ESI⁺ du brut réactionnel (Tableau 12, entrée 5)

Les réactions témoin avec l' α -fluorure de cellobiosyle indiquent que l'enzyme est active dans les conditions utilisées puisqu'elle forme des oligosaccharides de cellulose insoluble dans l'eau. Il est donc vraisemblable ici que l'enzyme ne soit pas capable de catalyser la glycosylation avec des donneurs portant un groupement *N*-Troc en C₂ de l'unité non-réductrice. Ceci peut être dû à l'encombrement stérique que le groupement Troc occasionne.

Afin de pallier à ce problème, nous avons synthétisé un disaccharide donneur avec la fonction amine protégée par groupement acétate à la place du groupement Troc (GlcNHAc- β (1-4)-Glc- α F), celui-ci étant stériquement moins encombrant.

II.2.1.3. Synthèse du disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- α F

La synthèse de la molécule **20** a été réalisée en partant du disaccharide **11** précédemment obtenu (Schéma 12). La suite réactionnelle est représentée sur le Schéma 14.

Dans un premier temps, le groupement protecteur Troc est déprotégé par un traitement au zinc activé dans l'acide acétique^[228]. Cette méthode a permis d'isoler le produit **15** avec 97% de rendement. L'amine libre est ensuite mise en présence d'un mélange d'anhydride acétique et de triéthylamine pour réaliser sa protection par un groupement acétate. Le produit **16** est alors formé et isolé avec 90% de rendement.

Une fois l'acétamide obtenu, les étapes suivantes consistent en la débenzylation puis l'acétolyse du glucoside de méthyle. Au vu des rendements de débenzylation décevants obtenus précédemment avec la méthode de Niemietz *et al.* (synthèse de la molécule **12**) la déprotection a cette fois été menée par hydrogénolyse. L'étape de débenzylation est réalisée à température ambiante en présence de dihydrogène et catalysée par l'hydroxyde de palladium sur charbon à 20%^[229]. Le produit **17** est isolé avec 96% de rendement. L'acétolyse est conduite dans les mêmes conditions que décrites précédemment pour le produit **12**, et permet d'obtenir le disaccharide peracétylé **18** avec 96% de rendement.

Similairement, la fluoration de la position anomère est réalisée par un traitement à l'acide fluorhydrique à 70% dans la pyridine, et permet d'isoler la molécule **19** avec 55% de rendement.

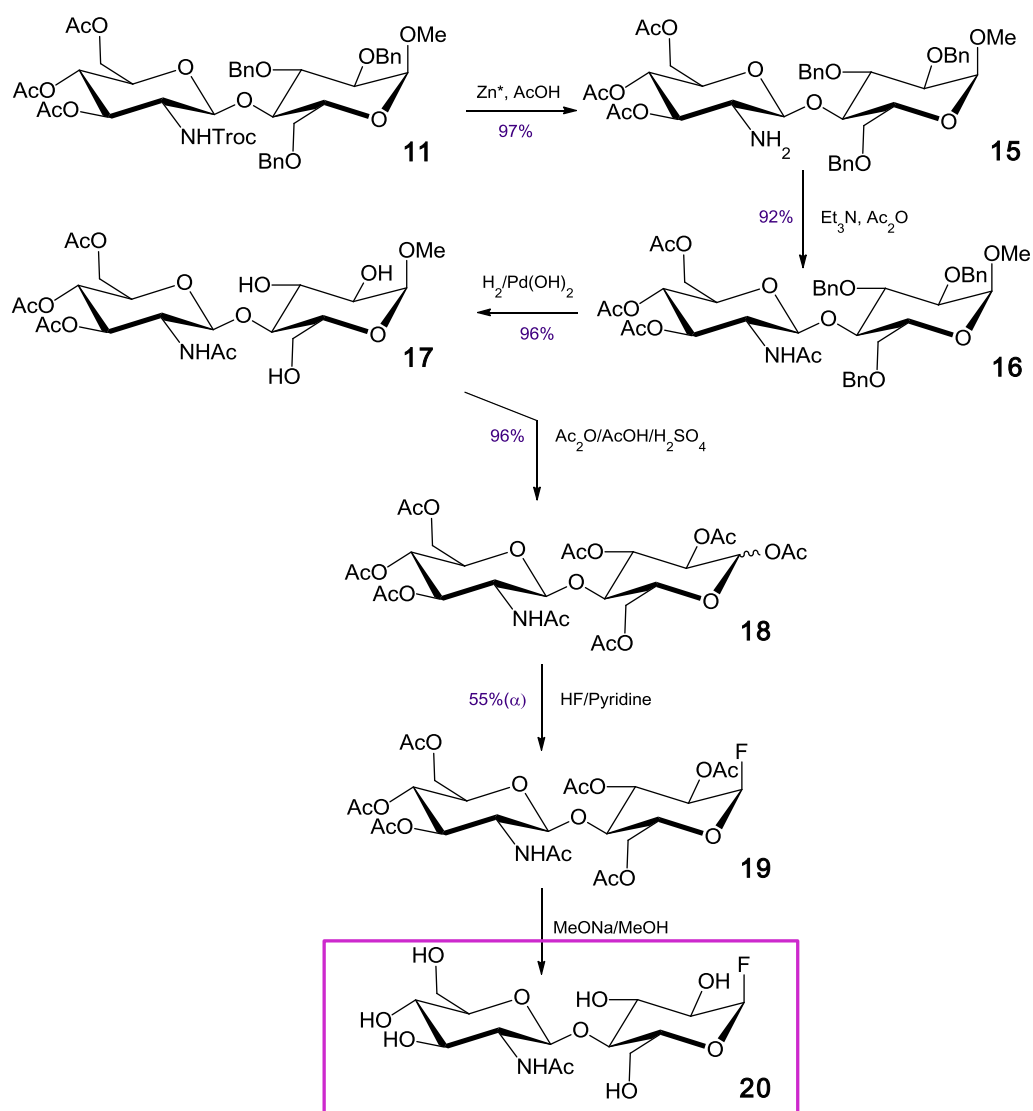


Schéma 14 : Synthèse du disaccharide donneur GlcNHAc-β(1-4)-Glc-αF (**20**)

La dernière étape de déprotection de la molécule est réalisée par méthanolyse en présence de méthanoate de sodium et permet l'obtention du disaccharide **20** (GlcNHAc-β(1-4)-Glc-αF) de manière quantitative. Le rendement global en disaccharide **20** après ces 6 étapes depuis le composé **11** est de 45%. La molécule a été caractérisée par spectrométrie de masse et par spectrométrie RMN 1H (Figure 84) et ^{13}C (Figure 85).

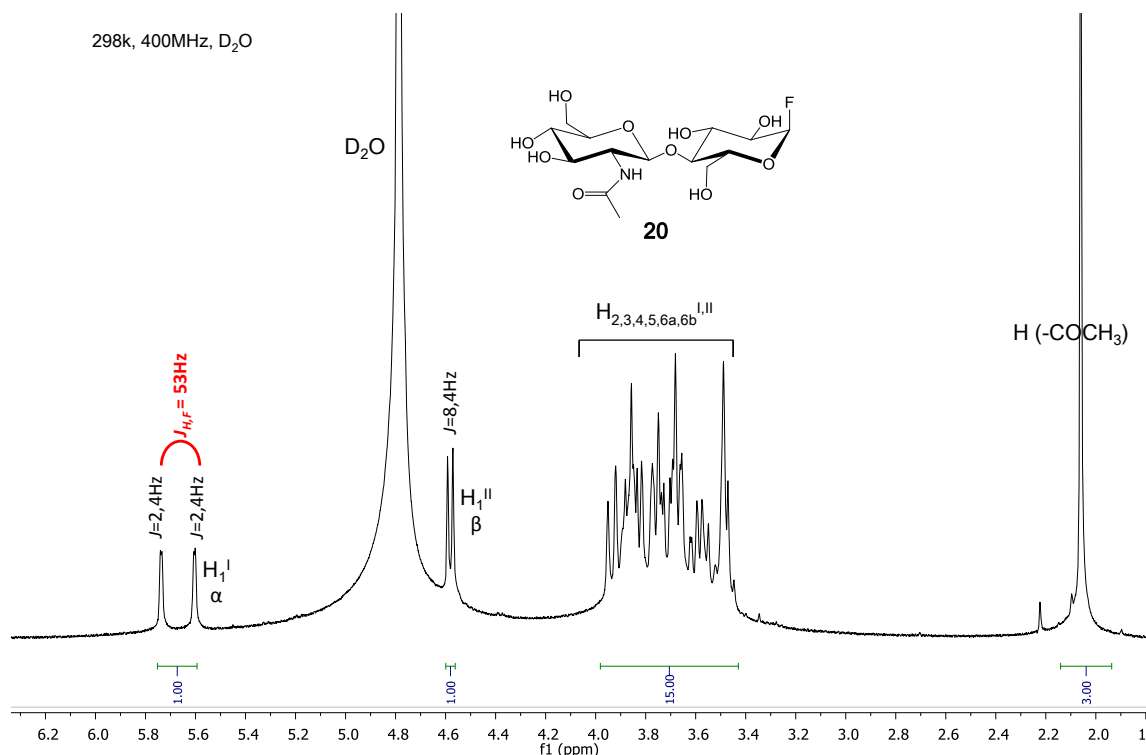


Figure 84 : Spectre RMN ¹H du disaccharide GlcNHAc-β(1-4)-Glc-αF (20)

Sur le spectre RMN ¹H en Figure 84 , le doublet de doublet caractéristique du proton couplé à un fluorure en position anomère α est observable à 5,67ppm avec des constantes de couplage $J_{1,2} = 2,4\text{Hz}$ et $J_{H,F} = 53\text{Hz}$.

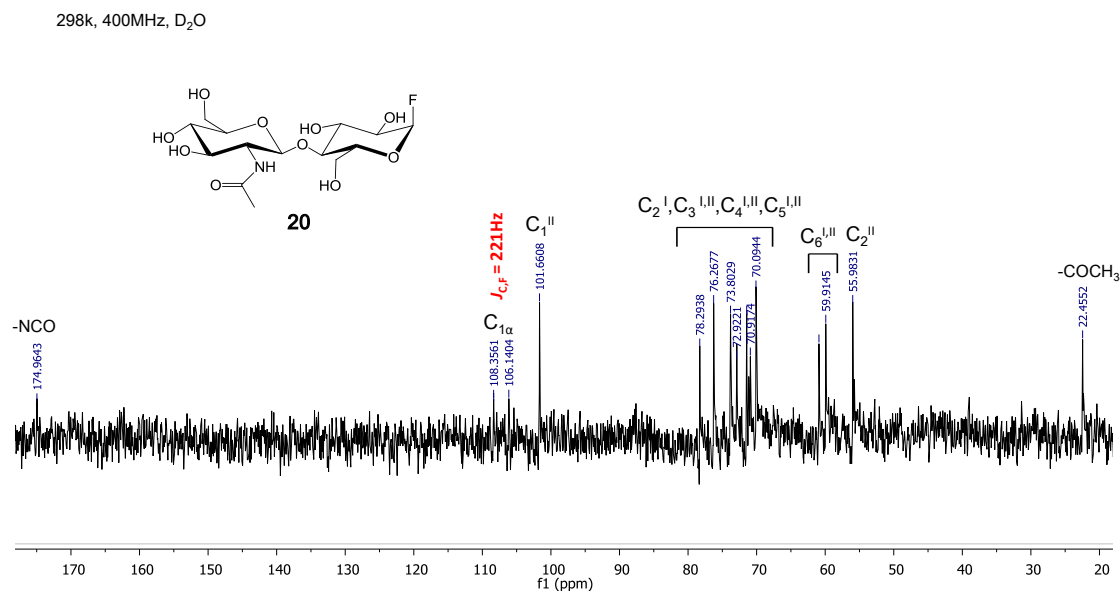


Figure 85 : Spectre RMN ¹³C du disaccharide GlcNHAc-β(1-4)-Glc-αF (20)

Sur le spectre RMN ^{13}C en Figure 85, le C_1 du disaccharide a un déplacement et une constante de couplage qui confirment la position en α du fluorure (δ 107ppm, $J_{\text{C},\text{F}} = 221\text{Hz}$)

Le rendement obtenu ici est supérieur à celui obtenu pour la synthèse du disaccharide **14** qui était de 20%. Cette nette amélioration est surtout liée à la méthode utilisée pour la débenzylation qui donne dans ce cas un meilleur résultat lorsqu'elle est réalisée par hydrogénolyse $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2$.

Le disaccharide donneur $\text{GlcNHAc-}\beta(1-4)\text{-Glc-}\alpha\text{F}$ produit est alors testé pour le couplage avec l'accepteur cellodextrine par glycosylation au moyen de la glycosynthase.

II.2.1.4. Glycosylation du disaccharide $\text{GlcNHAc-}\beta(1-4)\text{-Glc-}\alpha\text{F}$ sur le cellotriose

Les réactions de glycosylation par la glycosynthase avec le disaccharide donneur $\text{GlcNHAc-}\beta(1-4)\text{-Glc-}\alpha\text{F}$ (**20**) sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, en solution tamponnée à pH7 et à pH10, à 40°C. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 13 :

Entrée	Donneur	Accepteur	Milieu	Temps	Observations
1	20 (1éq.)	Cellotriose (1éq.)	Tampon carbonate, pH10 ; 0,1M	100h	Pas de formation de produit, dégradation du donneur
2	20 (1éq.)	Cellotriose (1éq.)	Tampon phosphate, pH7 ; 0,1M	24h	Pas de formation de produit, dégradation lente du donneur

Tableau 13 : Récapitulatif des essais de glycosylation par Cel7B E197A avec le donneur (**20**)

Les réactions sont suivies par CCM. L'essai mené à pH10 (Tableau 13, entrée 1) est stoppé après 100h de réaction par désactivation thermique de l'enzyme, puis le mélange réactionnel est purifié successivement sur un mélange charbon actif/célite et par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sur Biogel P2.

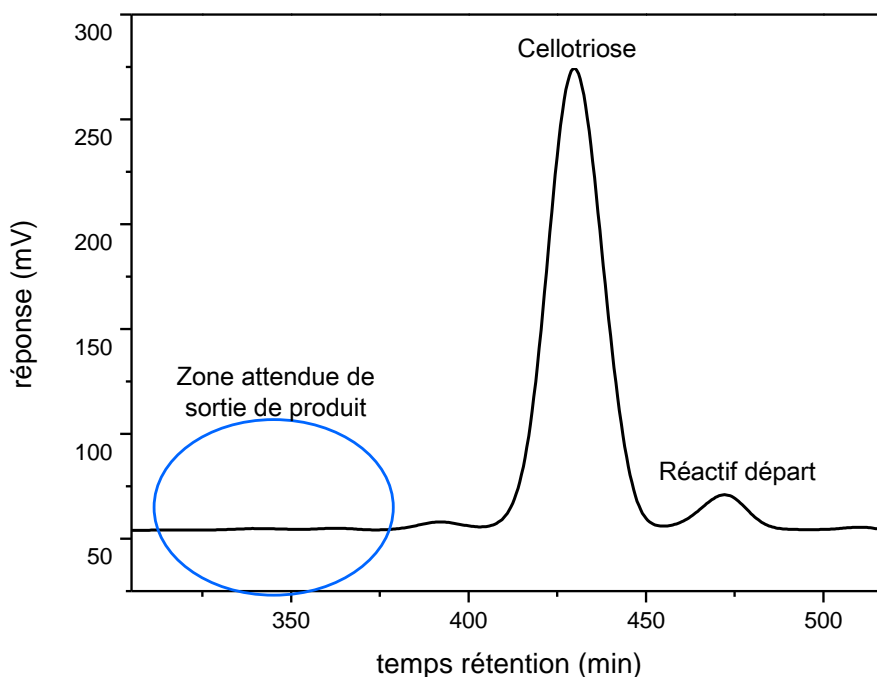


Figure 86 : Chromatogramme SEC sur Biogel P2 du mélange réactionnel issu de la réaction de glycosylation par Cel7B E197A (Tableau 13, entrée 1)

Le chromatogramme en Figure 86 atteste de la présence de l'accepteur cellotriose ainsi que du donneur ou de son produit d'hydrolyse. En revanche, aucun produit ciblé n'est observable dans la zone d'élution dans laquelle il est attendu.

La glycosynthase Cel7B E197A semble ne pas être en mesure de catalyser la réaction de glycosylation avec un donneur portant une unité glucosamine protégée à l'unité non réductrice. Ceci peut être dû à plusieurs raisons. Il peut notamment s'agir d'un problème d'encombrement stérique engendré par le groupement *N*-protecteur, comme évoqué précédemment. Afin de déterminer la cause exacte de l'inactivité de l'enzyme à catalyser la réaction il est nécessaire de réaliser des expériences complémentaires. La modélisation moléculaire pourrait en outre permettre de déterminer les interactions ayant lieu entre le site actif et le donneur, ainsi que d'évaluer le positionnement de celui-ci au sein du site actif.

La glycosynthase qui représentait la voie privilégiée pour réaliser le squelette saccharidique ciblé n'a donc pas permis la réalisation de la glycosylation spécifique de notre donneur sur un accepteur cellodextrine. Une alternative consiste en l'utilisation d'une cellulase sauvage dans des conditions réactionnelles permettant d'orienter son activité vers la catalyse de la transglycosylation.

II.2.2. Synthèse du squelette par une cellulase sauvage

Des travaux de Kobayashi *et al.* publiés en 1991 reportent la synthèse de cellulose *in vitro* par condensation de β -fluorure de cellobiosyle à l'aide de cellulases. Des rendements atteignant 64% en oligosaccharides de cellulose ont été obtenus avec une endoglucanase de *Trichoderma viride* dans des conditions de solvants hydroorganiques et de concentrations en substrat élevées^[128]. La capacité de cette enzyme commerciale de *T.viride* (ONOZUKA R-10) à catalyser la synthèse d'oligosaccharides à partir de β -fluorure de glycosyle a depuis été reprise dans d'autres travaux. Pour exemple, on peut citer les travaux de Moreau *et al.* réalisés au CERMAV permettant la synthèse enzymatique d'hémithiocellodextrines de DP 4 à 14 par condensation de β -fluorure de 4-thio-cellobioside^[230]. Plus récemment, Kobayashi *et al.* ont publié la synthèse d'oligosaccharides ayant une unité de répétition [Glc- β (1-4)-GlcNHAc] formant ainsi un hybride cellulose-chitine^[231]. Cette synthèse a été réalisée par autocondensation du disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F catalysé par la cellulase ONOZUKA R-10 et offre des rendements pouvant atteindre 63% en oligosaccharides insolubles dans l'eau en 8 heures (Schéma 15).

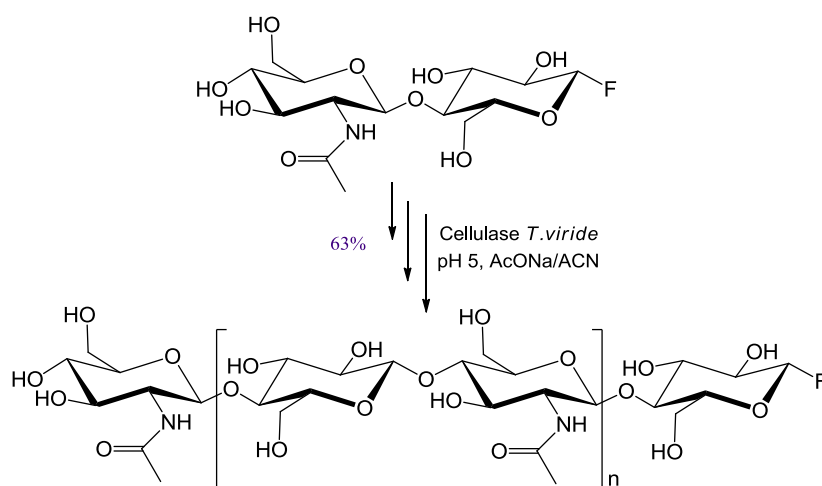


Schéma 15 : Autocondensation du GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F par une cellulase de *T.viride* d'après Kobayashi *et al.*^[231]

Ces exemples de réalisation de réaction de glycosylation avec cette cellulase attestent d'une certaine tolérance de l'enzyme vis-à-vis de la nature des donneurs et des accepteurs. Ainsi, en se basant sur les résultats de Kobayashi *et al.* mentionnés ci-dessus, il est raisonnable de penser que la cellulase ONOZUKA R-10 puisse accepter le disaccharide porteur d'une unité glucosamine protégée à l'extrémité non-réductrice pour

catalyser une réaction de transglycosylation. En s'appuyant sur ces données de la littérature, nous avons développé une stratégie de synthèse visant à produire dans un premier temps le disaccharide **22** portant un fluorure en position β (Figure 87), puis de réaliser la glycosylation avec un accepteur cellodextrine au moyen de la cellulase ONOZUKA.

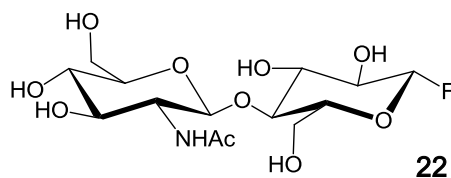


Figure 87 : GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F (**22**)

Afin de synthétiser le tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc)₃, il convient d'utiliser le cellobiose comme accepteur. La molécule pourra alors être synthétisée par synthèse par bloc 2+2. Puisque l'enzyme est une cellulase sauvage, elle n'est pas dépourvue de ses propriétés hydrolytiques comme l'est Cel7B E197A. Ainsi la synthèse du pentasaccharide GlcNHAc-(Glc)₄ se montrera plus complexe car plus le nombre de résidus de glucose augmente, meilleure est l'affinité de l'enzyme pour le produit de la réaction, qui devient alors plus sujet à l'hydrolyse. Dans ce type de réaction les oligosaccharides sont ainsi hydrolysés rapidement une fois formés, il est donc crucial de contrôler le paramètre temps pour limiter ce phénomène.

II.2.2.1. Synthèse du disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F

La synthèse de ce donneur a été menée à partir de la molécule **18** synthétisée précédemment. La fluoration en β du disaccharide peracétylé est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, la molécule **18** est soumise à un traitement à l'acide bromhydrique à 32% dans l'acide acétique afin de former l' α -bromure de disaccharide. Ensuite, ce produit est traité par du fluorure d'argent dans l'acétonitrile pour réaliser une réaction de substitution le β -fluorure de disaccharide **21** avec 73% de rendement (Schéma 16).

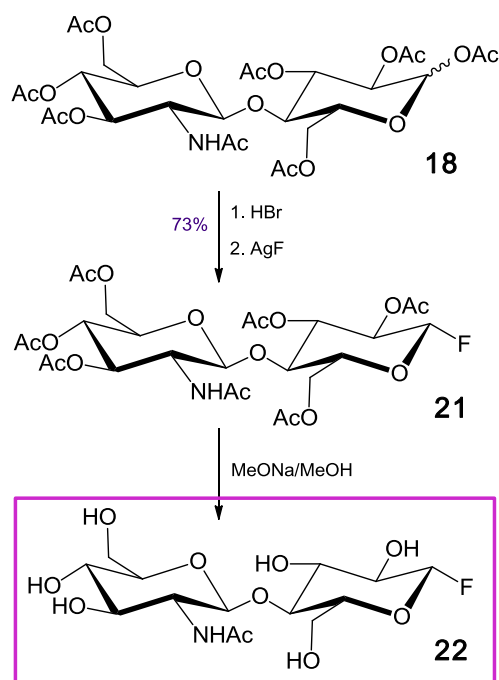


Schéma 16 : Synthèse du donneur GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F (**22**)

La dernière étape consiste en la déprotection du disaccharide peracétylé **21** par méthanolyse en présence de méthylate de sodium, pour former le donneur **22** (GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F) de manière quantitative. La molécule isolée a été caractérisée par spectrométrie de masse, ainsi que par spectrométrie RMN ^1H et ^{13}C . Sur le spectre ^1H , le doublet de doublet caractéristique du H_1 anomère β est observable à 5,25ppm avec les constantes de couplage $J_{1,2} = 7,3\text{Hz}$ et $J_{\text{H},\text{F}} = 53\text{Hz}$. De plus, sur le spectre ^{13}C le signal du C_1 anomère portant le fluorure possède un déplacement chimique à 110ppm et une constante de couplage $J_{\text{C},\text{F}} = 210\text{ Hz}$, qui confirment la présence du fluorure en β .

Le rendement global de ces 3 étapes de préparation s'élève à 73% à partir du disaccharide **18**. Ce rendement est supérieur à celui obtenu pour la synthèse du disaccharide **20**, avec le fluorure en α (55%) réalisée par un traitement à l'acide fluorhydrique à partir d'un mélange d'isomères α/β . En effet, pour fonctionnaliser la molécule avec un β -fluorure, deux étapes sont nécessaires avec dans un premier temps la bromation en α du disaccharide, qui permet ensuite la fluoration en β par substitution (73%). Avec la méthode à l'acide fluorhydrique, bien que les conditions employées tendent à favoriser la formation du fluorure en α , un mélange d'isomères est toujours formé.

Le disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F ainsi synthétisé va permettre la réalisation d'essais de glycosylation sur l'accepteur cellobiose par la cellulase ONOZUKA R-10 de *T. viride*.

II.2.2.2. Transglycosylation du disaccharide GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F sur le cellobiose

Afin de favoriser la transglycosylation, il convient de travailler en milieu concentré en réactifs et en solvant hydroorganique comme détaillé précédemment. Les réactions ont donc été menées dans un mélange à 80% d'acétonitrile dans l'eau, à 30°C. Les concentrations moyennes en réactifs utilisées sont de 65mM de donneur, et en cellulases de 0,04mg/mM de donneur. Les réactions sont suivies par CCM et stoppées après disparition totale du donneur par dénaturation thermique de l'enzyme. Après passage sur charbon actif pour éliminer l'enzyme et les sels, le mélange réactionnel est purifié par SEC sur Biogel P2 afin d'isoler le tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc)₃ (**23**). Les résultats sont représentés dans le Tableau 14 :

Entrée	Donneur	Nombre d'équivalents d'accepteur	Temps (heure)	Rendement (%)	Observations
1	22 (1éq.)	Cellobiose (1éq.)	24h	22%	
2	22 (1éq.)	Cellobiose (1,2éq.)	3h	31%	
3	22 (1éq.)	Cellobiose (2éq.)	2,5h	36%	
4	22 (1éq.)	Cellobiose (2,5éq.)	2,5h	52%	
5	22 (1éq.)	Cellotriose (1éq.)	24h	/	hydrolyse lente du donneur
6	22 (1éq.)	-			Formation de (GlcNHAc-Glc) ₂ et GlcNHAc-Glc-GlcNHAc

Tableau 14: Récapitulatif des résultats de glycosylation avec la cellulase ONOZUKA R-10

La cellulase ONOZUKA R-10 a catalysé la réaction de glycosylation du donneur GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F sur le cellobiose pour former le tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc)₃ (**23**).

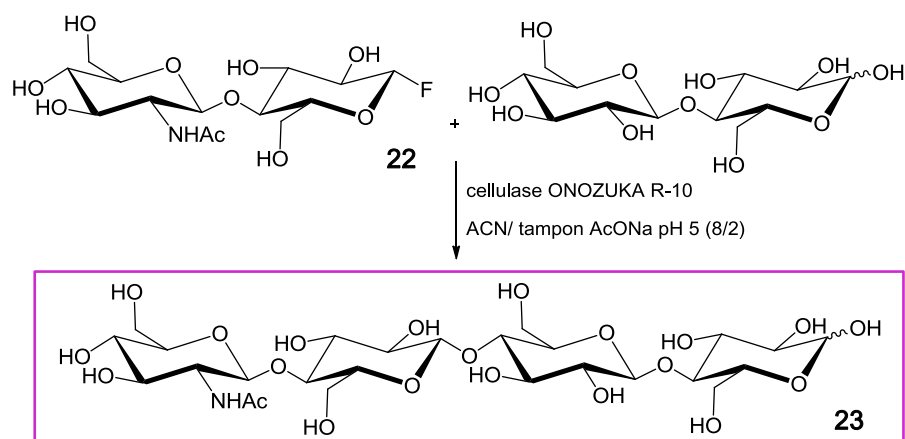


Schéma 17 : Synthèse du tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc)₃ (23) par la cellulase sauvage ONOZUKA

Des rendements atteignant 52% en tétrasaccharide ont été obtenus en présence d'un excès de donneur à 2,5 équivalents (Tableau 14, entrée 4). Le mélange de produits formés est purifié efficacement par SEC sur Biogel P2 (Figure 88) :

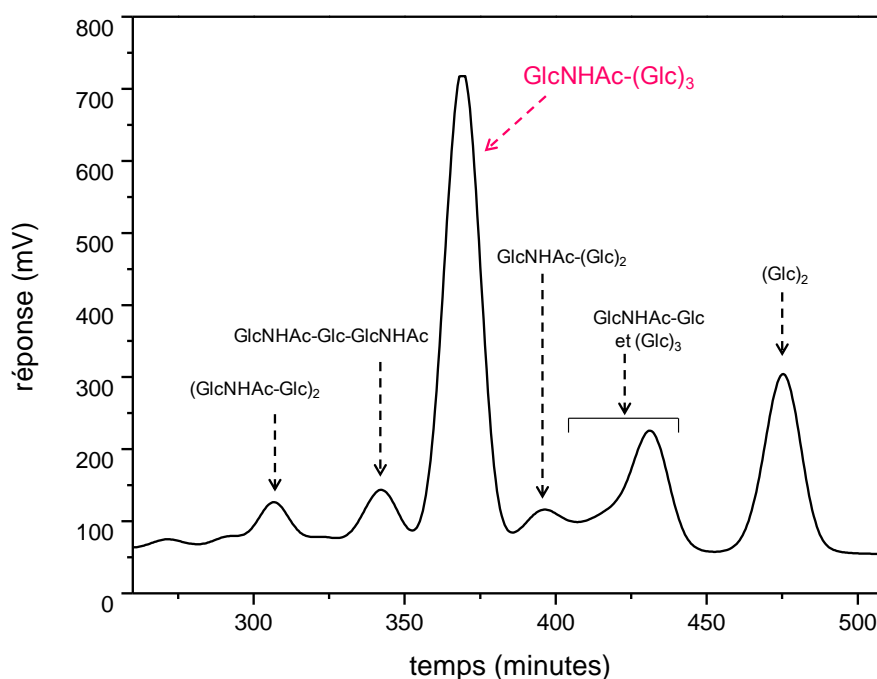


Figure 88 : Chromatogramme SEC du mélange réactionnel de transglycosylation avec la cellulase ONOZUKA R-10 (Tableau 14, entrée 4)

L'analyse par spectrométrie de masse ESI⁺ a permis de vérifier le poids moléculaire du tétrasaccharide isolé (Figure 89).

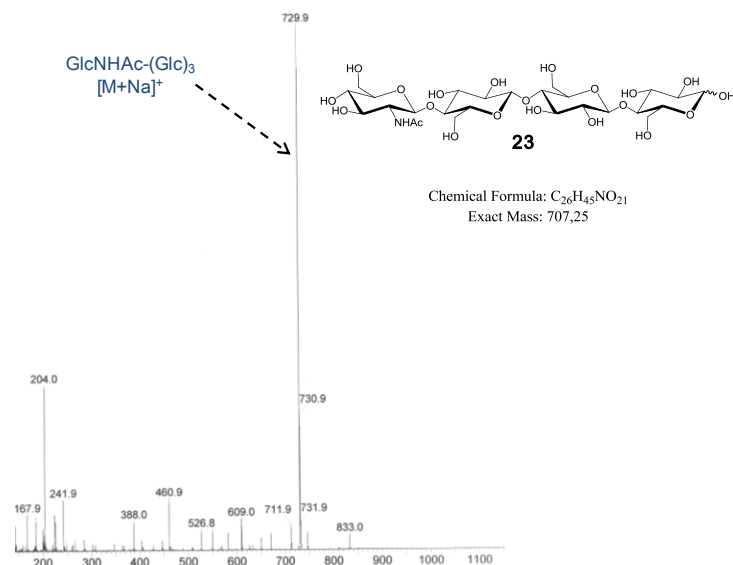
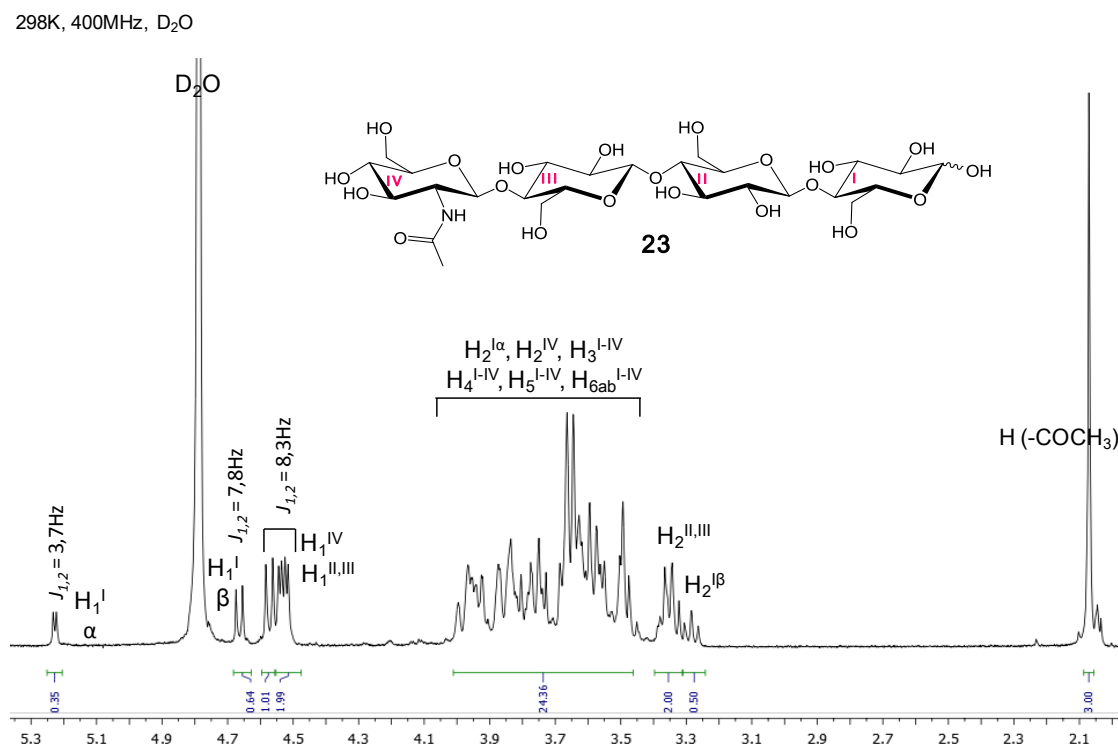


Figure 89 : Spectre ESI⁺ du tétrasaccharide (23) formé par transglycosylation du donneur (20) sur le cellobiose avec ONOZUKA R-10

La structure de la molécule a été confirmée par RMN ¹H et ¹³C, ainsi que par RMN 2D (COSY, HMBC).



Sur le spectre RMN ^1H représenté en Figure 90, on distingue les protons anomère α et β à $\delta = 5,2\text{ppm}$ et $4,65\text{ppm}$ de l'unité réductrice, les signaux caractéristiques liés à l'acétamide à $\delta = 2,1\text{ppm}$ de l'unité non réductrice ainsi que les protons $\text{H}_2, \text{H}_3, \text{H}_4, \text{H}_5, \text{H}_{6\text{ab}}$ des 4 unités dont le massif de signaux est compris entre $\delta = 3,3$ et $4,0\text{ppm}$.

Le spectre de RMN HMBC a permis de corréler les protons H_1 engagés dans les liaisons osidiques. En effet, suivant s'ils sont engagés dans une liaison osidique, les carbones ont des déplacements chimiques différents. Pour une liaison entre unités glucosidiques, un carbone impliqué dans une liaison $\beta(1-4)$ a un déplacement chimique autour de 80ppm . Pour une liaison en $\beta(1-3)$ le déplacement attendu se situe autour de 85ppm et pour une liaison $\beta(1-6)$ autour de 68ppm ^[232]. Ainsi sur l'agrandissement du spectre HMBC représenté en Figure 89, les H_1 corrélerent uniquement avec des carbones situés dans la zone verte correspondant aux C_4 liés en $\beta(1-4)$. Plus particulièrement, le H_1^{III} corrélerent bien avec le C_4^{II} , démontrant ainsi la configuration de la liaison en $\beta(1-4)$ entre les unités II et III.

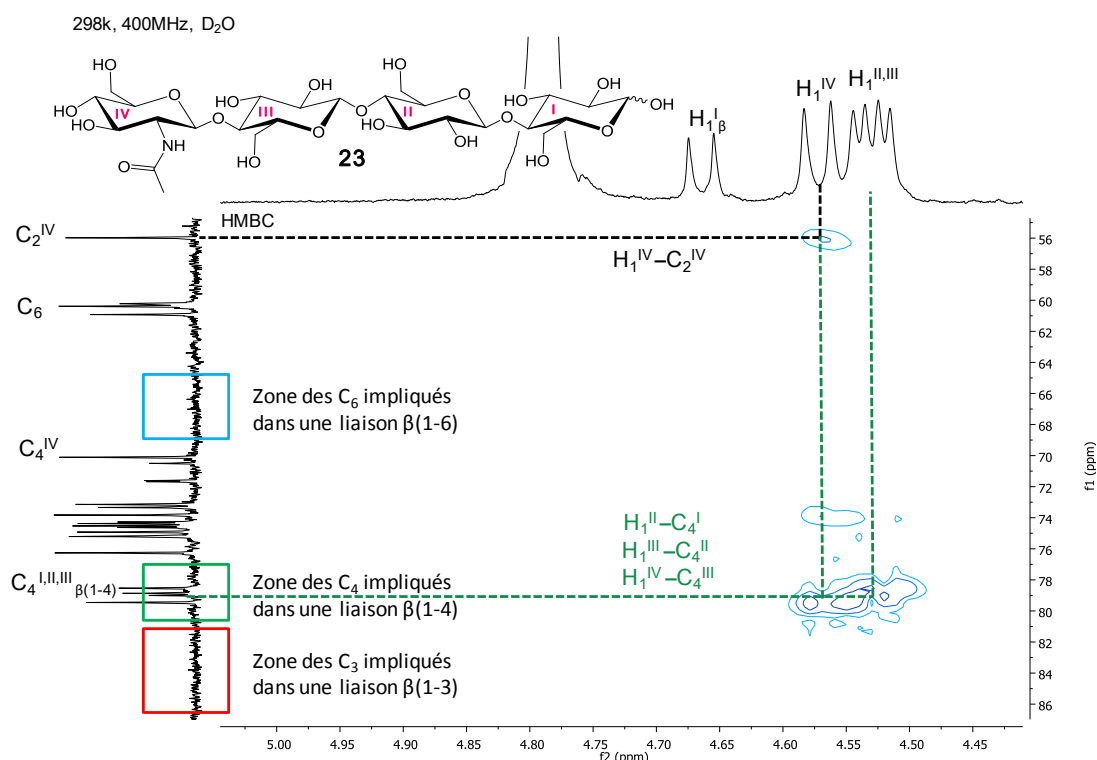


Figure 91 : Spectre partiel RMN HMBC du tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc)₃ (23)

En couplant les résultats obtenus avec la RMN ^1H et HMBC, les carbones ont pu être attribués. Sur le spectre de RMN ^{13}C représenté en Figure 92, les C_1 α/β de l'unité réductrice sont distinguables à $96,1$ et $92,2\text{ppm}$ respectivement. Le tétrasaccharide est

en mélange d'isomères α/β , cependant les carbones de l'unité réductrice en configuration anomère α sont identifiables par leurs intensités de pics plus faibles. Les déplacements chimiques des C_4 de la molécule sont caractéristiques des liaisons $\beta(1-4)$ entre les unités glucose à environ 80ppm et 70ppm pour l'unité réductrice. De plus, comme décrit plus haut l'absence de pics dans les zones autour de 85 ppm et 68ppm excluent la présence de carbones impliqués dans des liaisons osidiques $\beta(1-3)$ et $\beta(1-6)$ respectivement.

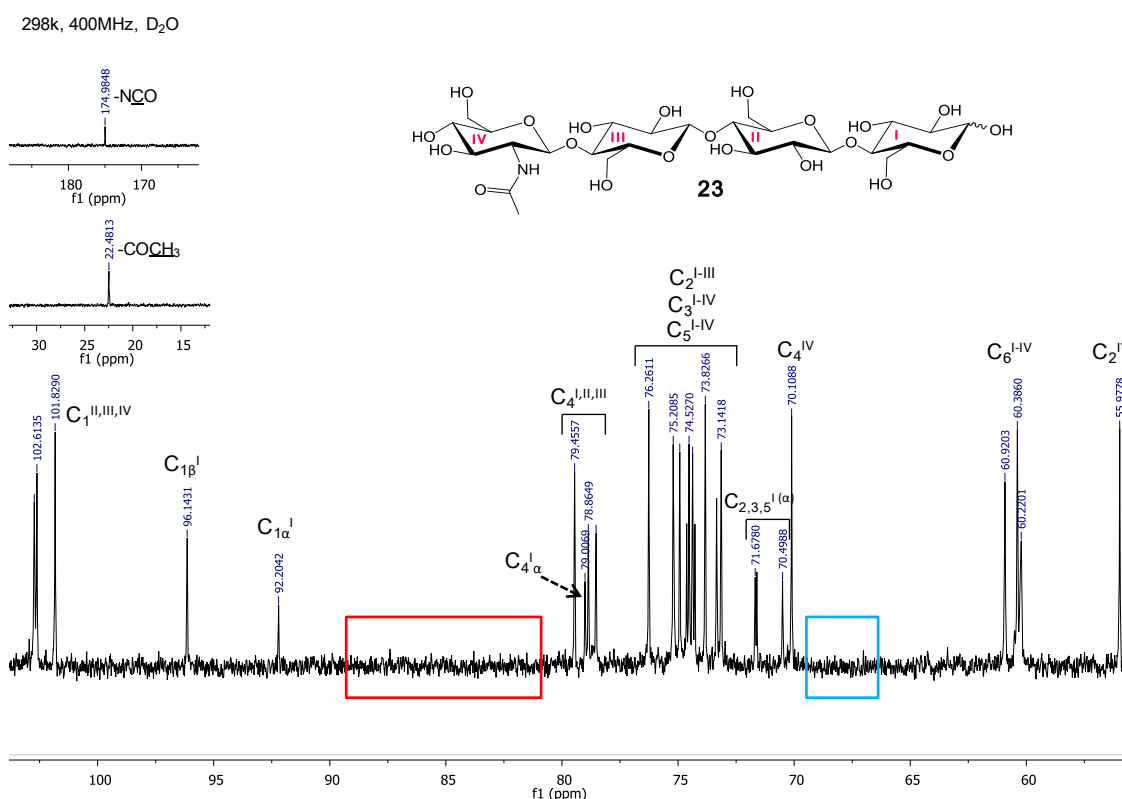


Figure 92 : Spectre RMN ^{13}C du tétrasaccharide $\text{GlcNHAc}-(\text{Glc})_3$ (23)

La cellulase a donc bien réalisé la transglycosylation en $\beta(1-4)$ exclusivement.

Lors de la réaction, des produits secondaires sont formés. Le donneur peut être glycosylé avec l'accepteur en présence, mais il peut aussi être sujet à l'autocondensation et former des oligosaccharides de motif $(\text{GlcNHAc-Glc})_n$. La purification et l'analyse qualitative par spectrométrie de masse des fractions issues de l'essai de glycosylation avec le donneur seul (Tableau 14, entrée 6) ont permis de confirmer la formation d'autres espèces que le tétrasaccharide. Les masses déterminées indiquent qu'il peut s'agir d'oligomères de type $(\text{GlcNHAc-Glc})_2$; GlcNHAc-Glc

GlcNHAc ou GlcNHAc-Glc. La cellulase hydrolyse préférentiellement les oligosaccharides composés d'au moins 4 unités. Ainsi, les oligomères formés sont susceptibles d'être hydrolysés. Plus le nombre d'unités composant l'oligosaccharide est important, plus il sera sujet à l'hydrolyse. En revanche, des tests complémentaires qualitatifs d'hydrolyse de cellodextrines au moyen de cette cellulase ont été réalisés afin de contrôler l'activité hydrolytique de l'enzyme sur de tels substrats. Il en résulte que l'enzyme possède une faible activité hydrolytique sur le cellobiose et le cellotriose. Après plus de 12h, les réactions d'hydrolyse engendrent en une faible production de glucose. La réaction de transglycosylation pour la synthèse du précurseur étant rapide (< 3 heures), l'hydrolyse du tétrasaccharide **23** ne devrait alors être que minime.

L'essai de transglycosylation avec le cellotriose (Tableau 14, entrée 5) n'a pas permis d'observer la formation de pentasaccharide. L'analyse en spectrométrie de masse ESI⁺ du mélange réactionnel après 24h ne révèle pas la présence du pentasaccharide GlcNHAc-(Glc)₄ désiré. Le spectre de masse en Figure 93 atteste cependant de la présence de cellotriose, de GlcNHAc-β(1-4)-Glc-βF et de GlcNHAc-β(1-4)-Glc pouvant provenir de l'hydrolyse du donneur ou de l'hydrolyse des oligosaccharides issus de l'autocondensation de (GlcNHAc-β(1-4)-Glc)_n.

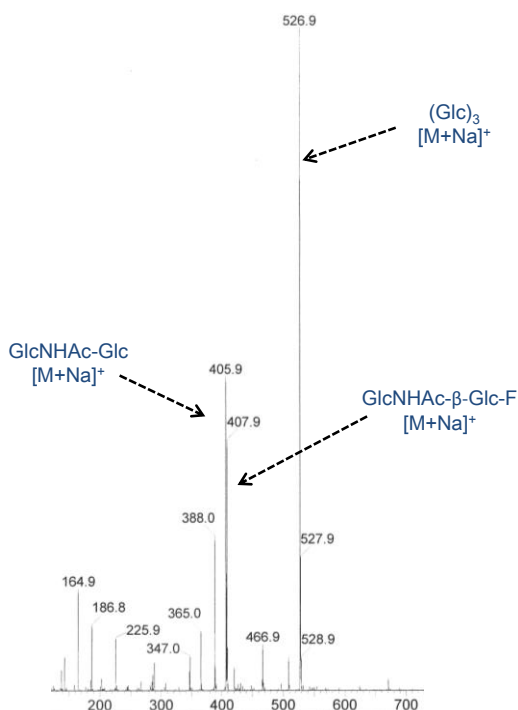


Figure 93 : Spectre ESI⁺ du mélange réactionnel de l'essai de transglycosylation de GNAc-β(1-4)-Glc-βF et du cellotriose avec ONOZUKA R-10 (Tableau 14, entrée 5)

La synthèse du tétrasaccharide **23** par glycosylation sur une cellodextrine a été réalisée avec la cellulase ONOZUKA R-10 de *T. viride*. Un rendement atteignant 52% a été obtenu dans les conditions décrites. Cette stratégie de transglycosylation au moyen d'une cellulase commerciale engendre la production d'autres produits de transglycosylation et d'hydrolyse. La méthode de purification du tétrasaccharide par une combinaison d'adsorption sur charbon actif suivie d'une purification par SEC permet d'isoler le produit pur. Cette synthèse offre de bons rendements pour une réaction de transglycosylation. Ils sont en accord avec les résultats de Kobayashi *et al.* qui ont obtenu des rendements du même ordre pour l'autocondensation du même donneur^[231]. Il semble que la cellulase ait une activité hydrolytique importante sur les cellodextrines d'au moins 4 unités, et les produits formés par transglycosylation sont hydrolysés rapidement. Cette méthode de transglycosylation avec la cellulase sauvage ONOZUKA T-10 ne paraît donc pas appropriée pour la synthèse du pentasaccharide GlcNHAc-(Glc)₄ en grandes quantités.

Afin de posséder d'autres outils de synthèse pour préparer le tétrasaccharide **23** mais aussi le GlcNHAc-(Glc)₄ nous avons exploré en parallèle d'autres approches de synthèse enzymatique.

II.3. Synthèse du squelette par la β -N-acétyl-hexosaminidase d'*Aspergillus oryzae*

II.3.1. Transglycosylations catalysées par une β -N-acétyl-hexosaminidase

Les β -N-acétyl-hexosaminidases sont des enzymes de la famille des glycoside-hydrolases décrites dans la littérature pour leur capacité à catalyser des réactions de transglycosylation à partir de donneurs 2-acétamido-2-désoxy-glycosides. En particulier, de nombreuses références reportent les capacités de la β -N-acétyl-hexosaminidase d'*Aspergillus oryzae* à catalyser le transfert d'un β -GlcNHAc sur des accepteurs de glycoside différents^[233, 234]. Singh *et al.* ont décrit la synthèse d'oligomères de chitine par autocondensation d'un donneur 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranoside de *p*-nitrophényle (GlcNHAc- β pNP) catalysée par la β -N-acétyl-hexosaminidase d'*Aspergillus oryzae* en milieu tamponné^[235]. De même avec un accepteur 2-acétamido-2-désoxy- α -D-

glucopyranoside de méthyle, où la transglycosylation permet l'obtention d'un unique disaccharide de liaison $\beta(1-4)$ avec 51% de rendement.

Cette enzyme a la capacité de transglycosyler à partir d'accepteurs de type 2-acétamido-2-désoxy-glycosyde. Cependant, lorsque celui-ci ne porte pas de groupement amine la transglycosylation semble plus complexe. En effet, la catalyse de l'enzyme peut dépendre de plusieurs paramètres tels que la nature du glycoside mais aussi la nature et la configuration du groupement anomère. Ainsi Ogata *et al.* ont évalué l'influence de ce groupement sur les rendements de glycosylation avec un accepteur α -D-glucoside (Schéma 18).

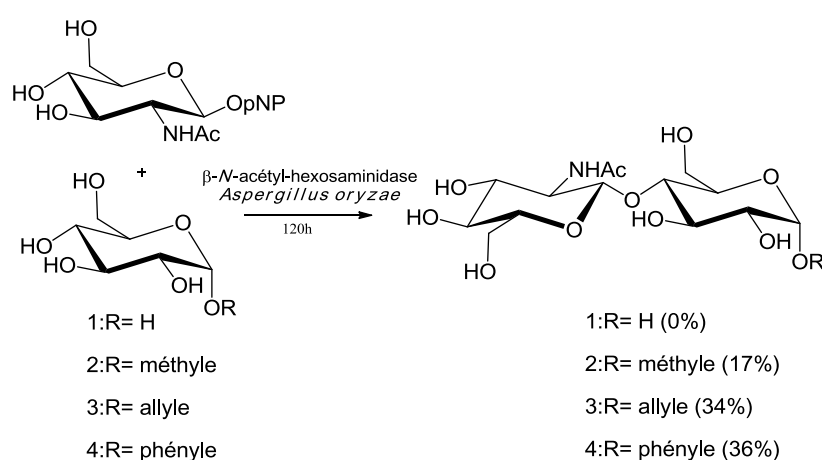


Schéma 18 : Transglycosylation catalysée la β -N-acétyl-hexosaminidase d'*A.oryzae* du GlcNHAc- β pNP avec différents accepteurs en série α -D-glucoside, d'après Ogata *et al.*^[235]

Les résultats obtenus illustrent clairement l'influence du groupement sur l'efficacité de la catalyse. Parallèlement les mêmes essais de transglycosylation avec un accepteur en série 2-acétamido-2-désoxy-glucoside ont été réalisés et les rendements obtenus sont améliorés d'un facteur deux par rapport à la série glucoside. Cette observation atteste que le GlcNHAc est un bon accepteur pour la transglycosylation car c'est l'accepteur naturel de l'enzyme, néanmoins l' α -glucoside est également un bon accepteur. Il existe très peu d'exemples de glycosylation avec un accepteur β -glucoside dans la littérature. Yasukochi *et al.* ont décrit une réaction de transfert en milieu tamponné d'un GlcNHAc- β pNP sur un β -D-glucoside de *p*-nitrophényle (Glc- β pNP) pour former le disaccharide GlcNHAc- $\beta(1-4)$ -Glc- β pNP avec un rendement de 2%^[236]. Bien que la glycosylation avec un accepteur β -glucoside ne semble conduire qu'à un très faible rendement, nous avons cherché à déterminer s'il est possible d'utiliser les cellodextrines en tant qu'accepteur pour la glycosylation.

II.3.2. Transglycosylation d'une unité GlcNHAc sur une cellodextrine par la β -N-acétyl-hexosaminidase d'*A.oryzae*

En s'appuyant sur les travaux décrits précédemment, des essais de transglycosylation d'un donneur GlcNHAc- β pNP sur des accepteurs cellodextrine ont été menés. A notre connaissance, il n'existe pas de travaux dans la littérature décrivant la transglycosylation d'un tel donneur sur une cellodextrine. La finalité de la synthèse étant de produire le tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc)₃ (**23**) ou le pentasaccharide GlcNHAc-(Glc)₄, il convient d'utiliser les accepteurs cellotriose et cellotétraose pour la transglycosylation.

Dans un premier temps, des essais préliminaires ont été réalisés avec différents accepteurs reportés dans la littérature afin d'évaluer l'activité de l'enzyme et déterminer les conditions de travail à adopter. Ensuite, des essais sur les cellodextrines ont été conduits. Les accepteurs utilisés sont le GlcNHAc, le β -D-galactoside de propyle (Gal- β -OProp), l' α -D-galactoside de méthyle (Gal- α -OMe), le β -D-glucoside de méthyle (Glc- β -OMe), le cellobiose (Glc)₂ et le cellotriose (Glc)₃ et sont représentés en Figure 94.

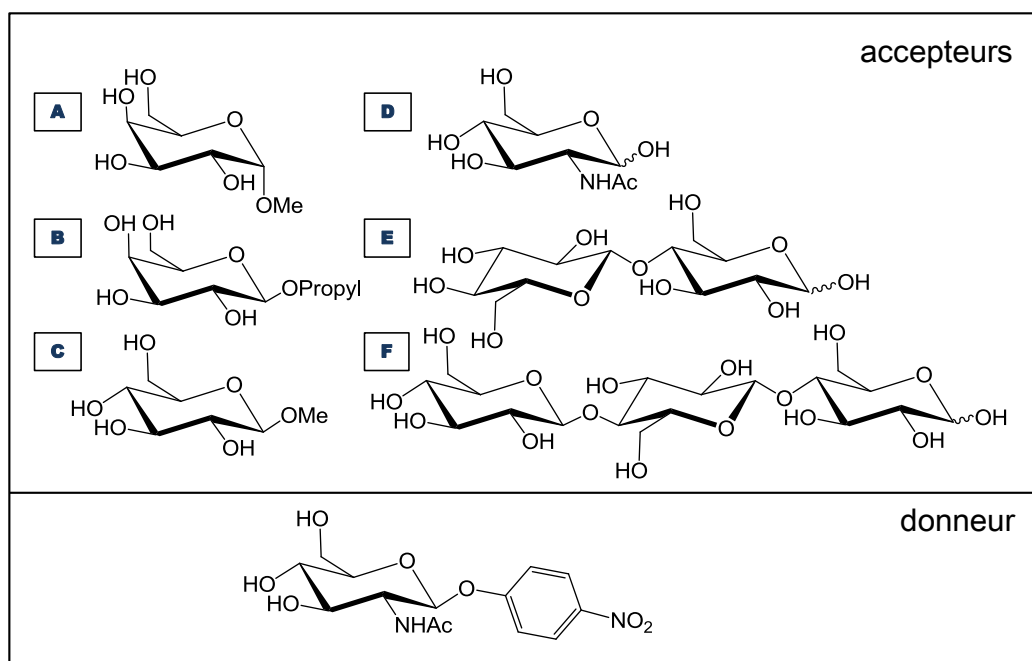


Figure 94 : Accepteurs et donneur testés pour la transglycosylation sur le GlcNHAc- β pNP avec la β -N-acétyl-hexosaminidase d'*A.oryzae*

Les essais ont été évalués par CCM, et par analyse du mélange réactionnel final par spectrométrie de masse ESI⁺. Les réactions sont conduites en solution tamponnée à 0,05M ou en mélange acétonitrile/tampon (1/5) à une concentration en enzyme de 1U par mmol de donneur soit 0,1mg d'enzyme par mmol de donneur. Les résultats sont représentés dans le Tableau 15 (où P: tampon phosphate, C: tampon citrate) :

Entrée	Accepteur (équivalent)	solvant	enzyme	T°C	Temps	Observation
1	/	P (pH6,5)	1U	30	24h	(GlcNHAc) _n ✓
2	/	ACN/C (pH4,6)	40U	30	21h	GlcNHAc ✗
3	A (17éq.)	ACN/C (pH4,6)	40U	30	21h	GlcNHAc ✗
4	B (1éq.)	ACN/C (pH4,6)	40	30	21h	GlcNHAc-Gal-β-OProp ✓
5	C (1éq.)	ACN/C (pH5,5)	40	40	24h	GlcNHAc ✗
6	C (1éq.)	ACN/P (pH6,0)	40	40	24h	GlcNHAc-GlcNHAc-βpNP ✗
7	C (1éq.)	ACN/P (pH6,5)	40	40	24h	GlcNHAc-GlcNHAc-βpNP ✗
8	C (6éq.)	ACN/P (pH6,5)	40	40	24h	GlcNHAc-Glc-β-OMe ✗
9	D	P (pH6,5)	1	30	24h	GlcNHAc + GNac-GNac ✓
10	D	ACN/P (pH6,5)	2	30	40h	GlcNHAc + (GlcNHAc) ₂ ✓
11	E (1éq.)	P (pH6,5)	1	30	24h	GlcNHAc ✗
12	E (10éq.)	P (pH6,5)	1	30	24h	GlcNHAc ✗
13	E (1éq.)	ACN/P (pH6,5)	1	30	24h	GlcNHAc ✗
14	E (1éq.)	ACN/P (pH6,5)	2	30	40h	GlcNHAc ✗
15	F (5éq.)	P (pH6)	8	30	24h	GlcNHAc ✗
16	F (5éq.)	P (pH6)	8	30	96h	GlcNHAc ✗

Tableau 15 : Récapitulatif des résultats des essais de transglycosylation des accepteurs A-F avec le β-GlcNHAc-pNP catalysés par la β-N-acétylhexosaminidase d'*A.oryzae*

Les résultats reportés dans le Tableau 15 indiquent si le produit attendu est formé (✓), et le cas échéant (✗) indique les produits observés. Ces résultats montrent que la β-N-acétyl-hexosaminidase d'*A.oryzae* permet la transglycosylation sur l'accepteur GlcNHAc pour former le disaccharide (GlcNHAc)₂, ainsi que sur l'accepteur Gal-β-OProp pour former le GlcNHAc-Gal-β-OProp (entrées 4, 9, 10).

Il s'est produit une réaction de transglycosylation avec l'accepteur β-Gal mais pas avec l'accepteur β-Glc. Le glucose et le galactose diffèrent par la configuration en axiale ou équatoriale de l'hydroxyle en position 4. La différence de réactivité pourrait être due à un positionnement différent de l'accepteur au sein du site actif de l'enzyme, résultant alors en des interactions différentes. De manière qualitative, le transfert semble se réaliser de manière plus efficace et plus rapide dans des conditions de solvants hydro-

organiques, à des pH supérieurs à 6. L'acétonitrile permet en outre d'améliorer la solubilité du GlcNHAc- β pNP ainsi que des produits formés.

Dans le Tableau 15 entrée 2, l'autocondensation du donneur sur lui-même n'est pas observée, seul le produit d'hydrolyse est présent dans le milieu. Ce résultat pourrait s'expliquer par un pH trop acide, défavorable à l'action de l'enzyme, et à la stabilité du groupement $-pNP$ du donneur. La transglycosylation sur la série glucose n'est pas concluante. En effet, il semble que l'enzyme ne soit pas en mesure de catalyser le transfert avec de tels accepteurs et dès lors on observe le produit de dégradation du donneur (GlcNHAc) ou la condensation du donneur sur lui-même. Ainsi la position du groupement anomère en configuration axiale ou en équatoriale a un rôle capital. Bien que les groupements en position anomère soient différents, pour une même série de glycoside et dans les mêmes conditions, les accepteurs Gal- β -OProp et Gal- α -OMe ont engendré des résultats opposés. En effet, l'enzyme a catalysé le transfert du Gal- β -OProp, mais n'a pas réalisé celui du Gal- α -OMe. Bien que ces résultats préliminaires ne soient pas encourageants, des essais de transfert avec les accepteurs cellodextrines **D** et **E** ont été réalisés. Ces tests (entrées 11 à 16) n'ont pas montré d'activité de transfert de l'enzyme, et seuls des produits de dégradation du donneur ont été observés.

Cette approche de synthèse du squelette saccharidique par la β -*N*-acétyl-hexosaminidase d'*A. oryzae* à partir de cellodextrines et de GlcNHAc- β pNP n'est pas satisfaisante. Même si les rendements de transglycosylation avec un β -glucoside annoncés dans littérature par Yasukochi et *al.* sont très faibles (2%), le cellobiose devrait être toléré en tant qu'accepteur. Nos résultats n'ont pas permis de détecter la formation de produit de transglycosylation par spectrométrie de masse, et si le produit s'est formé, les rendements extrêmement faibles ne permettraient pas d'utiliser cette méthode en synthèse.

Une seconde approche a été envisagée pour réaliser la synthèse, à partir d'une autre enzyme : le lysozyme de HEW (Hen Egg White). Celle-ci appartient à la même classe d'enzymes que la β -*N*-acétyl-hexosaminidase et possède également la caractéristique d'utiliser des donneurs 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucoside.

II.4. Synthèse du squelette avec du lysozyme

Le lysozyme est une glycoside-hydrolase. Il catalyse la coupure des liaisons $\beta(1-4)$ entre les unités de GlcNHAc des chito-oligosaccharides mais aussi entre les résidus d'acide *N*-acétylmuramique (MurNAc) et de GlcNHAc d'un polysaccharide structural des parois cellulaires protectrices de bactéries. Ainsi, le lysozyme que l'on retrouve en grande quantité dans le blanc d'œuf possède des propriétés anti-bactériennes occasionnées par son activité hydrolytique^[237]. Le lysozyme possède un long site catalytique de topologie crevasse composé de 6 sous-sites annotés de -4 à 2^[238]. Le site de coupure se situe entre les résidus -1 et 1, laissant ainsi 4 sous-sites pour la fixation du substrat (Figure 95).

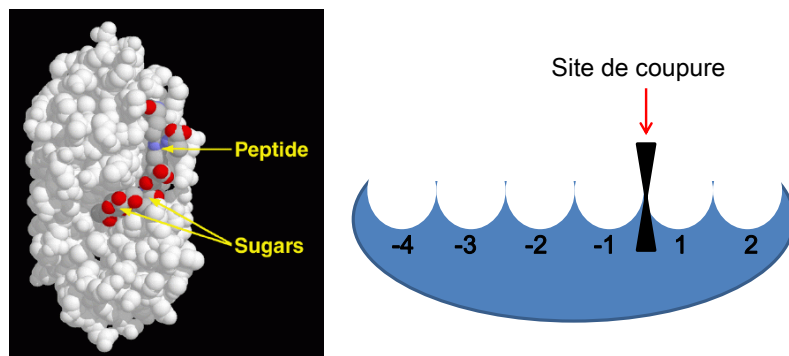


Figure 95 : Représentation graphique du site actif du lysozyme (simulation numérique (à gauche) extraite du site internet RCSB Protein Data Bank)

Afin d'être hydrolysé, le substrat est contraint par l'enzyme à se mettre dans une conformation distordue moins énergétique donc moins stable, permettant de faciliter l'hydrolyse^[239]. L'enzyme étant active sur plusieurs types de substrats, ses propriétés hydrolytiques diffèrent en fonction de la nature du substrat en position -1. Son activité est directement liée à la nature du substrat en raison des interactions substrat-enzyme mais aussi en raison de l'énergie nécessaire à son positionnement dans la conformation distordue. Ainsi, Zehavi *et al.* ont décrit les différences d'interactions du lysozyme avec les résidus MurNAc, GlcNHAc et les cellodextrines. Ils ont montré que les résidus GlcNHAc d'un oligomère composé de ces trois types de sucres sont plus facilement hydrolysés que les résidus MurNAc et enfin que les cellodextrines^[240]. De même, lorsque les sous-sites -4, -3 et -2 sont occupés, l'énergie nécessaire à un résidu de glucose pour se distordre est 1,5 fois plus importante que pour un résidu MurNAc ou GlcNHAc. Ainsi, bien que le lysozyme possède la capacité d'hydrolyser des résidus glucose dans une

certaines mesure, son activité sera supérieure et prioritaire sur ses substrats naturels que sont les oligomères de GlcNHAc et de MurNAc.

Dans certaines conditions, le lysozyme possède une activité de transglycosylation en prenant le chitobiose (GlcNHAc)₂ comme donneur. De nombreux travaux reportent la synthèse de chitooligosaccharides par transglycosylation du chitobiose catalysée par le lysozyme^[241, 242]. Pour exemple, Matahira *et al.* ont décrit la synthèse du disaccharide (GlcNHAc-β(1-4)-Man) par transfert du chitobiose sur l'hydroxyle en position 4 du mannose^[243] avec 21% de rendement. De même, ils ont également synthétisé le GlcNHAc-β(1-4)-GlcNHAc-βpNP à partir du GlcNHAc-βpNP comme accepteur.

D'après la littérature, les cellodextrines ont une affinité pour le lysozyme. De plus il a été montré que celui-ci possède une activité hydrolytique faible sur ces substrats en comparaison avec son substrat naturel le GlcNHAc^[239]. Les cellodextrines doivent ainsi pouvoir être utilisées comme accepteurs pour la transglycosylation et constituer de bons outils pour la synthèse du squelette saccharidique d'analogue de LCO ciblé. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps évalué l'activité du lysozyme en réalisant la synthèse de disaccharide composé d'une unité GlcNHAc à l'extrémité réductrice et d'une unité glucose portant un groupement -S-phényle (-SPh) en β à l'extrémité non-réductrice.

II.4.1. Synthèse d'un disaccharide GlcNHAc- Glc-β-SPh avec du lysozyme

En s'appuyant sur des conditions connues reportées dans la littérature, nous avons testé l'activité de transglycosylation du lysozyme sur le donneur chitobiose et l'accepteur β-glucoside de thiophényle (Glc-β-SPh)^[243]. Nous avons fait le choix d'utiliser un accepteur glucose portant un groupement thiophényle, cela pour plusieurs raisons. Les groupements aryle se comportent de façon similaire à une unité osidique dans le site actif des enzymes, ce sont des groupements dont le volume stérique est comparable à celui d'une unité sucre. De plus, la présence d'un groupement -S-phényle UV-visible sur la molécule finale permet de simplifier le suivi de la réaction, ainsi que la purification du mélange réactionnel. Nous avons donc réalisé plusieurs essais de transglycosylation avec des stoechiométries différentes en accepteur Glc-β-SPh. La réaction est réalisée à 37°C, à pH4,5 dans une solution de tampon acétate de sodium 0,05M. La réaction est

suivie par CCM, et stoppée par dénaturation thermique lorsque l'avancement de la réaction ne varie plus. Après réaction, le mélange est centrifugé pour éliminer l'enzyme et les sels. Le surnageant est ensuite purifié par chromatographie sur colonne C18 (SepPack) en éluant avec un gradient d'eau et de méthanol, puis par chromatographie sur gel de silice. Les résultats de transglycosylation obtenus sont regroupés dans le Tableau 16 :

Entrée	Nombre d'équivalents d'accepteur	Concentration en donneur (μM)	Temps (jours)	Concentration en lysozyme (mg/ μM donneur)	Rendement
1	4éq.	95	21	2,4	5%
2	5éq.	95	14	4,8	7%
3	4éq.	140	10	3,6	11%

Tableau 16 : Récapitulatif des résultats de transglycosylation du chitobiose et du Glc- β -SPh par le lysozyme

Ces résultats montrent que le lysozyme a la capacité de catalyser la transglycosylation entre un donneur chitobiose et un accepteur glucoside pour former le disaccharide GlcNHAc- β -Glc- β -SPh (**24**). Le poids moléculaire du disaccharide obtenu a été vérifié en spectrométrie de masse ESI⁺, et sa structure a été déterminée par spectrométrie RMN ¹H et ¹³C. Nous avons décelé la présence d'un mélange de deux isomères, composé de l'isomère GlcNHAc- β (1-3)-Glc- β -SPh et de l'isomère GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β -SPh. Le ratio de ces isomères a été déterminé à 1:3 par RMN du ¹H.

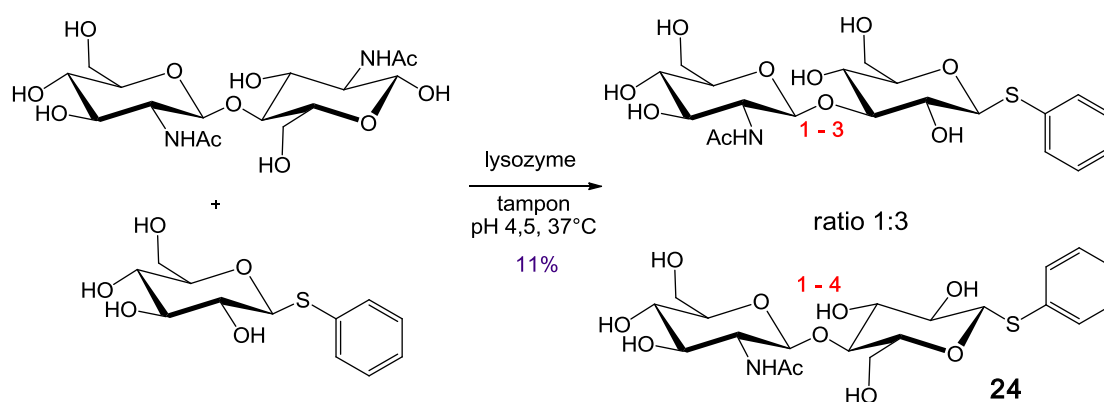


Schéma 19 : Réaction de transglycosylation du chitobiose et du Glc- β -SPh par le lysozyme

Sur le spectre de RMN ^1H représenté en Figure 96 certains signaux sont doublés et en particulier ceux des H_1 , indiquant ainsi la présence de 2 molécules.

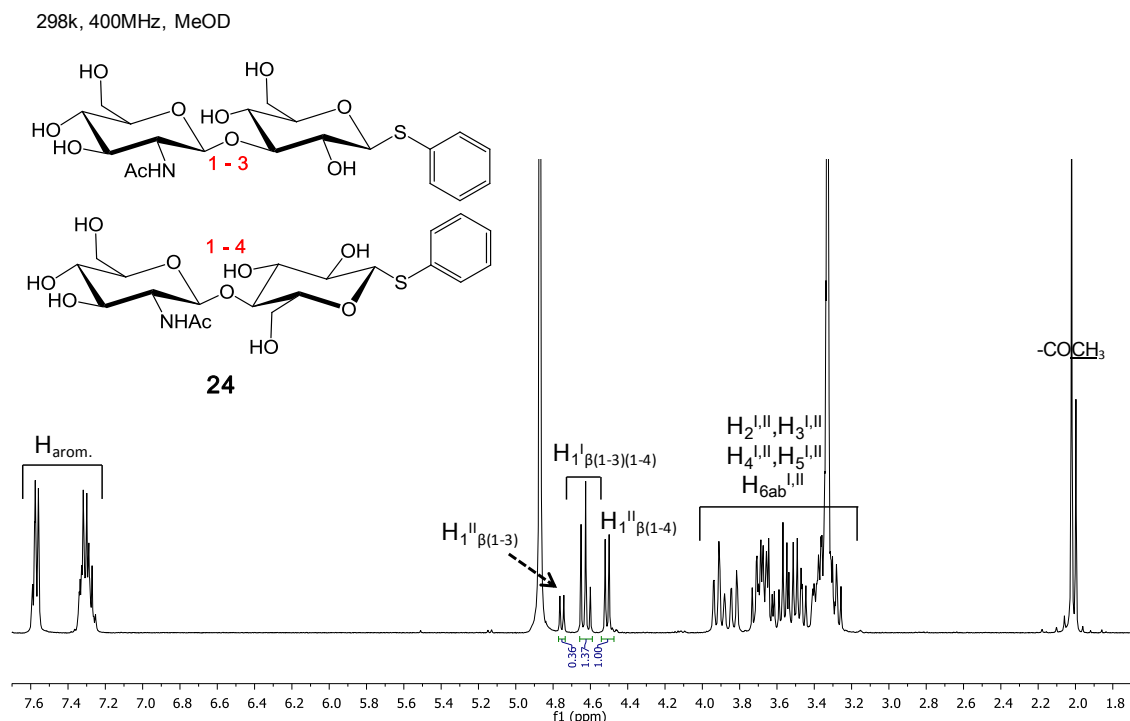


Figure 96 : Spectre RMN ^1H du mélange de disaccharides (24)

Le couplage des techniques de RMN ^{13}C et RMN HMBC, ont permis d'attribuer les pics caractéristiques associés à une liaison en $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$ des deux unités. Sur l'agrandissement du spectre HMBC représenté en Figure 97, les corrélations entre ($\text{H}_1^{\text{II}}-\text{C}_3^{\text{I}}$) et ($\text{H}_1^{\text{II}}-\text{C}_4^{\text{I}}$) ont pu être établies. Ainsi le C_3^{I} et le C_4^{I} impliqués dans la liaison ont un déplacement chimique de 87,8 et 80,9ppm respectivement, correspondant aux valeurs caractéristiques des déplacements chimiques associés.

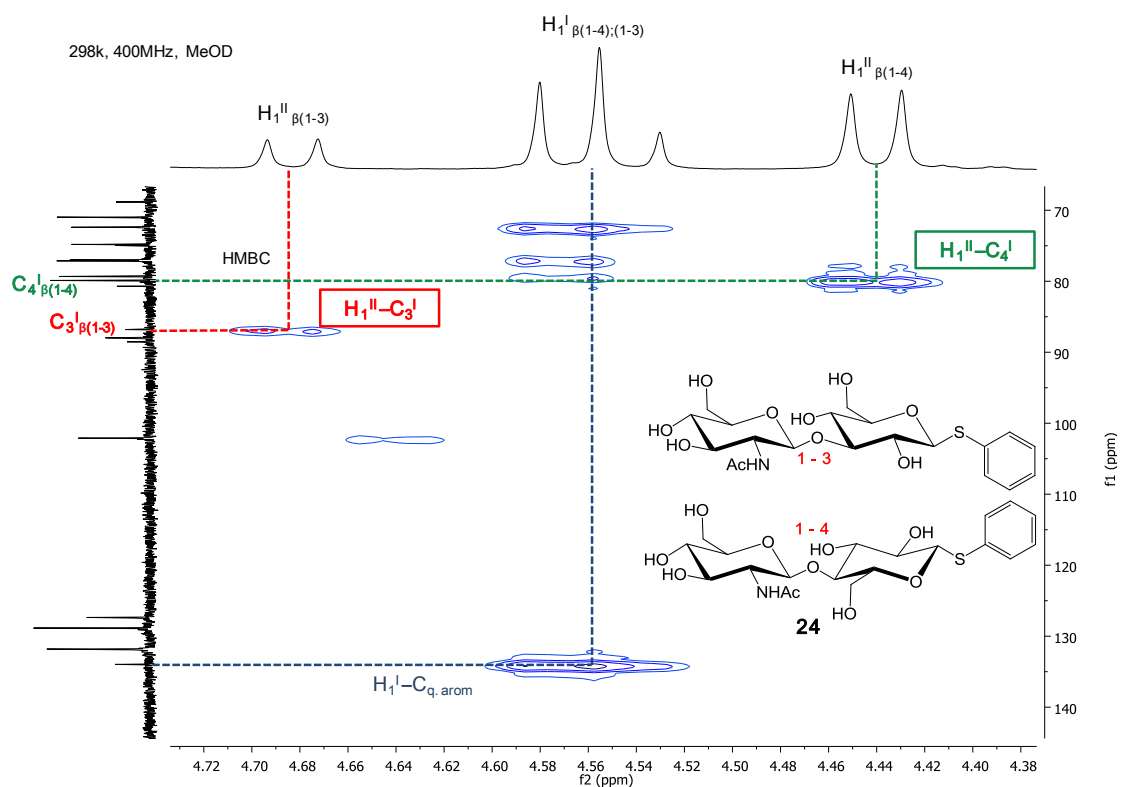


Figure 97 : Spectre partiel de RMN HMBC du mélange de disaccharides (24)

Matahira *et al.* ont décrit la formation exclusive de liaison $\beta(1-4)$ lors de la réaction de chitobiose avec le Glc- β pNP, avec un rendement de 6,5%. La formation d'un mélange d'isomères liés en $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$ a été décelée uniquement lors de la transglycosylation avec un Glc- α pNP avec un ratio 1:4 et un rendement de 2,5%^[243]. Les groupements -SPh et -pNP étant tous les deux de la classe des groupements aryle, cette différence de résultat est surprenante. Cependant, cette formation de liaison $\beta(1-3)$ pourrait être due à un positionnement différent de l'accepteur dans le site actif du lysozyme. En effet, il est possible que la molécule d'accepteur ait plus d'espace au sein du site en l'absence du groupement $-\text{NO}_2$. Cela pourrait entraîner une certaine liberté de mouvement de l'accepteur au sein du site actif et engendrerait la formation d'une liaison différente que celle naturellement formée en $\beta(1-4)$. Cette observation soulève l'importance de la nature et de la longueur de l'accepteur.

Des tests complémentaires de transglycosylation du chitobiose sur une molécule de glucose ainsi que sur une molécule de Glc- $\beta(1-4)$ -Glc- β pNP catalysés par le lysozyme ont été conduits à 37°C afin de vérifier l'influence de la taille de l'accepteur (Tableau 17). Le premier test a été mené en solution tamponnée acétate à pH4,5 à 0,05M tandis que la seconde en milieu hydroorganique dans un mélange à volume

équivalent de tampon et de dioxane. Le dioxane permet une meilleure solubilisation du Glc- β (1-4)-Glc- β pNP, et permet d'accélérer la cinétique de transglycosylation.

Entrée	Nombre d'équivalents d'accepteur	Concentration en donneur (μ M)	Temps (jours)	Concentration en lysozyme (mg/ μ M donneur)	Rendement
1	Glucose (4éq.)	95	21 jours	1,2	/
2	Glc- β (1-4)-Glc- β pNP (2,1éq.)	140*	7 jours	3,6	9%

*solvant : mélange tampon/dioxane 50/50

Tableau 17 : Récapitulatif des résultats de transglycosylation du chitobiose sur le glucose et sur le Glc- β (1-4)-Glc- β pNP avec le lysozyme

Ces tests réalisés n'ont montré aucune activité de transglycosylation avec le glucose comme accepteur. En revanche, avec l'accepteur Glc- β (1-4)-Glc- β pNP le lysozyme a catalysé la réaction de transglycosylation et le trisaccharide **25** (GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β (1-4)-Glc- β pNP) a été isolé avec un rendement de 9% (Schéma 20).

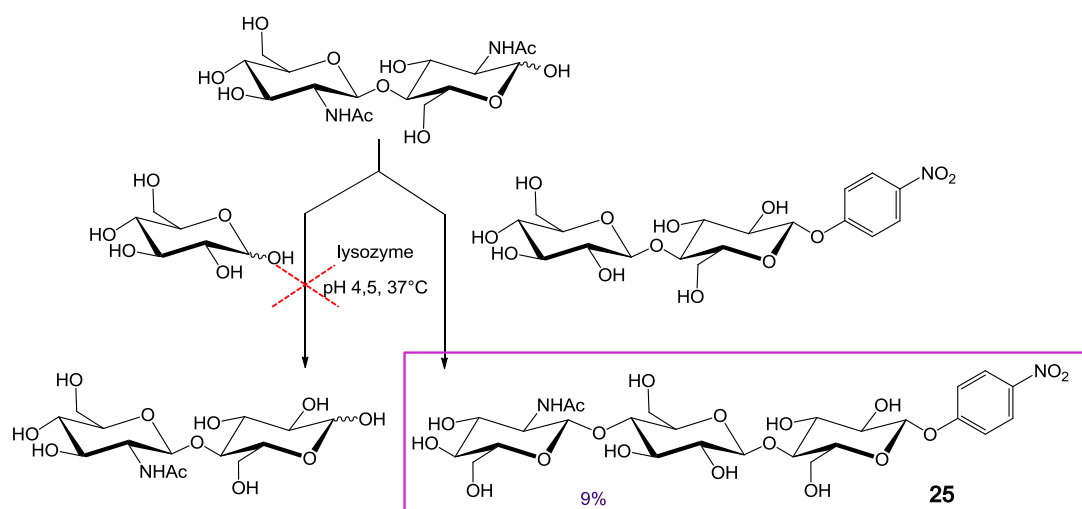


Schéma 20 : Réactions de transglycosylation du chitobiose sur le glucose et sur le Glc- β (1-4)-Glc- β pNP avec le lysozyme

Le poids moléculaire de la molécule **25** a été contrôlé par spectrométrie de masse ESI⁺, et la structure a été déterminée par RMN ¹H et ¹³C. Les spectres RMN ¹H et ¹³C représentés en Figure 98 et Figure 99 montrent la présence d'un seul isomère avec une liaison β (1-4).

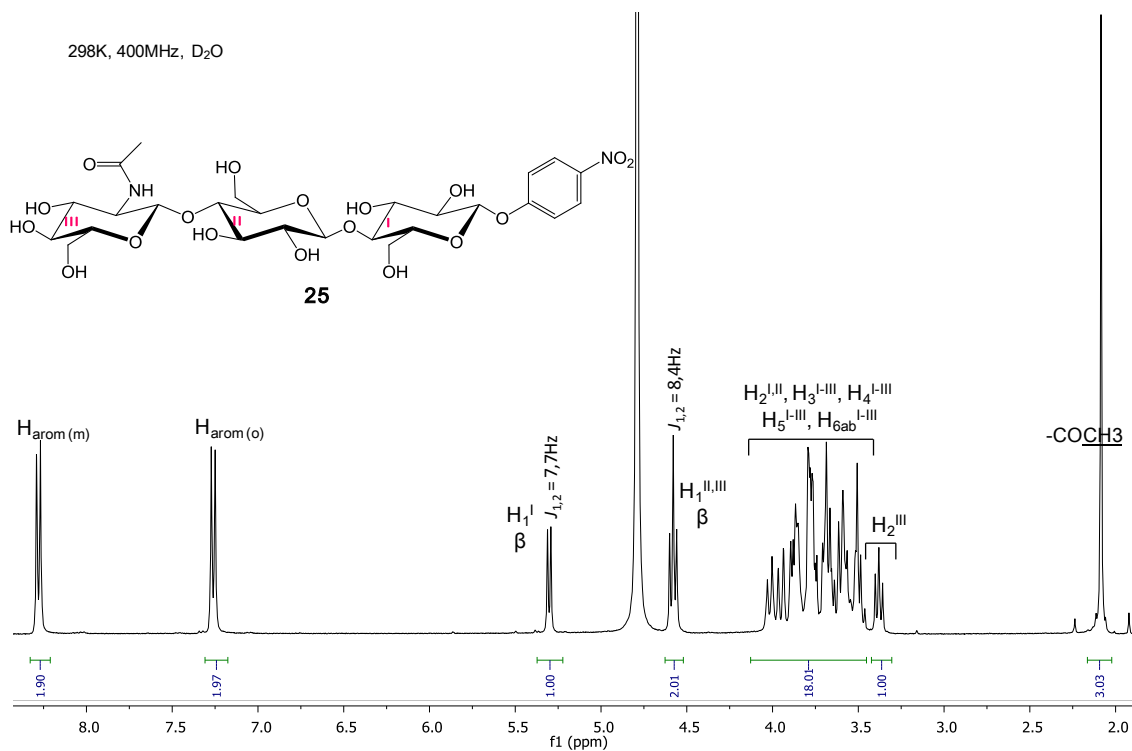


Figure 98 : Spectre RMN ¹H de GlcNHAc-β(1-4)-Glc-β(1-4)-Glc-βpNP (25)

Sur le spectre du ¹H, les protons H₁ des unités II et III possèdent une constante de couplage $J_{1,2}$ de 8,4Hz, caractéristique d'un couplage *trans* correspondant à une liaison en β tout comme leur déplacement chimique à $\delta = 4,57\text{ppm}$.

298K, 400MHz, D₂O

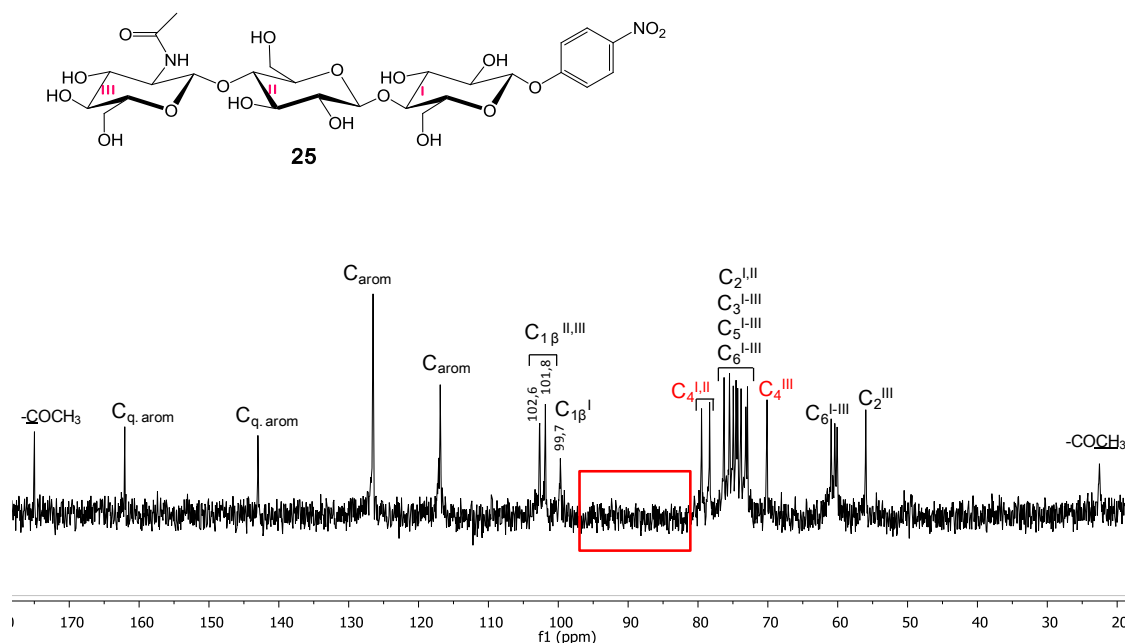


Figure 99 : Spectre RMN ¹³C de GlcNHAc-β(1-4)-Glc-β(1-4)-Glc-βpNP (25)

De même sur le spectre du ¹³C, où les déplacements chimiques des C₁ des unités I, II et III se trouvent aux alentours de 100ppm, ce qui est caractéristique d'une liaison osidique en β. Le spectre RMN ¹³C ne présente aucun pic ayant un déplacement chimique compris autour de 85ppm, caractéristique d'une liaison β(1-3) (zone en rouge). En revanche, en couplant les résultats de RMN 2D et 1D, l'attribution des carbones a pu être réalisée et l'implication des C₄ dans les liaisons osidiques a pu être démontrée. Ainsi, les deux pics à 78 et 79ppm correspondant aux C_{4^{I,II}} sont impliqués dans une liaison en β(1-4).

Ces résultats confirment l'hypothèse que le nombre de résidus osidiques qui composent l'accepteur a une influence sur le positionnement de celui-ci au sein du site actif. En continuation de ces travaux, nous avons donc mené des essais de transglycosylation afin de former le tétrasaccharide précurseur GlcNHAc-(Glc)₃.

II.4.2. Synthèse du tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc)₃ avec du lysozyme

En s'appuyant sur les travaux décrits précédemment, la synthèse du tétrasaccharide (23) GlcNHAc-(Glc)₃ a été réalisée au moyen du lysozyme avec le chitobiose comme donneur, et le cellotriose (Glc)₃ comme accepteur. Les synthèses ont

été menées à 37°C, dans le tampon acétate de sodium 0,05M à pH 4,5 et en milieu hydroorganique constitué d'un mélange de tampon et de dioxane (50/50), avec une concentration à 120µM de donneur. Lorsque le suivi par CCM indique que la réaction n'évolue plus, celle-ci est stoppée par dénaturation thermique de l'enzyme. Le milieu réactionnel est ensuite centrifugé pour éliminer l'enzyme et les sels insolubles. Le surnageant est purifié successivement par adsorption sur charbon actif puis par purification SEC sur Biogel P2. L'étape d'adsorption sur charbon permet de s'affranchir des sels, mais aussi d'une partie des réactifs n'ayant pas réagi rendant ainsi la purification par chromatographie plus facile. Les résultats de transglycosylation obtenus sont rassemblés dans le Tableau 18 :

Entrée	Nombre d'équivalents d'accepteur	Concentration en donneur (µM)	Temps (jours)	Concentration en lysozyme (mg/ µM donneur)	Rendement
1	3,5éq.	Tampon AcONa	14 jours	3	7%
2	2,1éq.	AcONa/dioxane	5 jours	3,6	9%
3	1,9éq.	AcONa/dioxane	4 jours	3,6	8%
4	1,7éq.	AcONa/dioxane	4 jours	3,6	12%
5	1,8éq.	AcONa/dioxane	4 jours	3,6	13%

Tableau 18 : Récapitulatif des résultats de transglycosylation du chitobiose sur (Glc)₃ avec le lysozyme

Ainsi, dans les conditions reportées dans le Tableau 18 (entrée 5) le tétrasaccharide **23** (GlcNHAc-(Glc)₃) a été isolé avec un rendement de 13 % en 4 jours.

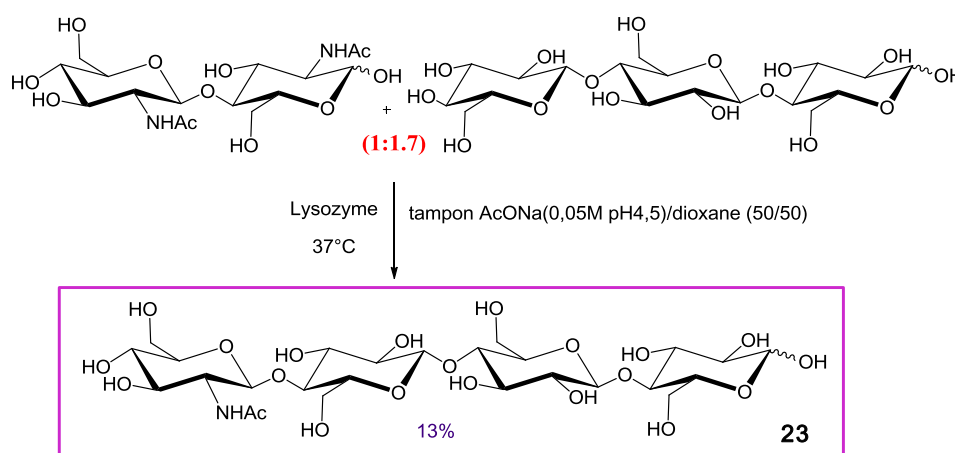


Schéma 21 : Synthèse de GlcNHAc-(Glc)₃ (23) avec le lysozyme

Le poids moléculaire du tétrasaccharide **23** a été contrôlé par spectrométrie de masse, puis sa structure vérifiée par RMN ^1H et ^{13}C . Les résultats correspondent avec la structure décrite précédemment. Les réactions menées dans des conditions de solvant hydroorganique (entrées 2 à 4) offrent de meilleurs rendements et sont surtout beaucoup plus rapides qu'une réaction réalisée en milieu tamponné seul (entrée 1). Des produits correspondant à la polymérisation et à l'hydrolyse du chitobiose, mais aussi des produits de dégradation des molécules formées sont présents dans le milieu réactionnel. L'analyse qualitative de certaines fractions isolées après purification sur Biogel P2 a permis d'identifier ces espèces, comme représenté sur le chromatogramme en Figure 100.

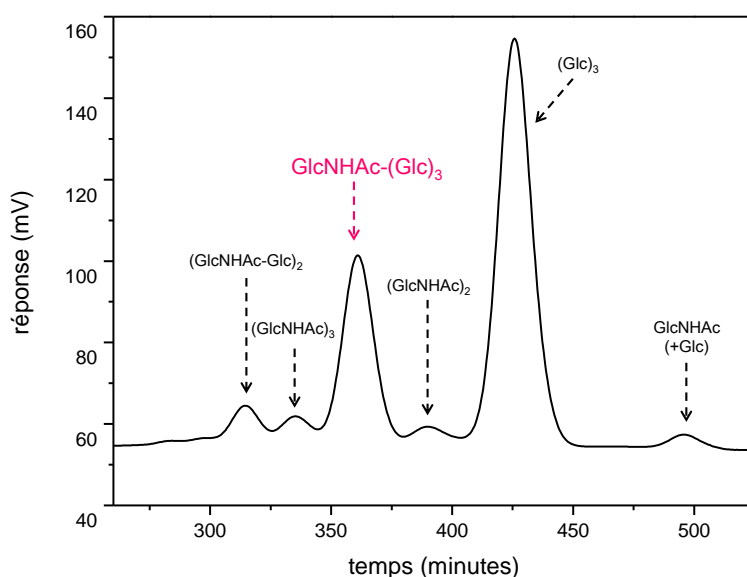


Figure 100 : Chromatogramme SEC Biogel P2 d'un mélange réactionnel de transglycosylation chitobiose/cellotriose avec le lysozyme

Par cette technique de purification précédée par un passage sur charbon actif, le tétrasaccharide est isolé avec une excellente pureté, bien que le mélange réactionnel soit composé de plusieurs produits.

La voie de synthèse du tétrasaccharide développée ici par transglycosylation au moyen du lysozyme constitue un accès rapide à des molécules constituant le squelette saccharidique d'analogues de LCO. En effet, le GlcNHAc-(Glc)_3 a pu être synthétisé en une unique étape à partir de chitobiose et de cellotriose en utilisant une enzyme commerciale. Les réactifs de départ sont commerciaux mais coûteux néanmoins ils sont préparables en quantités suffisantes pour produire des analogues de LCO. Ils peuvent être produits par les méthodes décrites précédemment pour l'obtention de

cellodextrines, et par exemple par hydrolyse de la chitine pour le chitobiose{Rupley, 1964 #305}. Le rendement obtenu atteint 13% en une étape, ce qui est encourageant et reste à être optimisé. En comparaison avec la méthode chimio-enzymatique précédente *via* la cellulase de *T.viride*, qui nécessite 18 étapes pour un rendement total de 5 %, cette méthode est très avantageuse. Elle représente des économies d'atomes, et de temps conséquentes, et offre des rendements près de 2,5 fois supérieurs en une unique étape. De plus, par cette méthode il est envisageable de réaliser la synthèse du pentasaccharide GlcNHAc-(Glc)₄ à partir de chitobiose et de cellotétraose.

L'obtention du squelette saccharidique est une des étapes clé de cette synthèse d'analogues de LCO à base cellodextrines. La dernière étape de *N*-acylation par une chaîne grasse est réalisée par couplage chimique.

II.5. Acylation du squelette saccharidique pour la synthèse de l'analogue de LCO

Deux voies de synthèse du squelette saccharidique à base de cellodextrines ont été développées. La dernière étape consiste en la fonctionnalisation de l'amine portée en C₂ à l'unité non-réductrice par une chaîne grasse. Les acides gras utilisés sont l'acide oléique (C18:1) et l'acide palmitique (C16:0) qui se retrouvent principalement dans les facteurs de mycorhization pour le premier, et dans les facteurs de mycorhization et de nodulation pour le second^[172].

L'unité glucosamine de la chaîne saccharidique est protégée par un groupement acétate, et sa déprotection requiert des conditions de réactions dures, le plus souvent très basiques comme le reflux dans la potasse ou la soude^[244]. Ces conditions ne sont pas adaptées pour la déprotection du tétrasaccharide. En effet, la chaîne saccharidique est libre en position anomère, ce qui favorise des réactions d'élimination dans des conditions basiques drastiques. Afin de déprotéger l'amine, nous avons envisagé une autre stratégie en passant par la formation d'un intermédiaire plus facile à déprotéger.

II.5.1. Déprotection de l'unité *N*-acétylglucosamine du squelette saccharidique

En 1984, Frahn *et al.* ont reporté la déprotection d'un acétamide d'une molécule de corynetoxins en une amine libre en passant par son intermédiaire trifluoroacétamide. Celui-ci peut ensuite être facilement déprotégé en conditions alcalines pour former l'amine libre correspondante^[245]. La trifluoroacétylolyse de l'acétamide est réalisée dans un mélange d'anhydride trifluoroacétique et d'acide trifluoroacétique à 100°C pour accéder au trifluoroacétamide correspondant.

En s'appuyant sur ces travaux, nous avons réalisé la déprotection du groupement acétate de la glucosamine *via* ces deux étapes.

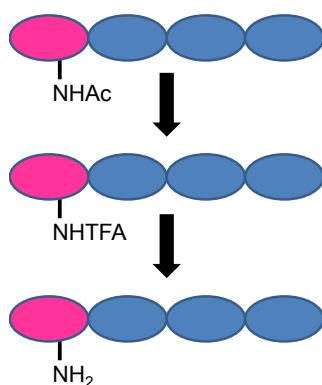


Figure 101 : Stratégie de déprotection de la glucosamine

Dans un premier temps, le tétrasaccharide **23** (GlcNHAc-(Glc)₃) est porté à 100°C dans un mélange d'anhydride trifluoroacétique et d'acide trifluoroacétique (50/1 v/v) pendant 55 heures. Le tétrasaccharide **26** est alors formé. Cet intermédiaire a été isolé et son poids moléculaire contrôlé par spectrométrie de masse ESI⁺ (Figure 102).

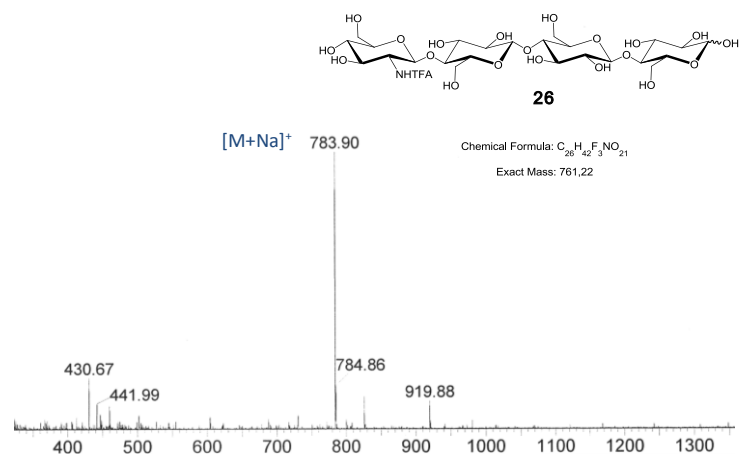


Figure 102 : Spectre ESI⁺ du tétrasaccharide GlcNHTFA-(Glc)₃ (26)

Dans un deuxième temps, le tétrasaccharide **26** précédemment préparé est mis en présence d'une solution d'ammoniaque afin de déprotéger le groupement trifluoroacétamide. Après purification sur résine échangeuse de cations, le tétrasaccharide GlcNH₂-(Glc)₃ **27** est isolé avec un rendement global de 78% sur les deux étapes.

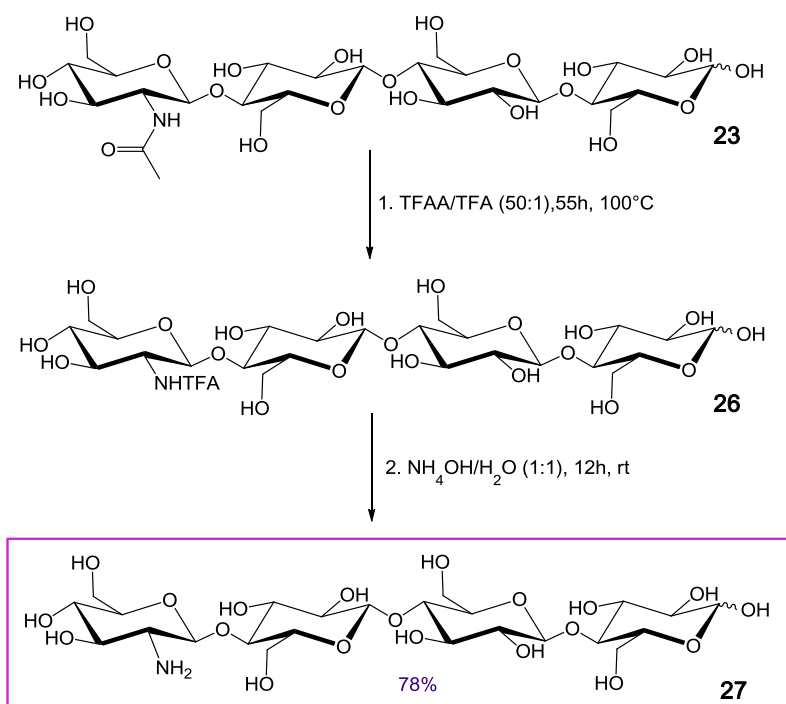


Schéma 22 : Déprotection du GlcNHAc-(Glc)₃ pour l'obtention du GlcNH₂-(Glc)₃ (27)

Le tétrasaccharide **27** a été caractérisé par spectrométrie ESI⁺ ainsi que par RMN ¹H et ¹³C (Figure 103).

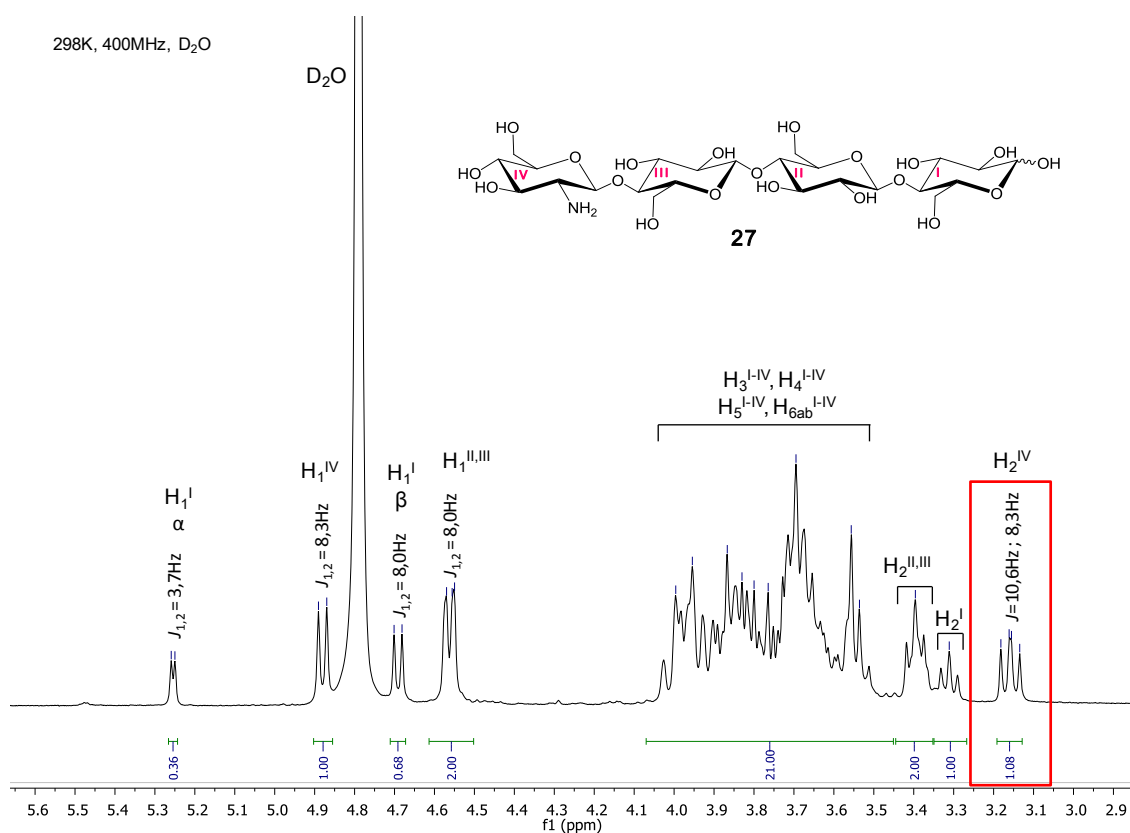


Figure 103 : Spectre RMN ¹H du tétrasaccharide GlcNH₂-(Glc)₃ (**27**)

Sur le spectre en Figure 103, le déplacement chimique du H₂^{IV} à 3,15ppm est caractéristique d'un H₂ d'une β-glucosamine, avec un doublet de doublet et des constantes de couplage J_{1,2} = 8,3Hz et J_{1,3} = 10,6Hz (zone en rouge). Le tétrasaccharide GlcNH₂-(Glc)₃ ainsi synthétisé est disponible pour réaliser le couplage avec l'acide gras.

II.5.2. Acylation du tétrasaccharide GlcNH₂-(Glc)₃

La formation de liaison amide est une réaction importante et très utilisée en synthèse organique. Elle est largement employée pour la synthèse de peptides et de molécules thérapeutiques, qui comportent souvent dans leur structure une ou plusieurs liaisons C-N^[246]. De nombreuses méthodes ont été développées pour mener une réaction de N-acylation, dont les principales recensées dans une revue de Montalbetti *et al.* sont les réactions au moyen d'halogénures d'acyle, d'anhydrides et d'esters^[247]. Nous avons choisi de réaliser l'acylation du squelette saccharidique par la voie des esters. Les

N-acylations effectuées *via* un ester activé nécessitent également l'activation de l'acide afin de réaliser le couplage (Figure 104). Pour cela, il existe une large gamme de réactifs qualifiés d'agents de couplage. Ces agents peuvent être de natures très différentes comme des sels de phosphonium, des sels d'uronium, des sels d'ammonium.

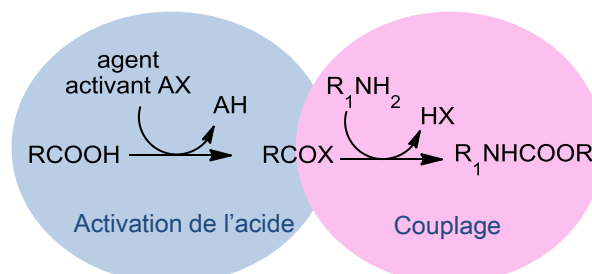


Figure 104 : Réaction d'acylation d'une amine par un acide carboxylique

Ohsten Rasmussen *et al.* ont appliqué une méthode d'acylation pour la préparation de LCO en utilisant un réactif guanidinium. Cette méthode permet la formation *in situ* de cet agent de couplage à partir des réactifs 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) et hexafluorophosphate de *N,N,N',N'*-bis(tétraméthylène)-chloroformamidium (BTCHP). L'agent de couplage formé permet l'activation de l'acide pour la réalisation de l'acylation de l'amine libre^[199] avec des rendements compris entre 32 et 51%.

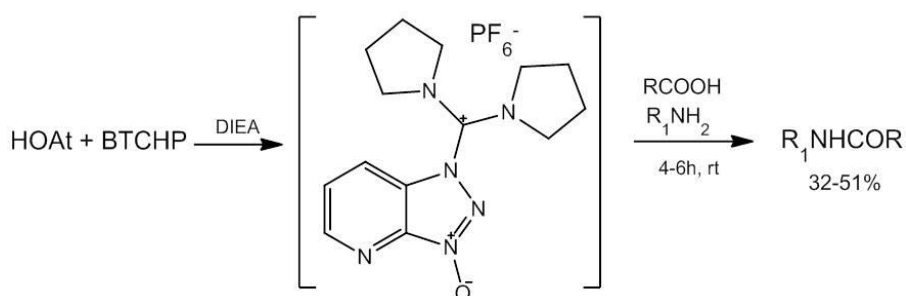


Schéma 23 : Réaction d'acylation appliquée aux LCO développée par Rasmussen *et al.*^[199]

Kunishima *et al.* ont développé une méthode de couplage pour la formation d'ester et d'amide au moyen de l'agent couplant chlorure de 4-(4,6-diméthoxy-(1,3,5)triazyn-2-yl)-4-méthyl-morpholinium (DMTMM). Cette méthode est avantageuse car elle ne nécessite pas d'ajout de base (*N*-méthyl-morpholine libérée *in situ*), et offre de bons résultats de couplage^[248]. Pour une réaction dans l'eau, des rendements d'acylation de 91% ont été obtenus avec le DMTMM, comparé à 44% avec un agent courant comme l'EDC (1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide). Récemment,

Kaminski *et al.* ont développé de nouveaux agents activants basés sur ces sels de triazine, le tétrafluoroborate de 4-(4,6-diméthoxy-(1,3,5)triazyn-2-yl)-4-méthylmorpholinium (DMTMM-BF₄)^[249]. Cet agent permet de former un ester "superactivé" car l'acide activé intermédiaire formé possède une énergie supérieure au produit d'acylation avec l'amine.

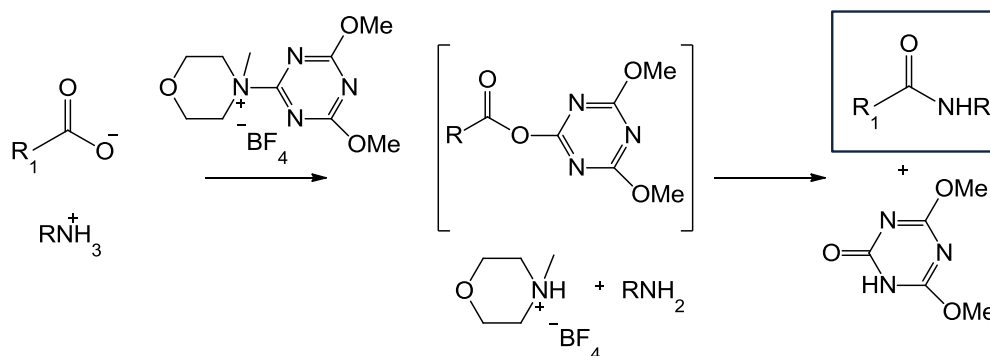


Schéma 24 : Mécanisme d'acylation par le DMTMM-BF₄, d'après Montalbetti *et al.*^[247]

Ceci favorise un déplacement rapide de l'équilibre réactionnel vers la formation du produit de couplage entre l'acide et l'amine^[249]. L'avantage d'utiliser le DMTMM-BF₄ par rapport au DMTMM réside principalement dans sa meilleure capacité d'activation de l'acide. De plus, il a été décrit comme plus stable au cours du temps^[250], car le contre ion BF₄⁻ n'entre pas en jeu dans le processus de dégradation que subit le DMTMM dû à son contre ion Cl⁻ (Schéma 25).

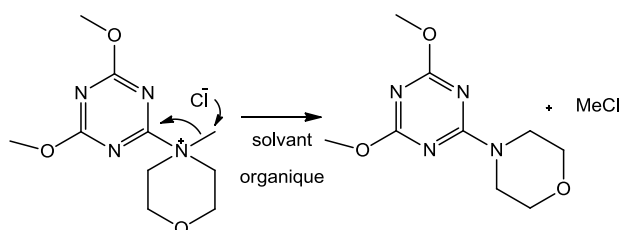


Schéma 25 : Mécanisme de décomposition du DMTMM en solvant organique

Ainsi, afin de réaliser le couplage du tétrasaccharide **27** sur un acide gras nous avons mené en parallèle deux voies de synthèse. La première méthode s'appuie sur les travaux développés par Ohsten Rasmussen *et al.* avec le réactif guanidinium, et la seconde méthode se base sur les travaux de Kaminski *et al.* et de Raw *et al.* sur l'acylation par l'agent de couplage DMTMM-BF₄^[250]. Il a été décidé de réaliser dans un

premier temps le couplage du précurseur avec l'acide oléique (C18:1) qui est une chaîne grasse retrouvée en particulier dans les facteurs de mycorhization.

II.5.2.1. Acylation du tétrasaccharide $\text{GlcNH}_2\text{-(Glc)}_3$ par l'agent activant guanidinium

Le couplage de la molécule **27** $\text{GlcNH}_2\text{-(Glc)}_3$ avec l'acide (C18:1) a dans un premier temps été réalisé en s'appuyant sur les travaux de Ohsten Rasmussen *et al.* Cette synthèse se réalise en plusieurs étapes. D'abord, les réactifs HOAt (3,5éq.) et BTCHP (2,3éq.) sont mis en solution dans le DMF en présence de la base DIEA (*N,N*-Diisopropyléthylamine) (7éq.) afin de former le réactif guanidinium, puis l'acide est ajouté pour son activation. Le tétrasaccharide **27** est ensuite ajouté dans le mélange contenant l'acide activé puis la réaction est menée à température ambiante pendant 8 heures. La réaction est stoppée lorsque la disparition du tétrasaccharide de départ ne semble plus évoluer. Après concentration du mélange et ajout d'acétate d'éthyle, le tétrasaccharide fonctionnalisé précipite et est obtenu après centrifugation sous forme d'un solide. Le produit formé **28** est isolé après purification par chromatographie en phase inverse C:18 (SepPack) avec un rendement de 9%.

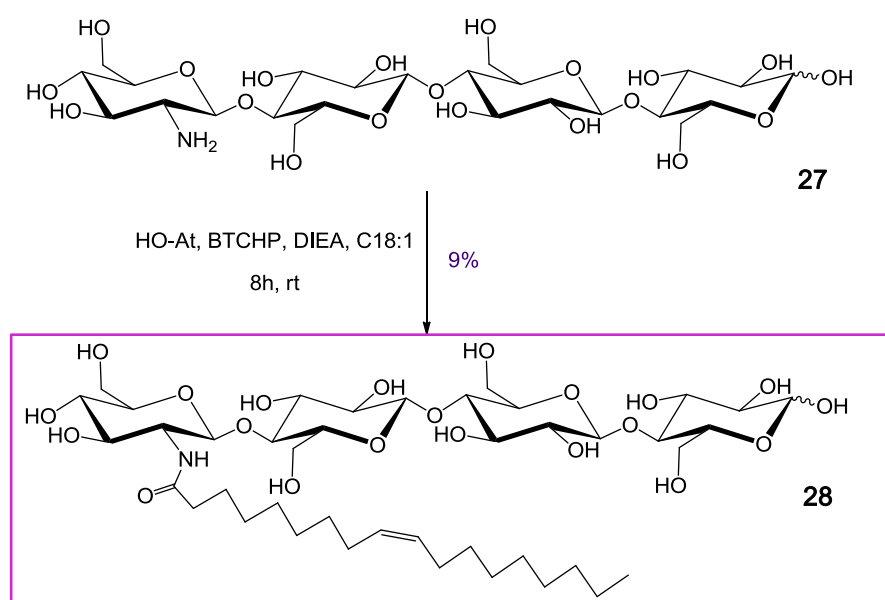


Schéma 26 : Synthèse de l'analogue de LCO $\text{GlcNH(C18:1)-(Glc)}_3$ par le réactif guanidinium

La réaction n'est pas totale, et un rendement décevant de 9% a été obtenu. L'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis de confirmer la formation du produit cible.

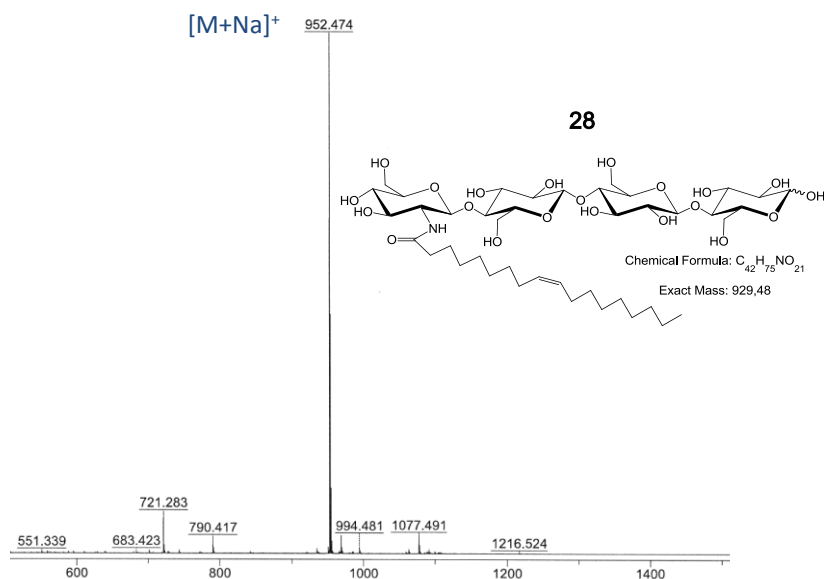


Figure 105 : Spectre de masse MALDI-TOF du GlcNH(C18:1)-(Glc)₃ (28)

Lors de l'étape de purification, 69% du tétrasaccharide GlcNH₂-(Glc)₃ de départ a été recouvré, ce qui indique que cette synthèse n'est pas efficace. En comparaison, Ohsten Rasmussen *et al.* ont reporté un temps de synthèse de 4 à 6 heures avec un squelette chitotétraose pour un rendement 3 fois supérieur. Le tétrasaccharide de départ récupéré a cependant pu être recyclé. Les conditions réactionnelles restent à optimiser : un seul essai a été conduit par cette méthode et parallèlement des essais d'acylation avec l'agent activant DMTMM-BF₄ ont été réalisés.

II.5.2.2. Acylation du tétrasaccharide GlcNH₂-(Glc)₃ par l'agent activant DMTMM-BF₄

L'agent de couplage DMTMM-BF₄ permet la formation de liaison amide, par l'activation de l'acide carboxylique à coupler, comme représenté sur le Schéma 24. Dans la plupart des cas, l'action de l'agent de couplage est catalysée par la présence d'une base. Avec le DMTMM-BF₄, l'activation de l'ester engendre la libération de *N*-méthylmorpholine (NMM) qui permet d'alimenter en continu le milieu en base. Il n'est donc pas absolument indispensable d'apporter une base au milieu réactionnel. Certaines méthodes, dont la méthode d'acylation de Kaminski *et al.* le préconisent toutefois.

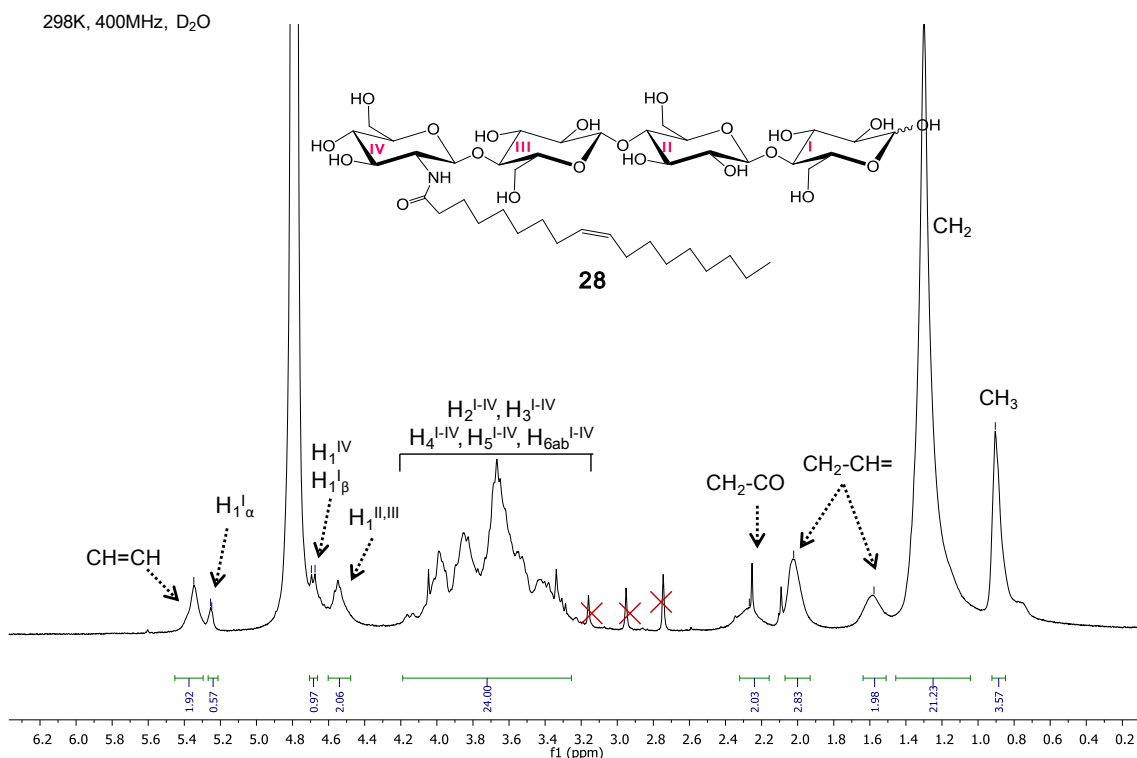
Afin de réaliser la réaction d'acylation par le DMTMM-BF₄, des essais de couplage ont été réalisés entre l'amine du tétrasaccharide **27**, et l'acide oléique (C18:1). Pour ces essais à température ambiante dans le DMF, l'acide et l'agent activant sont en large excès par rapport à l'amine.

Entrée	Amine/Acide /DMTMM-BF ₄	NMM	Temps	Rendement
1	1/3/3 éq.	/	8h	9 %
2	1/3/3 éq.	0,6 éq	24h	36 %

Tableau 19 : Récapitulatif des essais d'acylation par l'agent activant DMTMM-BF₄

Les essais d'acylation ont permis la synthèse de l'analogue de LCO **28** avec des rendements de 9 et 36 %. L'essai d'acylation en présence d'une quantité initiale catalytique de NMM a permis d'obtenir un meilleur rendement. Il semble que bien que non-indispensable, la présence de NMM dans le milieu permet d'améliorer le rendement en acylation. La purification du produit s'est avéré délicate, ce qui a probablement contribué au rendement modeste obtenu.

L'analogue obtenu a été caractérisé par analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF et donne un résultat identique à celui obtenu précédemment (Figure 105). La structure de la molécule a été caractérisée par RMN ¹H.



Le spectre de RMN ¹H de la molécule **28** représenté en Figure 106 montre la présence des protons de la chaîne grasse entre 0,8 et 2,2ppm, ainsi qu'à 5,35ppm. Les protons de la chaîne saccharidique sont compris dans le massif entre 3,2 et 4,2ppm et enfin les protons H₁ possèdent un déplacement chimique à 4,55ppm pour les H₁^{II,III}, à environ 4,7 pour les H₁^{IV} et H₁^{Iβ} et à 5,25ppm pour H₁^{Iα}.

D'après les résultats obtenus, il semble que la méthode d'acylation au DMTMM-BF₄ offre de meilleurs rendements que par la méthode au guanidinium. Les conditions d'acylation testées ici restent à optimiser afin d'obtenir de meilleurs rendements en GlcNH(C18:1)-(Glc)₃. L'étape de purification a cependant pu être optimisée et ne devrait plus constituer une limitation à la réaction pour la suite. La synthèse d'un deuxième analogue portant la seconde chaîne grasse C16:0, commune aux facteurs de nodulation et de mycorhization, est en cours de réalisation. Le test biologique de ces analogues déterminera si ces molécules peuvent être utilisées comme compléments aux facteurs de nodulation et de mycorhization.

III. Conclusion et perspectives

Dans ce travail, nous avons exploré trois approches chimio-enzymatiques différentes pour parvenir à synthétiser le squelette saccharidique de l'analogue de LCO.

Dans la première approche utilisant des cellulases, deux voies synthétiques ont été envisagées au moyen d'une glycosynthase et d'une cellulase sauvage.

Contrairement à nos attentes, la glycosynthase Cel7B E197A utilisée n'a pas permis de catalyser le transfert du disaccharide préparé sur une cellodextrine. Il semble que l'enzyme ne soit pas en mesure de réaliser la transglycosylation avec des donneurs constitués d'une unité glucosamine protégée à l'unité non réductrice, ni par un groupement Troc, ni par un acétate. Notre étude ne permet pas de déterminer la cause de cette non-réactivité envers de tels substrats, cependant il est envisageable que cela soit lié à l'encombrement stérique causé par la fonctionnalité en C₂, ou à une interaction particulière du site actif avec le groupement –amino. La modélisation moléculaire pourrait permettre d'évaluer l'espace occupé et les interactions du substrat au sein du site actif afin de vérifier cette hypothèse. Des essais complémentaires avec un donneur portant une unité glucosamine libre seraient également intéressants.

En revanche, la cellulase sauvage ONOZUKA R-10 de *T.viride* a permis de transglycosyler un β -fluorure de glycoside portant une unité glucosamine à l'unité non-réductrice sur un accepteur cellodextrine. Cette stratégie permet de synthétiser le tétrasaccharide GlcNHAc-(Glc)₃ en 18 étapes depuis les monosaccharides de départ avec un rendement de 5 %. La dernière étape clé de couplage enzymatique du β -fluorure de glycoside a ainsi pu être réalisée efficacement à partir de GlcNHAc- β (1-4)-Glc- β F avec un rendement de 52%. Au vu de ces résultats, il serait intéressant d'évaluer la capacité de l'enzyme à catalyser la réaction de transglycosylation à partir de donneur portant d'autres groupements *N*-protecteur, comme le Troc ou le TFA.

La seconde voie de synthèse développée est celle employant l'enzyme β -*N*-acétyl-hexosaminidase d'*A.oryzae*. Cette approche n'a pas permis d'obtenir de produits de transglycosylation en utilisant un accepteur de nature glucosidique. En revanche, la β -*N*-acétyl-hexosaminidase est décrite dans la littérature comme un bon catalyseur de transglycosylation sur les séries lactose, mannose, galactose. Il est difficile de déterminer les causes de l'inactivité de l'enzyme sur ces accepteurs.

Enfin la dernière stratégie de synthèse élaborée est celle du lysozyme, et elle constitue jusqu'à présent l'approche la plus efficace. En effet la transglycosylation du chitobiose sur le cellobiose par le lysozyme permet de synthétiser en une unique étape le tétrasaccharide ciblé, avec un rendement de 13%, ce qui est plus du double du rendement obtenu par la cellulase en 18 étapes. L'utilisation du lysozyme engendre également la formation de produits secondaires liés à l'autocondensation ou à l'hydrolyse des produits de transglycosylation formés. Le lysozyme n'hydrolyse que très peu les cellodextrines. Cette particularité permet d'envisager la synthèse du pentasaccharide précurseur par transglycosylation du donneur chitobiose sur du cellotétraose, qui une fois formé ne devrait pas subir d'hydrolyse secondaire.

Le tétrasaccharide $\text{GlcNHAc}-(\text{Glc})_3$ a ainsi été synthétisé selon deux approches de synthèse chimio-enzymatique différentes, et isolé avec une excellente pureté par une méthode de purification combinant filtration sur charbon et chromatographie d'exclusion stérique. La méthode de transglycosylation catalysée par le lysozyme devrait permettre la synthèse du pentasaccharide $\text{GlcNHAc}-(\text{Glc})_4$ qui représente un deuxième squelette saccharidique complémentaire très intéressant. Celui-ci pourrait en effet permettre d'évaluer l'influence du nombre d'unités du squelette saccharidique sur l'activité de la molécule.

Une fois le squelette saccharidique obtenu, le tétrasaccharide amino a pu être synthétisé avec des rendements atteignant 78% par trifluoroacétolyse. Ce résultat est satisfaisant en considération de la nature du tétrasaccharide de départ ne portant aucune protection anomère et donc sujet à la dégradation dans les conditions basiques habituelles de déprotection des fonctions *N*-acétate.

La dernière étape d'acylation a été envisagée au moyen de deux agents activants différents, qui ont permis d'obtenir l'analogue de LCO désiré. Les rendements de *N*-acylation sont cependant à optimiser. Une deuxième molécule portant la chaîne grasse C16:0 est en cours de synthèse. Les produits secondaires formés lors de la transglycosylation par la cellulase ou le lysozyme notamment le $(\text{GlcNHAc-Glc})_2$ constituent un squelette saccharidique analogue dont le motif peut être intéressant. Les molécules produites seront soumises à différents tests d'activité biologique en collaboration. S'ils sont actifs, les analogues de LCO à squelette cellodextrine constitueront une alternative très intéressante aux LCO naturels ou synthétiques. En effet, leur synthèse est réalisable en 3 étapes dont les conditions sont encore

optimisables. Ces analogues de LCO seront utiles à la compréhension des mécanismes et de l'influence des composants structuraux des molécules naturelles.

Chapitre 4 :

Partie expérimentale

Chapitre 4 : Partie expérimentale **231**

I. Matériel et méthodes **231**

I.1. Solvants et réactifs	231
I.2. Méthodes chromatographiques	231
I.2.1. Chromatographie sur couche mince de silice	231
I.2.2. Chromatographie préparative sur gel de silice	231
I.2.3. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)	232
I.2.4. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)	232
I.2.5. Chromatographie par perméation de gel (GPC)	233
I.3. Caractérisations physico-chimiques	234
I.3.1. Spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	234
I.3.2. Spectrométrie de masse	234
I.3.3. Diffraction des Rayons X (DRX)	235
I.3.4. Dosage des sucres réducteurs	235
I.3.5. Pouvoir rotatoire	236

II. Préparation des cellodextrines **236**

II.1. Acétylyse de l'Avicel	236
II.2. Hydrolyse de l'Avicel à l'acide phosphorique	237
II.3. Hydrolyse de l'Avicel avec un mélange d'acide	237
II.4. Prétraitement de l'Avicel en liquide ionique par hydrolyse à l'acide camphorsulfonique	238
II.5. Prétraitement de l'Avicel en liquide ionique par hydrolyse avec la résine acide Amberlyst-15DRY (AB15)	238
II.6. Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides insolubles dans l'eau	239
II.7. Synthèse de cellulose partiellement acétylée hydrosoluble (WSCA)	239
II.8. Hydrolyse enzymatique de la cellulose partiellement acétylée hydrosoluble	240

III. Synthèse d'analogues de LCO **241**

III.1. Synthèse du donneur de glycosylation -SBox	241
III.2. Synthèse des accepteurs de glycosylation	244

III.3. Synthèse de fluorures de glycosyles disaccharidiques	250
III.4. Synthèse du tétrasaccharide par transglycosylation	264
III.5. Synthèse de l'analogue de LCO : acylation	270

Chapitre 4 : Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I.1. Solvants et réactifs

Le dichlorométhane et le dichloroéthane sont distillés sur hydrure de calcium, le THF est distillé sur benzophénone et sodium, puis sont utilisés directement. Les autres solvants sont de grade de synthèse ou de grade HPLC et sont utilisés sans autre purification.

I.2. Méthodes chromatographiques

I.2.1. Chromatographie sur couche mince de silice

L'évolution des réactions est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice (Merk 60 F254) en utilisant les systèmes d'éluants indiqués. Les plaques sont révélées sous irradiation UV ($\lambda = 254\text{nm}$) puis par immersion dans une solution de révélateur acide (MeOH/H₂O/H₂SO₄ 45/45/5 v/v) avant d'être chauffées à 300°C. Les composés contenant des groupes *N*-acétyl glucosamine sont révélés dans un mélange spécifique (4 g diphénylamine, 4 mL aniline, 200 ml acétone, 30 mL H₃PO₄) puis chauffés à 300°C.

I.2.2. Chromatographie préparative sur gel de silice

Les séparations par chromatographie flash sont réalisées sous pression d'air comprimé, sur colonne de gel de silice (Merk Geduran Si 60 ; 40-63 μm) avec l'éluant indiqué, ou sur appareil de chromatographie automatique GRACE Davison Revelris®. Les cartouches utilisées sont de type silice, silice greffée C18 ou amino. L'évolution de la chromatographie est suivie par double détection UV et diffusion de lumière.

I.2.3. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

Les mélanges d'oligosaccharides hydrosolubles ont été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sur Biogel P2 ou P4.

La chromatographie sur Biogel P2 (gel de polyacrylamide, zone de travail de 100 à 1800Da) est réalisée par élution à l'eau pour la purification préparative et avec une solution d'azide de sodium à 1% dans l'eau pour la purification analytique, à un débit de 0,5mL/min. Le système de séparation est composé de deux colonnes montées en série (dimensions 1m*1,5cm) thermorégulées à 50°C et le système de détection est composé d'un réfractomètre Agilent 1260 Infinity.

La chromatographie sur Biogel P4 (gel de polyacrylamide, zone de travail 800 à 4000Da) est réalisée par élution à l'eau à 1,8mL/min avec une colonne de dimension 1m*5cm équipée d'un réfractomètre Knauer Smartline 2400.

Les solutions sont filtrées sur des membranes de 0,20 µm en PTFE avant injection.

I.2.4. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Les analyses HPLC ont été réalisées sur une colonne analytique en phase inverse Nucleodur C18 (EC 250/4.6 Nucleodur 100-5 C18ec) par une élution à l'eau et à l'acétonitrile à 0,8mL.min⁻¹. La chaîne HPLC est équipée d'un détecteur à diffusion de lumière Varian ELSD 380-LC. Les paramètres de réglage comprennent la température de l'évaporateur à 80°C, la température du nébulisateur à 50°C et le débit de d'azote à 1 SLM (Standard Litre par Minute). Le programme d'élution optimisé pour la séparation des mélanges de cellodextrines de DP 1 à 6 est le suivant :

Temps	% Acétonitrile
0 à 10 minutes	0
10 à 40 minutes	10
40 à 50 minutes	35
50 à 70minutes	0

Les solutions sont filtrées sur des membranes de 0,20 µm en PTFE avant injection.

I.2.5. Chromatographie par perméation de gel (GPC)

I.2.5.1. GPC en phase aqueuse

Les masses molaires et indices de polymolécularité des celluloses acétate ont été déterminés par chromatographie de perméation de gel (GPC) dans l'eau en présence de NaNO_3 (0,1M) filtré sur membrane de $0,1\mu\text{m}$ à 22°C (0,5 ml/min). Le système d'analyse est équipé de deux colonnes OH Pack SB800HQ Series/SB2000Series et d'un détecteur à diffusion de lumière multiangles laser (WYATT) ainsi que d'un réfractomètre (WATERS) et d'un viscosimètre. Le dispositif est calibré avec un standard de pullulane de $22800\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($dn/dc = 0,147$).

Les solutions sont filtrées sur des membranes de $0,2\mu\text{m}$ en PTFE avant injection.

I.2.5.2. GPC en phase organique

Les oligosaccharides de cellulose (20mg) sont immergés dans une solution composée d'acide nitrique/acide phosphorique/pentoxide phosphorique (64/26/10% en masse, 1mL) pendant 20 minutes à 0°C sous agitation. Ils sont ensuite filtrés, lavés à l'eau et séchés pour obtenir les oligosaccharides nitrés. (d'après le protocole d'Alexander *et al.*^[146])

La chromatographie de perméation de gel en phase organique a été réalisée à l'aide d'un système Agilent 390-MDS équipé d'une pompe/injection 290-LC, d'un four Prostar 510, et d'un réfractomètre 390-MDS. La séparation s'effectue à 60°C sur deux colonnes en série Agilent PolyPore PL1113-6500 (linéaire, $7,5 \times 300\text{ mm}$, taille des particules de $5\mu\text{m}$, limite d'exclusion de 200 à $2000000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) dans le DMF contenant 10 mM de LiCl, à un débit de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La calibration est réalisée avec une gamme étalon de standards de polystyrène linéaire (3000 à $190000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Les solutions sont filtrées sur des membranes de $0,45\mu\text{m}$ en PTFE avant injection.

I.3. Caractérisations physico-chimiques

I.3.1. Spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été réalisés sur des spectromètres Brüker AC300, Avance 400 et AC400. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et calibrés avec le solvant résiduel du solvant deutéré utilisé à 298K. Pour les analyses ^{13}C dans le D_2O , les déplacements sont calibrés par le standard interne du spectromètre.

Solvant	Déplacement ^1H	Déplacement ^{13}C
D_2O	4,79	/
CDCl_3	7,26	77,16
MeOD	4,87	49

La notation utilisée pour la description des spectres est la suivante : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), ddd (doublet de doublet de doublet), t (triplet), td (triplet de doublet) q (quadruplet), m (multiplet).

I.3.2. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse basse résolution ont été effectués au CERMAV et par le service de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG) sur un spectromètre Waters Micromass ZQ pour la méthode d'ionisation de type électrospray (ESI) et sur un appareil Bruker Autoflex pour la technique MALDI-TOF.

Les analyses en spectrométrie de masse haute résolution (TOF-ESI⁺) ont été réalisées par le service de spectrométrie du Laboratoire des Glucides de l'Université de Picardie Jules Verne (Amiens).

I.3.3. Diffraction des Rayons X (DRX)

La polymorphie de la cellulose et des cellodextrines insolubles dans l'eau a été évaluée par diffraction des rayons X (DRX). Les clichés ont été au moyen d'un générateur Philips PW 3830 fonctionnant à une tension de 30 kV et une émission de 20 mA (radiation $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Des "image plates" Fuji, et détecteurs bidimensionnels à dynamique élevée ont été utilisés permettant une analyse quantitative des intensités diffractées. Ces plaques ont été exposées sous vide durant 1 heure puis lues par balayage laser au moyen d'un phospho-imageur Fujifilm BAS 1800 II. Les diagrammes de diffraction ont été calibrés au moyen de calcite (anneau de diffraction à $d = 0,3035 \text{ nm}$).

I.3.4. Dosage des sucres réducteurs

Le nombre de moles d'extrémités réductrices d'un échantillon d'oligosaccharides insolubles dans l'eau a été déterminé par titration colorimétrique par la méthode à l'acide bicinchoninique (concentrations en espèces à doser de 2 à 12 nM).

L'échantillon est mis en solution dans un volume de 1mL d'eau distillée, puis 1mL d'un mélange de solutions de dosage A et B (50/50 v/v) est ajouté. Le mélange d'échantillon et réactifs est porté à 75°C pendant 30 minutes sous agitation forte, puis après refroidissement l'absorbance est mesurée à $\lambda = 560\text{nm}$. Les concentrations sont déterminées par rapport à une gamme standard élaborée avec différentes concentrations en glucose.

Solution de dosage A :

0,243g d'acide 2,2'-bichoninique, 6,78g de carbonate de sodium et 3,025g d'hydrogénocarbonate de sodium dans 125mL d'eau distillé.

Solution de dosage B :

0,156g de sulfate de cuivre pentahydrate et 0,158g de L-sérine dans 125mL d'eau distillée.

I.3.5. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]$ est calculé selon la loi de Biot définie selon :

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{l.c}$$

où

- $[\alpha]$ est le pouvoir rotatoire spécifique (constant pour un composé donné, si la température, la nature du solvant et la longueur d'onde de la lumière utilisée sont fixés),
- α est l'angle de rotation mesuré (en degrés).
- l est la longueur de la cellule contenant l'échantillon (trajet optique, en dm).
- c est la concentration de l'échantillon exprimée en g.ml^{-1} .

L'angle de rotation est mesuré à 26°C au moyen d'un polarimètre Perkin Elmer 341. La longueur d'onde utilisée est celle de la raie D du sodium (589 nm).

II. Préparation des cellodextrines

II.1. Acétolyse de l'Avicel

Le protocole d'acétolyse de la cellulose a été adapté de la méthode décrite par Miller *et al.*^[60]. La cellulose microcristalline Avicel (30g ; 185mmol d'AGU) est ajoutée par portion dans 295mL d'une solution d'acide acétique, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique (140/140/15 v/v) à 50°C, puis le mélange est agité pendant 2,5 heures. Le mélange réactionnel est ensuite précipité dans 1L d'eau glacée, puis neutralisé avec du carbonate de sodium. Après extraction au dichlorométhane et lavage, la phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée et 41g de cellodextrines acétylées de DP 1-7 sont obtenues. Une partie du cellobiose peracétylé (9,1g) est cristallisé dans un mélange d'acétate d'éthyle / éther de pétrole (50/50 v/v), et le filtrat est purifié par chromatographie sur gel de silice (gradient d'acétate d'éthyle / éther de pétrole) pour obtenir un mélange de cellotriose et cellotétraose peracétylés (7,6g).

II.2. Hydrolyse de l'Avicel à l'acide phosphorique

L'hydrolyse de l'Avicel a été réalisée en adaptant les conditions réactionnelles décrites par Liebert *et al.*^[61]. La cellulose microcristalline Avicel (10g) est ajoutée dans l'acide phosphorique à 85% (120mL), puis le mélange est agité à 55°C pendant 20 heures. Le milieu réactionnel est ensuite précipité dans 500mL de THF, puis filtré. Après dissolution dans l'eau, la solution est neutralisée avec de la résine basique Amberlite IR-400 puis lyophilisée pour obtenir des cellodextrines de DP 1 à 9 avec 41% de rendement (4,1g). Les cellodextrines sont alors solubilisées dans du méthanol (150mL) et les cellodextrines qui ne se solubilisent pas (DP 5 à 9) sont filtrées et isolées avec un rendement de 17% (1,7g). Le filtrat contenant les cellodextrines solubles de DP 1 à 4 est ensuite concentré puis reprécipité dans un mélange de méthanol et d'acétate d'éthyle (50/50 v/v) afin d'isoler les cellodextrines de DP 3 et 4 insolubles avec un rendement de 17% (1,7g). Les cellodextrines de DP 1 à 2 solubles contenues dans le filtrat sont isolées avec un rendement de 7% (0,7g).

II.3. Hydrolyse de l'Avicel avec un mélange d'acide

Le protocole a été adapté d'après les conditions d'hydrolyse reportées par Zhang *et al.*^[64]. La cellulose microcristalline Avicel (20g) est ajoutée dans 200mL d'un mélange d'acide hydrochlorique et d'acide sulfurique (80/20 v/v) à 0°C, puis celui-ci est agité à température ambiante pendant 2,5 heures. Le mélange réactionnel est ensuite précipité dans 800mL d'acétone à 0°C, puis filtré. Les oligosaccharides sont alors dissous dans l'eau, et la solution est neutralisée avec de la résine basique Amberlite IR-400 puis concentrée et lyophilisée. Les cellodextrines de DP 1 à 9 sont alors obtenues avec 38% de rendements (7,6g). Celles-ci sont mises en solution dans du méthanol (300mL) et les cellodextrines insolubles correspondantes aux DP 5 à 9 sont filtrées et isolées avec un rendement de 29% (5,8g). La fraction soluble est alors concentrée puis reprécipitée dans un mélange de méthanol et d'acétate d'éthyle (50/50 v/v) pour séparer les cellodextrines de DP 3-4 insolubles avec un rendement global de 6% (1,2g), et les cellodextrines solubles de DP 1-2 avec un rendement de 2% (0,4g).

II.4. Prétraitement de l'Avicel en liquide ionique par hydrolyse à l'acide camphorsulfonique

La cellulose microcristalline Avicel est séchée à l'étuve pendant 24 heures avant réaction. Le liquide ionique est stocké sous atmosphère inerte et utilisé dans les 3 jours après ouverture du flacon.

L'Avicel (2,3g) est ajoutée par portion au liquide ionique BMIm-Cl (45,4g) préchauffé à 100°C pendant 15 minutes. Le mélange est agité à 100°C pendant 16 heures, puis l'acide camphorsulfonique (450mg ; 20% /mol AGU) et de l'eau (450µL) y sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité pendant 35 minutes avant d'être refroidi puis versé dans du dichlorométhane glacé (200mL). Le mélange sirupeux est alors concentré de moitié, puis versé dans de l'eau glacée (400mL) pour former un précipité blanc. Le solide est ensuite filtré, lavé abondamment avec de l'eau glacée puis séché jusqu'à un poids constant. Les cellodextrines insolubles dans l'eau sont obtenus avec 82% de rendement (1,85g).

II.5. Prétraitement de l'Avicel en liquide ionique par hydrolyse avec la résine acide Amberlyst-15DRY (AB15)

La cellulose microcristalline Avicel est séchée à l'étuve pendant 24heures avant réaction. Le liquide ionique est stocké sous atmosphère inerte et utilisé dans les 3 jours après ouverture du flacon.

L'Avicel (111mg) est ajoutée par portion au liquide ionique BMIm-Cl (2,23g) préchauffé à 100°C pendant 15 minutes. Le mélange est agité à 100°C pendant 16 heures, puis la résine Amberlyst 15-DRY (23mg ; 20%/mol AGU) et de l'eau distillée (23µL) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité pendant 45 minutes avant d'être refroidi puis versé dans du dichlorométhane glacé (15mL). Les billes de résine sont retirées puis le mélange sirupeux formé est concentré de moitié et versé dans de l'eau glacée (20mL) sont ajoutés pour former un précipité blanc. Le solide est alors filtré, lavé abondamment avec de l'eau glacée puis séché jusqu'à un poids constant. Les oligosaccharides insolubles dans l'eau sont obtenus avec 88% de rendement (98mg).

II.6. Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides insolubles dans l'eau

Les cellodextrines DP 23 insolubles dans l'eau (50mg) sont mis en suspension dans l'eau distillée (5mL) puis l'endoglucanase Carezyme (50µL) est ajoutée. Le mélange est soumis à une faible agitation à 37°C pendant 3,5 heures, puis l'enzyme est désactivée en portant le mélange réactionnel à 100°C pendant 15 minutes. Les oligosaccharides insolubles résiduels sont séparés par centrifugation et rincés abondamment à l'eau puis séchés. La fraction soluble est concentrée puis purifiée sur 2g de charbon actif/célite (50/50 en poids). Les cellodextrines sont adsorbées puis lavées à l'eau et désorbées par un gradient de méthanol dans l'eau (0→50% v/v). Après concentration, le résidu est dissous dans l'eau et lyophilisé avant d'être purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur biogel P2 ou par chromatographie automatique sur gel d'amino-silice (gradient acétonitrile / eau). Le taux de conversion en cellodextrines solubles est de 54%, et les rendements en cellodextrines isolées DP 3 et 4 sont de 16 et 13% respectivement.

II.7. Synthèse de cellulose partiellement acétylée hydrosoluble (WSCA)

Les protocoles de préparation de WSCA sont adaptés des conditions réactionnelles d'Edgar et Buchanan^[162]

- Cellulose acétate de DS 0,8 :

La cellulose triacétate de DS 2,5 (30g ; 112mmol) est dissous dans un mélange d'acide acétique (120mL) et de méthanol (99mL), puis la solution est chauffée à 150°C dans un réacteur de Parr pendant 17 heures. Le solide formé correspondant à la cellulose partiellement acétylée hydrosoluble est repris dans l'eau puis lyophilisé. La WSCA de DS 0,8 est obtenue avec 82% de rendement (17,3g).

- Cellulose acétate de DS 0,7 :

La cellulose triacétate de DS 2,5 (30g ; 112mmol) est dissous dans un mélange d'acide acétique (120mL) et de méthanol (116mL), puis le mélange est chauffé à 150°C dans un réacteur de Parr pendant 16 heures. Le solide formé correspondant à la cellulose

partiellement acétylée hydrosoluble est repris dans l'eau puis lyophilisé. La WSCA de DS 0,6 est obtenue avec 73% de rendement (15,4g).

Les WSCA DS 0,5 et 0,6 ont été préparés par ERAS Labo selon des conditions adaptées du même protocole.

II.8. Hydrolyse enzymatique de la cellulose partiellement acétylée hydrosoluble

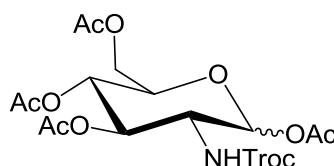
La cellulose acétate hydrosoluble de DS 0,6 (100mg) est solubilisée dans l'eau distillée (10mL), puis l'endoglucanase Carezyme (200 μ L) est ajoutée. Le mélange est soumis à une faible agitation à 37°C pendant 3,5 heures, puis l'enzyme est désactivée en portant le mélange réactionnel à 100°C pendant 15 minutes. Une solution d'ammoniaque (2mL) est ajoutée au mélange, puis celui-ci est agité pendant 1h à température ambiante. Un précipité blanc se forme correspondant aux oligosaccharides de cellulose insolubles dans l'eau. L'ammoniaque est ensuite évaporée puis les oligosaccharides insolubles sont séparés par centrifugation et lavés abondamment à l'eau. La fraction soluble est concentrée puis purifiée sur 4g de charbon actif/célite (50/50 en poids). Les cellodextrines sont adsorbées, lavées à l'eau puis désorbées par un gradient de méthanol dans l'eau (0→50% v/v). Après concentration, le résidu est dissous dans l'eau et lyophilisé avant d'être purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur biogel P2 ou par chromatographie automatique sur gel d' amino-silice (gradient acétonitrile / eau). Le taux de conversion en cellodextrines solubles est de 88%, et les cellodextrines de DP 3, 4 et 5 sont isolés avec des rendements de 18, 15 et 16% respectivement

III. Synthèse d'analogues de LCO

III.1. Synthèse du donneur de glycosylation -SBox

1,3,4,6-Tétra-O-acétyl-2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbamoyl)- α,β -D-glucopyranose

(1)



Etape 1 :

Le 2,2,2-trichloroéthylchloroformate (5,5mL ; 39mmol ; 1,25éq.) est ajouté goutte à goutte sous forte agitation à température ambiante à une solution d'hydrochlorure de D-Glucosamine (7g ; 32mmol) et d'hydrogénocarbonate de sodium (8,16g ; 96mmol ; 3éq.) dans l'eau distillée (65mL). Après 1 heure de réaction et disparition totale de la D-glucosamine de départ, la réaction est neutralisée à l'acide hydrochlorique 1M puis la solution est concentrée. Un solide blanc est obtenu, directement utilisé pour l'étape suivante.

Etape 2 :

La totalité du solide blanc collecté est reprise dans un volume minimum de pyridine, puis évaporé pour éliminer l'eau résiduelle de l'étape précédente. Le solide résiduel est ensuite mis en solution dans un mélange de pyridine (40mL) et d'anhydride acétique (20mL) en présence de DMAP. Le mélange est agité à température ambiante pendant 2 heures, puis la réaction est stoppée par évaporation des réactifs, puis co-évaporé au toluène. Le solide obtenu est repris au dichlorométhane, lavé successivement avec une solution d'acide hydrochlorique (1M), une solution de NaOH (1M), puis à l'eau. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite. Après purification sur gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle 5/5), le composé **1** est obtenu avec 79% de rendement (13,1g).

^1H RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 6.30 (d, 0.4H, $J = 2.2$ Hz, $\text{H}_{1\alpha}$) , 6.23 (d , 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, NH), 5.74 (d, 0.6H, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, $\text{H}_{1\beta}$), 5.30 – 5.09 (m, H), 4.81 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CCl}_3$ (anomère α)), 4.74 (m, H, $\text{CH}_2\text{-CCl}_3$ (anomère β)), 4.62 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz ,

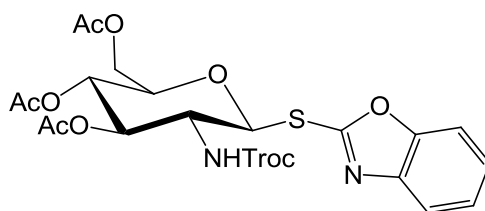
CH_2-CCl_3 (anomère α), 4.27 (dd, 2H, $J_{6a,6b} = 12.4$; $J_{5,6a} = 4.1$ Hz, H_{6a}) , 4.20 (dd, $J_{6a,6b} = 12.4$; $J_{5,6b} = 3.7$, H_{6b}), 4.17 – 3.98 (m, 3H), 3.93 (m, H), 3.81 (ddd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.4$; $J_{5,6a} = 4.1$ Hz ; $J_{5,6b} = 3.7$ Hz, H_5), 2.09 – 1.99 (m, 12H, $-COCH_3$). (lit.^[251])

^{13}C RMN (298K, 75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 171.43, 170.82, 169.33, 168.78 ($-COCH_3$), 154.17 ($-NCO$), 101.84 ($C_{1\beta}$), 95.34 ($-CCl_3$), 90.55 ($C_{1\alpha}$), 74.78 (C_2), 70.50 (C_3), 69.85 (C_4), 67.60 (C_5), 61.57 (C_6), 53.31 ($-CH_2-CCl_3$), 21.07, 20.84, 20.81, 20.71 ($-CH_3$).

MS-ESI⁺ : $m/z = 544.03$ $[M+Na]^+$

$[\alpha]_D^{26} + 67$ (C 0.91 $CHCl_3$)

3,4,6-Tri-O-acétyl-2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbonyl)-1-thio- β -D-glucopyranoside de benzoxazole (2)



Synthèse du sel de mercaptobenzoxazole de potassium :

Le 2-mercaptobenzoxazole (5g ; 33mmol) et du carbonate de potassium (4,55g ; 33mmol) sont mis en suspension dans 35mL d'acétone, puis le mélange est chauffé à reflux pendant 3 heures. Le solvant est ensuite évaporé puis le sel résultant est séché.

Etape 1:

Le composé **1** (1,5g ; 2,87mmol) est mis en solution dans du dichlorométhane (10mL) à 0°C, puis une solution acide bromhydrique à 32% dans l'acide acétique (10mL) est ajoutée à la solution. Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 30 minutes à 0°C, puis pendant 1 heure à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite dilué avec du dichlorométhane (25mL), puis versé dans une ampoule à décanter contenant de l'eau glacée. La phase organique est alors lavée 4 fois avec une solution d'hydrogencarbonate de sodium, puis elle est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite. Un solide jaune pâle est obtenu, et utilisé directement pour l'étape suivante.

Etape 2:

L'éther couronne 18C-6 (0,14g ; 0,53mmol ; 0,25éq.) et le sel de potassium de mercaptobenzoxazole (1,25g ; 6,6mmol ; 3éq.) sont ajoutés à une solution de bromure de glycosyle (1,15g ; 2,09mmol) dans 70mL d'acétone anhydre. Le mélange est agité sous argon à température ambiante pendant 1,5 heures, puis dilué avec du dichlorométhane (50mL). Le mélange est ensuite lavé 2 fois avec une solution aqueuse de NaOH à 1%, puis à l'eau (4 fois). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur gel de silice (toluène / acétate d'éthyle 1/1), le produit **2** est obtenu sous forme d'un solide avec 94% de rendement. L'isomère α est également isolé avec 4% de rendement.

^1H RMN (298K, 300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 7.52 (m, 1H, arom.), 7.37 (m, 1H, arom.), 7.27 – 7.13 (m, 2H, arom.), 5.83 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9.5$ Hz, NH), 5.67 (d, 1H, $J_{1,2} = 10.6$ Hz, H_1), 5.29 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.7$ Hz, H_3), 5.10 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, H_4), 4.62 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CCl}_3$), 4.20 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 4.8$, $J_{6a,6b} = 12.6$ Hz, H_{6b}), 4.17 – 4.01 (m, 2H, H_2-H_{6a}), 3.85 (m, 1H, H_5), 2.04 - 1.89 (3s, 9H, $-\text{COCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 171.03, 170.81, 169.52 ($-\text{COCH}_3$), 161.78 ($-\text{NCO}$), 154.48, 152.00, 141.43 (Cq. arom.), 129.13, 128.32, 124.63, 118.76 (arom.), 110.29 (C_1), 95.31 ($-\text{CCl}_3$), 84.73 ($-\text{CH}_2-\text{CCl}_3$), 74.58, 73.43, 68.21 ($\text{C}_{3,4,5}$), 61.98 (C_6), 55.66 (C_2), 20.77 (3x $-\text{COCH}_3$).

MS-ESI⁺ : $m/z = 634.88$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺

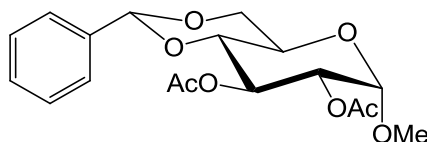
HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{NaSCl}_3 = 635.0037$; m/z obtenue = 635.0062

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 15.2$ (C 0.48 CHCl_3) lit^[215]: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 19.3$ (C 1.0 CHCl_3)

III.2. Synthèse des accepteurs de glycosylation

2. 3-Di-O-acétyl-4,6-benzylidène- α -D-glucopyranoside de méthyle (3)



Etape 1 :

L' α -D-glucopyranoside de méthyle (10g ; 51,5mmol) est mis en solution dans l'acétonitrile (100mL), puis l' α,α -diméthoxytoluène (9,5mL ; 63,3mmol ; 1,2éq.) et l'acide camphorsulfonique (1,2g ; 5,2mmol ; 0,1éq.) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est agité à 40°C sous un léger vide pendant 5 heures. La réaction est ensuite stoppée par neutralisation à la triéthylamine puis le mélange est concentré sous pression réduite. Le résidu est utilisé directement pour l'étape suivante.

Etape 2 :

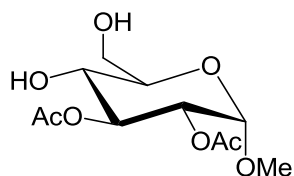
La totalité du résidu de l'étape 1 est mise en solution dans un mélange de pyridine (50mL) et d'anhydride acétique (50mL) à température ambiante, puis agité pendant 12h. Le mélange réactionnel est ensuite concentré sous pression réduite et co-éaporé 2 fois au toluène. Le solide obtenu est repris dans du dichlorométhane (80mL) puis lavé successivement avec une solution d'HCl 1M, une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis à l'eau. La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole / acétate d'éthyle 7/3), le produit **3** est isolé avec 63% de rendement (11,7g).

^1H RMN (298K, 300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 7.54 – 7.40 (m, 2H. arom.), 7.39 – 7.30 (m, 3H. arom.), 5.59 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8$ Hz, H_3), 5.51 (s, 1H, CH-Ph), 4.93 (m, 1H, H_2), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H_1), 4.31 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.6$, $J_{6a,6b} = 10.2$ Hz, H_{6a}), 3.92 (ddd, 1H, $J_{6a,6b} = 10.2$; $J_{5,6b} = 4.6$ Hz, H_{6b}), 3.79 (t, 1H, $J_{4,5} = J_{5,6} = 10.2$ Hz, H_5), 3.65 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8$ Hz, H_4), 3.41 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.10 - 2.06 (2s, 6H, $-\text{COCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 75 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 170.58, 169.95 ($-\text{COCH}_3$), 137.04 (Cq. arom.), 129.22, 128.37, 126.27 (5x CH arom.), 101.71 ($-\text{CH-Ph}$), 97.73 (C_1), 79.35 (C_4), 71.73 (C_2), 69.09 68.99, 62.46 ($\text{C}_{3,5,6}$), 55.51 ($-\text{OCH}_3$), 21.01, 20.94 ($-\text{COCH}_3$).

MS-ESI⁺ : m/z = 389.12 [M+Na]⁺

2,3-Di-O-acétyl- α -D-glucopyranoside de méthyle (4)



Le benzylidène **3** (5g ; 13,66mmol) est mis en solution dans l'acétonitrile (200mL) puis l'acide tétrafluoroborhydrique 50% en volume dans l'eau (3mL) et 1.5mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est agité à température ambiante pendant 30 minutes, puis neutralisé à l'aide de triéthylamine et concentré. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 95/5) et le produit **4** est isolé avec 50% de rendement (1,9g).

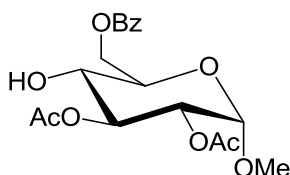
¹H RMN (298K, 300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 5.30 (m, 1H, H₃), 4.91 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H₁), 4.83 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.6$; $J_{2,3} = 10.2$ Hz, H₂), 3.87 (m, 2H, H₅, H_{6b}), 3.71 (m, 2H, H₄, H_{6a}), 3.40 (s, 3H, -OCH₃), 2.11 - 2.09 (2s, 6H, -COCH₃).

¹³C RMN (298K, 75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 172.16, 170.49 (-COCH₃), 96.92 (C₁), 73.61 (C₃), 71.29 (C₅), 70.83 (C₂), 70.06 (C₄), 62.18 (C₆), 55.43 (-OCH₃), 21.08, 20.96 (-COCH₃).

MS-ESI⁺ : m/z = 301.18 [M+Na]⁺

$[\alpha]_D^{26} + 97.5$ (C 1.19 CHCl₃) lit.^[220]: $[\alpha]_D^{27} + 114.5$ (C 0.1 MeOH)

2,3-Di-O-acétyl-6-O-benzoyl- α -D-glucopyranoside de méthyle (5)



Le 1-(benzoyloxy)-benzotriazole (1,39g ; 5,77mmol ; 1,1éq.) et la triéthylamine (0,924mL ; 6,6mmol ; 1,2éq.) sont ajoutés à une solution de diol **4** (1,53g ; 5,5mmol) dans du dichlorométhane (30mL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 18 heures, puis versé dans une ampoule à décanter contenant 30mL d'eau glacée. La phase organique est extraite au dichlorométhane, lavée avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium, puis elle est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole / acétate d'éthyle 4/6), le produit **5** est isolé avec 54% de rendement (1,25g).

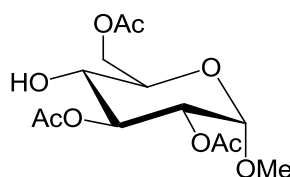
^1H RMN (298K, 300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 8.12 – 7.99 (m, 2H, H_{arom}), 7.64 – 7.52 (m, 1H, H_{arom}), 7.51 – 7.40 (m, 2H, H_{arom}), 5.32 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8$ Hz, H_3), 4.92 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H_1), 4.86 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.8$; $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H_2), 4.75 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.3$, $J_{6a,6b} = 10.2$ Hz, H_{6a}), 4.54 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 2.22$; $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H_{6b}), 3.95 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 10.0$; $J_{5,6a} = 4.4$; $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, H_5), 3.63 (td, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5$; $J_{4,\text{OH}} = 5.1$ Hz, H_4), 3.42 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.15 (d, 1H, $J_{4,\text{OH}} = 5.1$ Hz, 4-OH), 2.09 (2s, 6H, $-\text{COCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 75 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 171.74, 170.47, 167.13 ($-\text{CO}$), 133.46 (Cq. arom.), 129.94 – 128.62 (5x CH arom.), 96.97 (C_1), 72.99 (C_3), 70.77 (C_2), 70.07 (C_5), 69.55 (C_4), 63.43 (C_6), 55.45 ($-\text{OCH}_3$), 21.05, 20.94 ($-\text{COCH}_3$).

MS-ESI⁺ : $m/z = 405.05$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 93.2$ (C 0.59 CHCl_3)

2,3,6-Tri-O-acétyl- α -D-glucopyranoside de méthyle (6)



Le 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranoside de méthyle (15g ; 46,8mmol) est mis en solution dans un mélange de tert-butanol (150mL) et d'alcool tert-amyle (150mL), puis la lipase Novozym435 de *Candida antarctica* (30g) est ajoutée au milieu. Le mélange est placé sous faible agitation à 37°C. Après 4 jours de réaction, le mélange réactionnel est filtré puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole / acétate d'éthyle 5/5), le composé **6** est isolé avec 35% de rendement (4,65g).

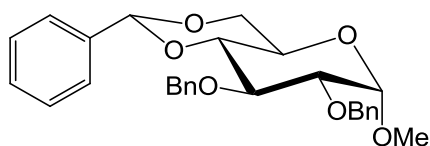
^1H RMN (298K, 300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 5.30 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H_3), 4.91 – 4.84 (m, 2H, H_1 , H_2), 4.50 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.2$; $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H_{6a}), 4.29 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.2$, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, H_{6b}), 3.84 – 3.80 (m, 1H, H_5), 3.63 – 3.44 (m, 1H, H_4), 3.40 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.96 (d, 1H, $J_{4,\text{OH}} = 5.1$ Hz, 4-OH), 2.23 – 1.91 (3s, 9H, $-\text{COCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 75 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 171.83, 171.70, 170.44 ($-\text{COCH}_3$), 97.00 (C_1), 73.03 (C_3), 70.67 (C_2), 69.86 (C_5), 69.47 (C_4), 62.94 (C_6), 55.47 ($-\text{OCH}_3$), 21.05, 21.01, 20.94 ($-\text{COCH}_3$).

MS-ESI⁺ : $m/z = 343.12$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 98.4$ (C 1.18 CHCl_3) lit.^[251]: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 100.8$ (C 1.0 CHCl_3)

2,3-Di-O-benzyl-4,6-benzylidène- α -D-glucopyranoside de méthyle (7)



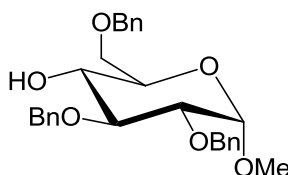
Le α,α -diméthoxytoluène (9,5mL ; 63,3mmol ; 1,2éq.) et l'acide camphorsulfonique (0,172g ; 5,2mmol ; 0,1éq.) sont ajoutés à une solution d' α -D-glucopyranoside de méthyle (10g ; 51,5mmol) dans le DMF (100mL). Le mélange est agité à 50°C sous un léger vide pendant 7 heures. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec du DMF (20mL) et refroidi à 0°C, puis le bromure de benzyle (13mL ; 2éq.) est ajouté. L'hydrure de sodium à 50% dans l'huile (5g ; 2éq.) est alors ajouté à la solution par portion en 1 heure. Le mélange est gardé à 0°C sous agitation pendant 1 heure supplémentaire puis pendant 12h à température ambiante. Du méthanol (75mL) est ajouté au milieu réactionnel pour détruire l'hydrure de sodium résiduel et le mélange est agité pendant 45 minutes. La totalité est ensuite versée dans une ampoule à décanter contenant de l'eau glacée, puis la phase organique est extraite à l'éther diéthylique, séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Le produit **7** est isolé après recristallisation dans un mélange d'éther diéthylique et d'éther de pétrole avec 63% de rendement (15g).

^1H RMN (298K, 300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 7.55 – 7.24 (m, 15H, arom.), 5.57 (s, 1H, -CH-Ph), 4.95 – 4.69 (m, 4H, 2x -CH₂-Ph), 4.61 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H₁), 4.28 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 9.9$; $J_{5,6a} = 4.5$ Hz, H_{6a}), 4.07 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.9$ Hz, H₃), 3.83 (ddd, 1H, $J_{6a,6b} = 9.9$, $J_{5,6b} = 4.4$ Hz, H_{6b}), 3.72 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, H₄), 3.67 – 3.53 (m, 2H, H₅, H₂), 3.42 (s, 3H, -OCH₃).

^{13}C RMN (298K, 300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 138.81, 138.25, 137.50 (Cq. arom.), 129.11, 129.03, 128.78, 128.63, 128.57, 128.43, 128.34, 128.24, 128.15, 128.06, 128.04, 127.71, 126.14 (15x CH arom.), 101.36 (-CH-Ph), 99.34 (C₁), 82.22 (C₂), 79.24 (C₄), 78.71 75.48, 73.91 (3x CH₂-Ph), 69.16 (C₃), 62.42 (C₅), 55.47 (-OCH₃).

MS-ESI⁺ : m/z = 484.9 [M+Na]⁺

2,3,6-Tri-O-benzyl- α -D-glucopyranoside de méthyle (8)



Le benzylidène **7** (6,5g ; 14mmol) et du cyanoborohydrure de sodium (10,7g ; 170mmol ; 12 éq.) sont mis en solution dans du THF anhydre (165mL). La solution est agitée à température ambiante puis l'acide hydrochlorique à 2M dans l'éther diéthylique (environ 90mL) est ajouté au goutte à goutte jusqu'à cessation de l'émission gazeuse et disparition du benzylidène de départ. Le mélange réactionnel est ensuite dilué avec du dichlorométhane (80mL) puis versé dans une ampoule à décanter contenant de l'eau glacée. La phase organique est ensuite lavée 5 fois avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate, séchée sur sulfate de sodium anhydre puis concentrée. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole / acétate d'éthyle 1/3) et le composé **8** est isolé avec 79% de rendement (5,15g).

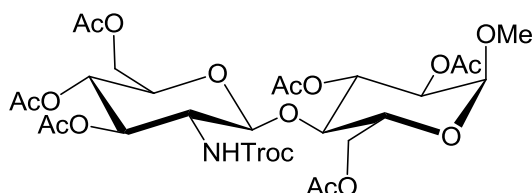
^1H RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 7.36 – 7.29 (m, 15H, arom.), 5.00 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, CH_2Ph), 4.90 – 4.79 (m, 4H, CH_2Ph), 4.58 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H_1), 4.02 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, H_3), 3.78 (dd, 1H, $J_{1,2} = 2.6$; $J_{2,3} = 9.1$ Hz, H_2), 3.73 – 3.60 (m, 2H, H_{6a} , H_{6b}), 3.57 – 3.44 (m, 2H, H_4 , H_5), 3.37 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 101 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 138.84, 138.24, 138.22 (Cq. arom.), 128.60, 128.52, 128.24, 128.15, 128.09, 128.07, 127.99, 127.74 (15x CH arom.), 98.29 (C_1), 82.07 (C_2), 80.09 (C_4), 77.51, 75.87, 75.15, 73.55, 70.78 ($\text{C}_{3,5}$, 3x- CH_2 -Ph), 61.98 (C_6), 55.31 ($-\text{OCH}_3$).

MS-ESI $^+$: $m/z = 487.3$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

III.3. Synthèse de fluorures de glycosyles disaccharidiques

3,4,6-Tri-O-acétyl-2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbamoyl)-β-D-glucopyranosyl)-
(1→4)-2,3,6-tri-O-acétyl-α-D-glucopyranoside de méthyle (9)



Le donneur **2** (203mg ; 0,33mmol ; 2éq.) et l'accepteur **6** (57mg ; 0,16mmol) sont mis en solution sous argon dans du dichloroéthane anhydre fraîchement distillé (8mL) pendant 20 minutes à température ambiante. Le triflate d'argent (1,68g ; 1,38mmol ; 4éq.) est ensuite ajouté au mélange puis celui-ci est agité pendant 2,5 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est alors dilué avec du dichlorométhane (30mL) puis filtré. La phase organique est lavée successivement avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium et à l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (toluène / acétate d'éthyle 85/15), le disaccharide **9** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec 17% rendement (22mg).

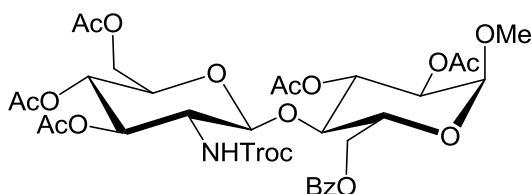
^1H RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 5.47 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$ Hz, H_3^{II}), 5.31 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 11.1$ Hz, NH), 5.01 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$ Hz, H_3^{I}), 4.96 – 4.57 (m, 5H), 4.31 (m, 3H, H, $\text{CH}_2\text{-CCl}_3$), 4.05 (d, 1H, $J = 14.5$ Hz), 3.93 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz), 3.66 (d, 2H, $J = 9.9$ Hz), 3.60 – 3.46 (m, 1H), 3.37 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.29 – 1.90 (m, 18H, $-\text{COCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 101 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 171.04, 170.63, 170.52, 170.43, 170.23, 169.59 (CO), 154.05 (NCO), 99.96, 97.04, 96.82, 95.55 ($-\text{CCl}_3$), 76.19, 74.67, 72.02, 71.82, 71.14, 69.63, 68.56, 68.14 ($\text{C}_2^{\text{I}}, \text{C}_3^{\text{I,II}}, \text{C}_4^{\text{I,II}}, \text{C}_5^{\text{I,II}}, -\text{CH}_2\text{-CCl}_3$), 62.33, 61.97 ($\text{C}_6^{\text{I,II}}$), 56.76 (C_2^{II}), 55.52 ($-\text{OCH}_3$), 29.84, 21.09, 20.88, 20.80 (x2), 20.74 ($-\text{COCH}_3$)

MS-ESI⁺ : $m/z = 804.2$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 45.2$ (C 0.48 CHCl_3)

3,4,6-Tri-O-acétyl-2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbamoyl)-β-D-glucopyranosyl)-
(1→4)-2,3-di-O-acétyl-6-O-benzoyl-α-D-glucopyranoside de méthyle (10)



Le donneur **2** (213mg ; 0,35mmol ; 1éq) et l'accepteur **5** (400mg ; 1,05mmol) sont mis en solution sous argon dans du dichloroéthane anhydre fraîchement distillé (25mL) pendant 20 minutes à température ambiante. Le triflate d'argent (355mg ; 1,39mmol ; 4éq.) est ensuite ajouté au mélange et celui-ci est agité pendant 1,5 heures. Le mélange réactionnel est dilué avec du dichlorométhane (50mL) puis filtré. La phase organique est alors lavée successivement avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium et à l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (toluène / acétate d'éthyle 80/20), le disaccharide **10** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec 15% de rendement (44mg).

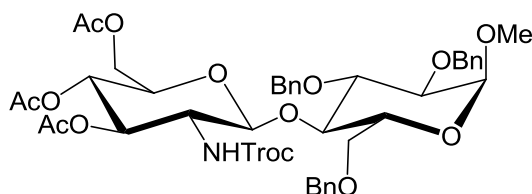
^1H NMR (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 8.08 – 8.00 (m, 2H, arom), 7.64 – 7.58 (m, 1H, arom), 7.48 (m, 2H, arom), 5.50 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.7$ Hz, H_3^{II}), 5.33 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.2$ Hz, H_3^{I}), 5.00 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, H_4^{II}), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H_1^{I}), 4.84 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.1$; $J_{2,1} = 3.6$ Hz, H_2^{I}), 4.78 – 4.69 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$), 4.68 – 4.60 (m, 2H), 4.53 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.2$; $J_{5,6a} = 4.3$, H_{6a}^{I}), 4.31 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.2$; $J_{5,6a} = 4.1$ Hz, $\text{H}_{6a}^{\text{II}}$), 4.26 – 4.18 (m, 1H), 4.17 – 3.94 (m, 3H), 3.84 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, H_4^{I}), 3.62 – 3.51 (m, 1H, H_5^{II}), 3.39 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.13 – 1.93 (m, 15H, $-\text{COCH}_3$).

^{13}C NMR (298K, 101 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 170.46, 170.38, 170.33, 170.03, 169.42, 166.35 ($-\text{CO}$), 153.96 ($-\text{NCO}$), 133.53 (Cq. arom.), 129.74 (x2), 129.53, 128.61 (x2) (CH arom.), 96.66 (C_1^{II}), 95.44 ($-\text{CCl}_3$), 91.83 (C_1^{I}), 75.99, 74.62, 71.89, 71.04, 69.61, 68.30, 68.27, ($\text{C}_{3,4,5}^{\text{II}}$, C_2^{I}), 62.58 (C_6^{I} ou II), 62.01 ($-\text{CH}_2-\text{CCl}_3$), 61.68 (C_6^{I} ou II), 56.59 ($-\text{OCH}_3$), 55.38 (C_2^{II}), 20.74, 20.72, 20.61, 20.58, 20.55 ($-\text{COCH}_3$).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{NO}_{18}\text{NaCl}_3 = 866.1209$; m/z obtenue = 866.1235 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺

3,4,6-Tri-O-acétyl-2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbonyl)-β-D-glucopyranosyl)-
(1→4)-2,3,6-tri-O-benzyl-α-D-glucopyranoside de méthyle (11)



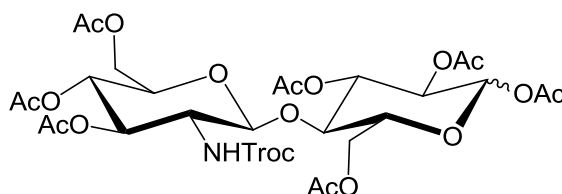
Le donneur **2** (2,93g ; 4,77mmol ; 1,1éq) et l'accepteur **8** (2,06g ; 4,34mmol) sont mis en solution sous argon dans du dichlorométhane anhydre fraîchement distillé (85mL) pendant 20 minutes à température ambiante. Le triflate d'argent (2,45g ; 9,54mmol ; 2,2éq) est ensuite ajouté au mélange, puis celui-ci est agité pendant 1 heure. Le mélange réactionnel est dilué avec du dichlorométhane (130mL) puis filtré. La phase organique est alors lavée successivement avec une solution d'hydrogencarbonate de sodium et à l'eau, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (toluène / acétate d'éthyle 85/15), le disaccharide **11** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec 39% de rendement (1,6g).

^1H RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 7.59 – 7.20 (m, 15H, arom.), 4.99 (d, 1H, $J_{3,4} = 11.5$ Hz, H_3^{I}), 4.96 – 4.66 (m, 6H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.66 – 4.52 (m, 3H, $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$, H_1^{I}), 4.34 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, NH), 4.21 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_1^{II}), 4.12 (dd, 1H, $J_{2,3} = 12.3$; $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H_2^{I}), 3.90 (m, 1H, H_{6a}^{I}), 3.86 – 3.75 (m, 3H, H_3^{II} , $\text{H}_{6a}^{\text{II}}$, H_{6b}^{I}), 3.68 (m, 1H, $\text{H}_{6b}^{\text{II}}$), 3.61 – 3.53 (m, 2H, H_4^{I} , H_5^{I}), 3.47 (m, 2H, H_4^{II} , H_2^{II}), 3.40 (m, 1H, H_5^{II}), 3.35 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.01-1.93 (3s, 9H, $-\text{COCH}_3$). (lit.^[215])

^{13}C RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 171.15, 170.88, 170.01 ($-\text{COCH}_3$), 154.37 ($-\text{NCO}$), 137.87 (3x Cq. arom.), 130.03, 129.73, 129.69, 129.64, 129.58, 128.88, 128.69, 128.58, 128.33, 127.66, 127.59 (15x CH arom.), 101.20 (C_1^{II}), 98.96 ($-\text{CCl}_3$), 96.12 (C_1^{I}), 80.73, 79.12, 75.72, 74.95, 74.21, 74.05, 72.87, 71.70, 69.66, 69.13 (C_2^{I} , $\text{C}_{3,4,5}^{\text{II}}$, 3x $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 67.67, 62.34 ($\text{C}_6^{\text{I,II}}$), 56.71 (C_2^{II}), 55.81 ($-\text{OCH}_3$), 21.19 (3x $-\text{COCH}_3$).

MS-ESI⁺ : $m/z = 950.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

3,4,6-Tri-O-acétyl-2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbamoyl)-β-D-glucopyranosyl)-
(1→4)-1,2,3,6-tétra-O-acétyl-α,β-D-glucopyranose (12)



Etape 1 :

Le disaccharide **11** (300mg ; 0,32mmol) est mis en solution dans l'acétate d'éthyle (4.3mL) puis une solution de bromate de sodium (439mg ; 2,93mmol) dans l'eau (3,2mL) et une solution d'hydrosulfite de sodium (450mg ; 2,59mmol) dans l'eau (2,6mL) sont ajoutés. Le mélange est fortement agité pendant 3,5 heures puis le milieu est dilué avec de l'acétate d'éthyle (25mL) et neutralisé avec une solution de thiosulfate de sodium à 10% en masse. La phase organique est alors lavée à l'eau puis séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée.

Etape 2 :

La totalité du résidu obtenu est mise en solution dans un mélange d'anhydride acétique, d'acide acétique et d'acide sulfurique (7/3/0,1 v/v) (5mL) puis la solution est agitée à température ambiante pendant 30 heures. La réaction est alors neutralisée avec une solution saturée de carbonate de sodium, puis diluée avec du dichlorométhane (30mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et à l'eau puis elle est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice, le composé **12** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec 40% de rendement (105mg).

^1H RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 6.26 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, $\text{H}_{1\alpha}^I$), 5.66 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, $\text{H}_{1\beta}^I$), 5.46 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8$ Hz, H_3^I), 5.41-5.33 (m, 3H, H_3^{II} , NH, H), 5.08-4.94 (m, 2H, H_2^I , H_1^{II}), 4.81-4.63 (m, 3H, H_4^{II} , $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$), 4.40 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.4$; $J_{5,6a} = 4.2$ Hz, H_{6a}^I), 4.35-4.23 (m, 2H, H_{6a}^{II} , H_{6b}^I), 4.04 (m, 2H, H_{6b}^{II} , H_5^I), 3.82 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8$ Hz, H_4^I), 3.67 (m, 1H, H_5^{II}), 3.54 (m, 1H, H_2^{II}), 2.19-1.97 (m, 21H, $-\text{COCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 101 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 170.97, 170.58, 170.49, 170.13, 169.98, 169.60, 168.98 ($-\text{COCH}_3$), 154.03 ($-\text{NCO}$), 100.48 (C_1^{II}), 95.75 (CCl_3), 92.00 ($\text{C}_{1\beta}^I$), 89.12

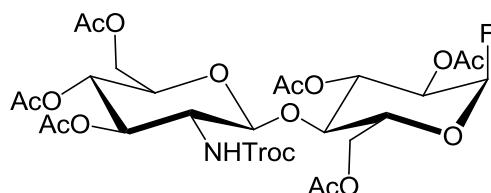
(C_{1a}^I), 75.71, 74.68, 72.10, 70.90, 69.48, 68.44 (C_{3,4,5}^{I,II}, C₂^I), 61.90, 61.76 (C₆^{I,II}), 56.77 (C₂^{II}), 21.11, 21.06, 20.84, 20.83, 20.74, 20.72, 20.63 (-COCH₃).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour C₂₉H₃₈NO₁₉NaCl₃ = 834.0980 ; m/z obtenue = 834.0979 [M+Na]⁺

[α]_D²⁶ + 23.5 (C 0.59 CHCl₃)

Fluorure de 3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbonyl)-α-D-glucopyranosyl)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acétyl-α-D-glucopyranosyle (13)



Le disaccharide **12** (72mg ; 0,09mmol) est dissous à 0°C dans une solution d'acide fluorhydrique dans la pyridine (70/30 v/v) (0,6mL) dans un flacon en plastique. Le mélange est agité à 0°C pendant 30 minutes puis à température ambiante pendant 3,5 heures. La solution est ensuite diluée avec du dichlorométhane (20mL) puis versée dans une solution d'ammoniaque à 3M (50mL) et le mélange est agité pendant 40 minutes. La phase organique est ensuite lavée successivement avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, à l'eau, puis elle est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice (toluène / acétate d'éthyle 5/5), le disaccharide **13** est isolé avec 50% de rendement.

¹H RMN (298K, 400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 5.68 (dd, 1H, J_{1,2} = 2.8 ; J_{H,F} = 53.1 Hz, H₁^I), 5.51 (t, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8 Hz, H₃^I), 5.36 (m, 2H, H₃^{II}, NH), 5.00 (t, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8 Hz, H₄^{II}), 4.89 (ddd, 1H, J_{H,F} = 24.3 ; J_{2,3} = 10.1 ; J_{1,2} = 2.8 Hz, H₂^I), 4.82 – 4.55 (m, 3H, H₁^{II}, -CH₂CCl₃), 4.44 – 4.22 (m, 3H, H_{6a}^{II}, H_{6a}^I, H_{6b}^{II}), 4.17 (m, 1H, H₅^I), 4.06 (dd, 1H, J_{6a,6b} = 12.3 ; J_{5,6b} = 2.8 Hz, H_{6b}^I), 3.87 (t, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8 Hz, H₄^I), 3.69 (ddd, 1H, J_{4,5} = J_{5,6a} = 10.0 ; J_{5,6b} = 2.8 Hz, H₅^{II}), 3.62 - 3.36 (m, 1H, H₂^{II}), 2.23 - 1.95 (m, 18H, -COCH₃).

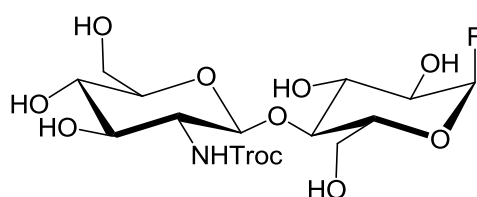
¹³C RMN (298K, 101 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 170.81, 170.61, 170.46, 170.23 (x2), 169.61 (-COCH₃), 153.99 (-NCO), 103.8 (J_{C,F} = 225 Hz, C₁^I), 99.55 (C₁^{II}), 95.4 (-CCl₃), 75.01,

74.69, 72.12, 71.69, 70.69, 70.46, 68.65, 68.53 (-CH₂CCl₃, C₂^I, C_{3,4,5}^{I,II}), 61.98, 61.75 (C6^{I,II}), 56.73 (C₂^{I,II}), 21.05, 20.83, 20.76, 20.71 (6C -COCH₃).

HRMS TOF-ESI⁺:

m/z calculée pour C₂₇H₃₅NO₁₇NaCl₃F = 792.0852 ; m/z obtenue = 792.0821 [M+Na]⁺

Fluorure de 2-désoxy-2-(2,2,2-trichloroéthoxycarbamoyl)-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-α-D-glucopyranosyle (14)

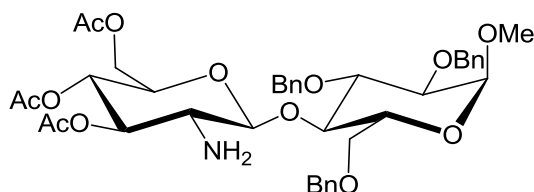


Du méthanoate de sodium à 1M (20μL) est ajouté à une solution de disaccharide **13** (21mg ; 0,027mmol) dans le méthanol (4mL) à 0°C, puis le mélange est agité pendant 3 heures. Le mélange réactionnel est ensuite neutralisé par la résine acide Amberlite IR120-H⁺, puis concentré. Le résidu est alors repris dans l'eau et lyophilisé. Le composé **14** est isolé de manière quantitative et utilisé sans autre purification.

¹H RMN (298K, 400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 5.77 (dd, 1H, J_{1,2} = 2.2 ; J_{H,F} = 53.3Hz, H₁^I), 5.07 (d, 1H, J_{NH,2} = 12.3 Hz, NH), 4.69 (d, 1H, J_{1,2} = 7.9 Hz, H₁^{II}), 4.15 – 3.51 (m, 12H).

MS ESI⁺ : m/z = 540.1 [M+Na]⁺

3,4,6-Tri-O-acétyl-2-amino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzyl-α-D-glucopyranoside de méthyle (15)



Activation du Zinc

La poussière de Zinc (5g) est mise en suspension pendant 15 minutes dans l'acide hydrochlorique à 20% (10mL) puis lavée successivement avec de l'eau, de l'éthanol, de l'acétone et de l'éther diéthylique avant d'être séchée sous vide.

De la poussière de Zinc activé (1g) est ajoutée à température ambiante à une solution de disaccharide **11** (1,1g ; 1,2mmol) dans l'acide acétique (15mL). Le mélange est agité pendant 3,5 heures jusqu'à disparition totale du produit de départ avant d'être filtré sur célite et lavé au toluène. La phase organique résultante est alors concentrée puis co-évaporée trois fois avec du toluène. Le produit **15** est isolé après purification par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle/toluène 9/1) avec 97% de rendement (874mg).

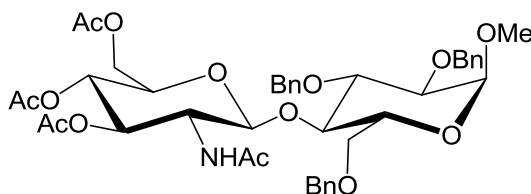
^1H RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 7.53 – 7.17 (m, 15H, arom.), 4.97 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.87 – 4.67 (m, 4H, 2x $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.67 – 4.56 (m, 2H, H_1^{I} , H_4^{II}), 4.48 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, H_3^{I}), 4.26 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H_1^{II}), 4.17 (dd, 1H, $J_{2,3} = 12.2$; $J_{1,2} = 4.2$ Hz, H_2^{I}), 4.10 – 3.85 (m, 4H), 3.76 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, H_3^{II}), 3.67 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz), 3.54 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.5$; $J_{4,5} = 3.6$ Hz, H_4^{I}), 3.40 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.32 (m, 1H, H_5^{II}), 2.79 (dd, 1H, $J_{\text{NH}_a,2} = J_{\text{NH}_b,2} =$, H_2^{II}), 2.08 - 1.98 (3s, 9H, $-\text{COCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 101 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 170.74 (x2), 169.82 ($-\text{COCH}_3$), 139.46, 138.27, 137.74 (Cq. arom.), 128.69, 128.42, 128.32, 128.28, 128.18, 128.16, 127.87, 127.40, 127.25 (15x CH arom.), 102.89 (C_1^{II}), 98.38 (C_1^{I}), 80.30, 79.14, 76.16, 75.40, 75.10, 73.59 (x2), 71.56, 69.64, 68.77, 68.12 ($\text{C}_{2,3,4,5}^{\text{I,II}}$, 3x $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 62.10 ($\text{C}_6^{\text{I,II}}$), 55.38 ($-\text{OCH}_3$), 20.90, 20.73 (x2) ($-\text{COCH}_3$).

MS ESI⁺ : $m/z = 752.4$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺

$[\alpha]_D^{26} + 8.3$ (C 0.61 CHCl₃)

2-Acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzyl-
α-D-glucopyranoside de méthyle (16)



De l'anhydride acétique (0,5mL) et de la triéthylamine (0,5mL) sont ajoutés à température ambiante à une solution de disaccharide **15** (325mg ; 0,42mmol) dans le dichlorométhane (7mL). Le mélange est agité pendant 30 minutes avant d'être dilué avec du dichlorométhane (25mL). La phase organique est lavée successivement avec une solution d'acide hydrochlorique 1M, une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis avec de l'eau. La phase lavée est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Le composé **16** est isolé après purification sur gel de silice (acétate d'éthyle/éther de pétrole 95/5) sous forme d'un solide blanc avec 92% de rendement (316mg).

¹H RMN (298K, 400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 7.54 – 7.21 (m, 15H, arom.), 4.92 – 4.62 (m, 6H, 3x -CH₂Ph), 4.52 (m, 3H), 4.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.09 (dd, *J* = 12.4 ; 4.1 Hz, 1H), 3.91 – 3.78 (m, 4H), 3.69 – 3.56 (m, 2H), 3.53 – 3.39 (m, 3H, H₅^{II}, H₄^I), 3.36 (s, 3H, -OCH₃), 1.99 (3s, 9H, -COCH₃), 1.71 (s, 3H -NHCOCH₃).

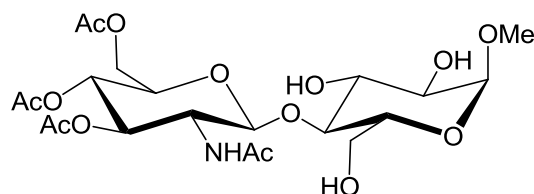
¹³C RMN (298K, 101 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 171.40, 170.84, 169.86, 169.47 (-COCH₃), 139.75, 138.37, 137.94 (Cq. arom.), 129.14, 129.08, 129.04, 128.49, 128.28, 128.23, 127.93, 127.23, 127.19 (15x CH arom.), 100.65 (C₁^I), 98.55 (C₁^{II}), 80.22, 79.01, 75.17, 73.90, 73.64, 73.02, 71.48, 69.50, 68.63, 67.67 (C₂^I, C_{3,4,5}^{I,II}, C₆^{II} 3x -CH₂-Ph), 62.01 (C₆^{II}), 55.49 (C₂^{II}), 54.70 (-OCH₃), 23.33 (-NCOCH₃), 20.77 (3x -COCH₃).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour C₄₂H₅₁NO₁₄Na = 816.3207 ; *m/z* obtenue = 816.3243 [M+Na]⁺

$[\alpha]_D^{26} + 9.23$ (C 0.87 CHCl₃)

2-Acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-α-D-glucopyranoside de méthyle (17)



Le disaccharide **16** (936mg ; 1,18mmol) est mis en solution à température ambiante dans un mélange de méthanol et de dichlorométhane (50/50 v/v) (28mL), puis l'hydroxyde de Palladium (20% moist) (450mg) est ajouté. Le mélange est placé sous agitation, et maintenu sous atmosphère de dihydrogène pendant 5 heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite et lavé au dichlorométhane et au méthanol puis concentré. Après purification sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 9/1) le produit **17** est isolé sous forme d'un solide blanc avec 96% de rendement (590mg).

^1H RMN (298K, 400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 5.28 (dd, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$ Hz, H_3^{II}), 5.01 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$ Hz, H_3^{I}), 4.79 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, H_1^{II}), 4.69 (d, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, 1H, H_1^{I}), 4.24 (d, 2H, $J = 4.1$ Hz), 4.00 – 3.84 (m, 2H, H_{6a}^{I} , $\text{H}_{6a}^{\text{II}}$), 3.80 – 3.72 (m, 2H, $\text{H}_{6b}^{\text{II}}$, H_5^{I}), 3.66 – 3.55 (m, 2H, H_{6b}^{I} , H_5^{II}), 3.53 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, H_2^{II}), 3.46 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.6$; $J_{4,5} = 3.8$ Hz, H_4), 3.42 (s, 3H, -OCH₃), 3.34 (m, 3H, OH), 2.11 – 2.01 (3s, 9H, -COCH₃), 1.97 (s, 3H, -NCOCH₃).

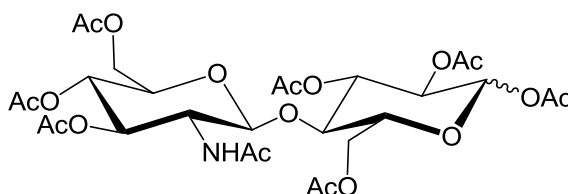
^{13}C RMN (298K, 101 MHz, MeOD) : δ (ppm) 171.13, 170.90, 170.77, 169.46 (-COCH₃), 102.25 (C_1^{I}), 99.29 (C_1^{II}), 81.27, 72.65 (x2), 72.35, 72.15, 69.76, 68.55 ($\text{C}_{3,4,5}^{\text{I,II}}$, C_2^{I}), 62.21, 60.70 ($\text{C}_6^{\text{I,II}}$), 55.55 (C_2^{II}), 54.33 (-OCH₃), 23.24, 20.82, 20.78, 20.73 (-COCH₃).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour C₂₁H₃₃NO₁₄Na = 546.1801 ; m/z obtenue = 546.1799 [M+Na]⁺

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 76.4$ (C 0.54 CHCl₃)

2-Acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-α,β-D-1,2,3,6-tétra-O-acétylglucopyranose (18)



Le disaccharide **17** (164mg ; 0,31mmol) est mis en solution à température ambiante dans un mélange d'anhydride acétique, d'acide acétique et d'acide sulfurique (7/3/0.1 v/v) (4mL) puis agité pendant 14 heures. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis dilué avec du dichlorométhane (25mL). Après extraction au dichlorométhane, la phase organique est lavée successivement avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate et avec de l'eau avant d'être séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée. Le composé **18** α/β (80/20) est isolé après purification par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle / toluène 9/1) sous forme d'un solide blanc avec 96% de rendement (204mg).

Isomère β :

^1H RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 5.85 (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 8.8$ Hz, NH), 5.66 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H_1^β), 5.36 – 5.17 (m, 2H), 5.11 – 4.93 (m, 2H), 4.68 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.35 (dd, 2H, $J = 12.4$; 4.6 Hz), 4.26 (dd, 1H), 4.02 (dd, 1H, $J = 12.4$; 2.4 Hz), 3.78 (dd, 2H), 3.73 (dd, 1H, $J = 8.5$; 2.0 Hz), 3.66 (ddd, 1H, $J = 10.1$; 4.6 ; 2.3 Hz), 2.13 – 1.92 (8s, 18H, $-\text{COCH}_3$).

Isomère α :

^1H RMN (298K, 400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6.25 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H_1^α), 5.83 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.9$ Hz, H_1^β), 5.45 (dd, $J = 10.3$; 9.2 Hz, 1H), 5.23 (dd, 1H), 5.11 – 4.94 (m, 2H), 4.59 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.37 (ddd, $J = 12.7$; 8.9 ; 4.2 Hz, 2H), 4.26 (dd, 1H), 4.06 – 3.95 (m, 2H), 3.88 – 3.76 (m, 1H), 3.73 (dd, $J = 10.2$; 9.2 Hz ; 1H), 3.69 – 3.55 (m, 2H), 2.13 – 1.94 (8s, 18H, $-\text{COCH}_3$).

Mélange d'isomères :

^{13}C RMN (298K, 101 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 171.21, 170.82, 170.64, 170.48, 170.00, 169.89, 169.48, 169.05 ($-\text{COCH}_3$), 101.23 (C_1^β), 89.13 (C_1^α), 77.48, 76.05, 72.50, 72.09,

71.11, 69.62, 68.29 (C₂^I, C_{3,4,5}^{II}), 61.93, 61.65 (C₆^{II}), 55.13 (C₂^{II}), 23.35, 21.10, 21.07, 20.82, 20.80, 20.75, 20.72, 20.62 (-COCH₃).

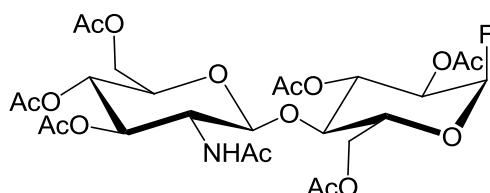
HRMS TOF-ESI⁺:

m/z calculée pour C₂₈H₃₉NO₁₈Na = 700.2065 ; m/z obtenue = 700.2047 [M+Na]⁺

isomère α : [α]_D²⁶ + 32.5 (C 0.51 CHCl₃)

isomère β : [α]_D²⁶ -15.6 (C 0.54 CHCl₃)

Fluorure de 2-acétamido-3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-α-D-2,3,6-tri-O-acétylglucopyranosyle (19)



Le disaccharide **18** (92mg ; 0,136mmol) est mis en solution à 0°C dans une solution d'acide fluorhydrique dans la pyridine (70/30 v/v) (0,8mL). La solution est alors agitée pendant 30 minutes à 0°C, puis pendant 3,5 heures à température ambiante. Le mélange est ensuite dilué avec du dichlorométhane (20mL) et versé dans 50mL d'une solution d'ammoniaque à 3M. puis agité pendant 30 minutes. La phase organique est ensuite extraite successivement avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et avec de l'eau puis elle est séchée et concentrée. Après purification par chromatographie sur gel de silice. le composé **19** est isolé 55% de rendement (rendement global α/β 82%).

¹H RMN (298K. 400 MHz. CDCl₃) : δ (ppm) 5.79 (d, 1H, J_{NH,2} = 8.6 Hz, NH), 5.68 (dd, 1H, J_{HF} = 53.1 ; J_{1,2} = 2.7 Hz, H₁^I), 5.47 (t, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8 Hz, 1H, H₃^I), 5.30 (t, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4 Hz, H₃^{II}), 5.01 (t, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6 Hz, H₄^{II}), 4.89 (ddd, 1H, J_{H,F} = 24.2, J_{2,3} = 10.1 ; J_{1,2} = 2.7 Hz, H₂^I), 4.78 (d, 1H, J_{1,2} = 8.2 Hz, H₁^{II}), 4.42 (dd, 1H, J_{5,6a} = 1.71 ; J_{6a,6b} = 12.3Hz, H_{6a}^{II}), 4.34 (dd, 1H, J_{6a,6b} = 12.4 ; J_{5,6a} = 4.8 Hz, H_{6a}^I), 4.27 (dd, 1H, J_{5,6b} = 4.2 ; J_{6a,6b} = 12.3 Hz, H_{6b}^{II}), 4.15 (dt, 1H, J_{4,5} = J_{5,6a} = 9.6 ; J_{5,6b} = 4.8 Hz, H₅^I), 4.04 (dd, 1H,

$J_{6a,6b} = 12.4$; $J_{5,6b} = 2.1$ Hz, H_{6b}^I), 3.81 (t, 1H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, H_4^I), 3.76 – 3.58 (m, 2H, H_2^{II} , H_5^{II}), 2.14 – 2.01 (6s, 18H, $-COCH_3$), 1.93 (s, 3H, $-NCOCH_3$).

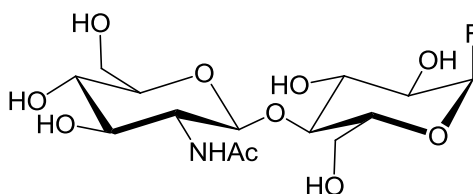
^{13}C RMN (298K, 101 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 172.62, 170.94, 170.73, 170.67, 170.50, 170.00, 169.57 ($-COCH_3$), 103.81 (C_1^I , $J_{C,F} = 228$ Hz), 100.06 (C_1^I), 75.15, 72.23, 72.06, 70.95, 70.68, 68.93, 68.43 ($C_{3,4,5}^{I,II}$, C_2^I), 62.01, 61.62 ($C_6^{I,II}$), 55.48 (C_2^{II}), 23.35, 21.05, 20.76 ($-COCH_3$).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour $C_{26}H_{36}NO_{16}FNa = 690.1916$; m/z obtenue = 690.1934 $[M+Na]^+$

$[\alpha]_D^{26} + 26.6$ (C 0.32 $CHCl_3$)

Fluorure de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyle (20)



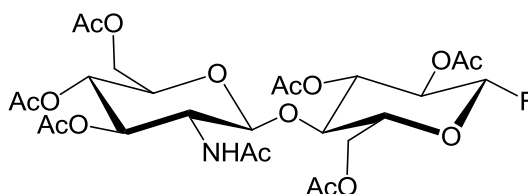
Le méthanoate de sodium à 1,0M (36 μ L) est ajouté à une solution de disaccharide **19** (30mg ; 0,047mmol) dans le méthanol (7,25mL) à 0°C. Le mélange est gardé sous agitation pendant 2 heures puis neutralisé avec la résine acide Amberlite IR120-H⁺ et concentré. Le résidu est remis en solution dans l'eau puis lyophilisé. Le disaccharide **20** est obtenu de manière quantitative et utilisé sans autre purification.

1H RMN (298K, 400 MHz, D_2O) : δ (ppm) 5.67 (dd, 1H, $J_{1,2} = 2.5$; $J_{H,F} = 53.4$ Hz, H_1^I), 4.58 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H_1^{II}), 3.99 – 3.42 (m, 13H, $H_{2,3,4,5,6}^{I,II}$), 2.06 (s, 3H, $-COCH_3$).

^{13}C RMN (298K, 101 MHz, D_2O) : δ (ppm) 174.96 ($-COCH_3$), 107.25 (C_1^I , $J_{C,F} = 222$ Hz), 101.66 (C_1^{II}), 78.29, 76.27, 73.80, 72.92, 71.45, 70.09, 69.43 ($C_{3,4,5}^{I,II}$, C_2^I), 60.91, 59.91 ($C_6^{I,II}$), 55.98 (C_2^{II}), 22.46 ($-COCH_3$).

MS ESI⁺ : m/z = 407.9 $[M+Na]^+$

Fluorure de 2-acétamido-(3,4,6-tri-O-acétyl-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-β-D-2,3,6-tri-O-acétylglucopyranosyle (21)



Etape 1 : Bromation

Le disaccharide **18** (322mg ; 0,48mmol) est mis en solution dans du dichlorométhane anhydre à 0°C (5mL), puis une solution de bromure d'hydrogène à 32% dans l'acide acétique (2,1mL) est ajoutée. Le mélange est agité dans l'obscurité pendant 30 minutes à 0°C, puis pendant 2 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite dilué avec du dichlorométhane (30mL) puis versé dans une ampoule à décanter contenant de l'eau glacée. La phase organique est lavée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (x2), une solution saturée de chlorure de sodium puis elle est séchée sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration et concentration, un solide blanc est obtenu et directement utilisé pour l'étape suivante.

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour C₂₆H₃₆NO₁₆NaBr = 720.1115 ; m/z obtenue = 720.1079 [M+Na]⁺

Etape 2 : β-fluoration

Le bromure est mis en solution dans l'acétonitrile anhydre (14mL) sous argon puis le fluorure d'argent (381mg ; 3mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 heures. Le mélange est ensuite dilué avec du dichlorométhane (30mL) et filtré sur célite. Le filtrat est lavé successivement avec de l'eau glacée, une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée. Après purification par chromatographie flash sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 9/1), le β-fluore **21** est isolé sous forme d'un solide blanc avec 73% de rendement (222mg).

¹H RMN (298K, 400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 5.86 (d, 1H, J_{NH,2} = 8.7 Hz, NH), 5.35 (dd, 1H, J_{H,F} = 52.7 ; J_{1,2} = 2.60 Hz, H₁^I), 5.24 (t, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.9 Hz, H₃^{II}), 5.18 (t, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9.9 Hz, H₃^I), 5.08 – 4.89 (m, 2H, H₄^{II}, H₂^I), 4.68 (d, 1H, J_{1,2} = 8.3 Hz, H₁^{II}), 4.43 (dd,

$J_{5,6a} = 1.2$; $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz , 1H , H_{6a}^I), 4.36 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.3$, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H_{6a}^{II}), 4.25 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.4$; $J_{6a,6b} = 12$ Hz, H_{6b}^I), 4.01 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 1.6$; $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H_{6b}^{II}), 3.95 – 3.72 (m, 3H, H_4^I , H_5^I , H_2^{II}), 3.66 (m, 1H, H_5^{II}), 2.10 – 1.98 (m, 18H, -COCH₃), 1.93 (s, 3H, -NCOCH₃). (lit.^[231])

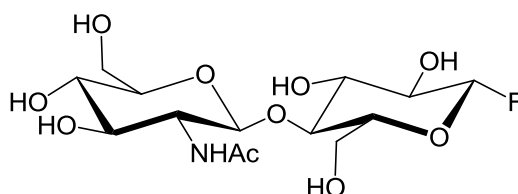
¹³C RMN (298K, 101 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 171.08, 170.84, 170.67, 170.56, 169.79, 169.48, 169.42 (-COCH₃), 105.96 ($J_{C,F} = 220$ Hz, C_1^I), 101.10 (C_1^{II}), 75.37, 72.92, 72.26, 72.05, 71.49, 71.19, 68.27 ($C_{3,4,5}^{I,II}$, C_2^I), 61.94, 61.88 ($C_6^{I,II}$), 55.18 (C_2^{II}), 23.31, 21.06, 20.80, 20.74 (7x -COCH₃).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour C₂₆H₃₆NO₁₆FNa = 660.1916 ; m/z obtenue = 660.1907 [M+Na]⁺

$[\alpha]_D^{26} -6.9$ (C 0.51 CHCl₃)

Fluorure de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyle (**22**)



Le disaccharide **21** (103mg ; 0,16mmol) est mis en solution dans du méthanol (19mL) à 0°C puis du méthanoate de sodium 1,0M (85 μ L) est ajouté. Le mélange est agité à 0°C pendant 3,5 heures puis neutralisé avec la résine Amberlite IR-120H⁺. Après filtration et concentration, le résidu est mis en solution dans l'eau et lyophilisé. Le disaccharide **22** est obtenu avec 98% de rendement (61mg), et utilisé directement pour les réactions enzymatiques.

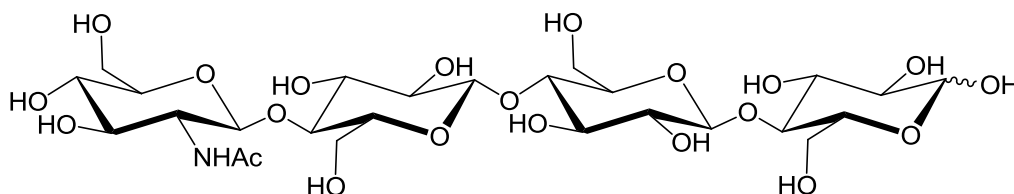
¹H RMN (298K, 400 MHz, D₂O) : δ (ppm) 5.32 (dd, 1H, $J_{1,2} = 7.3$ Hz, $J_{H,F} = 53.1$ Hz, H_1^I), 4.64 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H_1^{II}), 4.00 – 3.53 (m, 12H, $H_2^{I,II}$, $H_3^{I,II}$, $H_4^{I,II}$, $H_5^{I,II}$, $H_{6ab}^{I,II}$), 2.12 (s, 3H, -NCOCH₃). (lit.^[231])

^{13}C RMN (298K, 101 MHz, D_2O) : δ (ppm) 174.59 ($-\text{COCH}_3$), 108.9 ($J_{\text{C,F}} = 210.1\text{Hz}$, C_1^{I}), 101.34 (C_1^{II}), 78.40, 75.89, 74.52, 73.45, 72.71, 72.49, 69.76 ($\text{C}_{3,4,5}^{\text{I,II}}$, C_2^{I}), 60.57, 59.75 ($\text{C}_6^{\text{I,II}}$), 55.60 (C_2^{II}), 22.11 ($-\text{COCH}_3$).

MS ESI⁺ : $m/z = 408.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

III.4. Synthèse du tétrasaccharide par transglycosylation

2-Acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α,β -D-glucopyranose (**23**)



Méthode A : Transglycosylation avec la cellulase ONOZUKA

Le disaccharide **22** (20mg ; 0,052mmol) et le cellobiose (45mg ; 0,13mmol ; 2,5 éq.) sont mis en solution à 30°C dans un mélange d'acétonitrile et de solution tampon acétate (pH5 à 0,05M) (1mL à 55/45 v/v). La solution de cellulase ONOZUKA R-10 dans le tampon (200 μL à 10mg.mL⁻¹) est ajoutée puis le mélange est maintenu sous agitation pendant 2h30. Après disparition totale du fluorure de disaccharide de départ, la réaction est stoppée par dénaturation thermique de l'enzyme (portée 15 minutes à 100°C). Le mélange est alors concentré puis repris dans l'eau et adsorbé sur charbon et célite (2g, 1/1 en poids). Le tétrasaccharide est lavé à l'eau puis désorbé par un gradient de méthanol dans l'eau (0 \rightarrow 50% v/v). La fraction contenant le tétrasaccharide est alors concentrée, reprise dans l'eau et lyophilisée avant d'être purifiée par chromatographie SEC sur biogel P2. Le tétrasaccharide **23** est alors isolé avec 52% de rendement (19mg).

Méthode B : Transglycosylation avec le lysozyme de HEW

Le chitobiose (200mg ; 0,47mmol) et le cellotriose (428mg ; 0.85mmol ; 1,8éq.) sont mis en solution dans un mélange de solution tampon acétate (pH4,5 à 0,05M) et de dioxane (12mL) (50% v/v). La solution est agitée à 37°C pendant 20 minutes puis le lysozyme (120mg) est ajouté et la solution est celle-ci est agitée pendant 4 jours. Après dénaturation thermique de l'enzyme (15 minutes à 100°C), le précipité formé est séparé par centrifugation, puis le surnageant est concentré et lyophilisé. Le tétrasaccharide **23** est obtenu après purification par chromatographie SEC sur Biogel P2 avec 13% de rendement (41mg).

^1H RMN (298K, 400 MHz, D_2O) : δ (ppm) 5.23 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, $\text{H}_{1\alpha}^{\text{I}}$), 4.66 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, $\text{H}_{1\beta}^{\text{I}}$), 4.57 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H_1^{IV}), 4.53 (2d, 2H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, $\text{H}_1^{\text{II,III}}$), 4.08 – 3.18 (m, 24H, $\text{H}_2^{\text{I}\alpha}$, H_2^{IV} , $\text{H}_{1\alpha}^{\text{I}}$, $\text{H}_3^{\text{I-IV}}$, $\text{H}_4^{\text{I-IV}}$, $\text{H}_5^{\text{I-IV}}$, $\text{H}_{6\text{ab}}^{\text{I-IV}}$), 3.41 – 3.32 (m, 2H, $\text{H}_2^{\text{II,III}}$), 3.27 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{2,4} = 8.3$ Hz, $\text{H}_2^{\text{I}\beta}$), 2.03 (s, 3H, $-\text{NCOCH}_3$).

^{13}C RMN (298K, 101 MHz, D_2O) : δ (ppm) 174.98 (NCO), 102.73, 102.61, 101.83 ($\text{C}_1^{\text{II-IV}}$), 96.14 ($\text{C}_1^{\text{I}\alpha}$), 92.20 ($\text{C}_1^{\text{I}\beta}$), 79.46, 79.01, 78.86, 78.53 ($\text{C}_4^{\text{I}\alpha, \text{I}\beta, \text{II,III}}$), 76.26, 75.21, 75.18, 74.93, 74.63, 74.53, 74.37, 74.27, 73.83, 73.34, 73.14 ($\text{C}_2^{\text{I-III}}$, $\text{C}_3^{\text{I-IV}}$, $\text{C}_5^{\text{I-IV}}$), 71.68, 71.61, 70.50 ($\text{C}_2^{\text{I}\alpha}$, $\text{C}_3^{\text{I}\alpha}$, $\text{C}_5^{\text{I}\alpha}$), 70.11 (C_4^{IV}), 60.92, 60.39 (x2), 60.22 ($\text{C}_6^{\text{I-IV}}$), 55.98 (C_2^{IV}), 22.48 ($-\text{NCOCH}_3$).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_{21}\text{Na} = 730.2382$; m/z obtenue = 730.2377 [M+Na]⁺

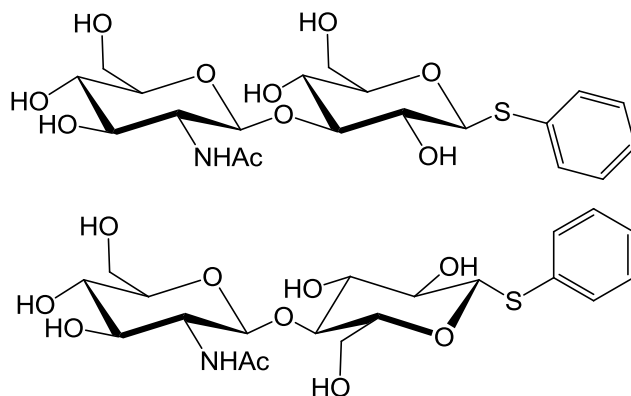
$[\alpha]_{\text{D}}^{26} +12.4$ (C 0.51 H_2O)

2-Acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→3)-β-D-glucopyranoside de thiophényle

et

2-Acétamido-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-β-D-glucopyranoside de thiophényle

(24)



Le chitobiose (112mg ; 0,26mmol) et le β-D-glucopyranoside de thiophényle (290mg ; 1,06mmol ; 4éq.) sont mis en solution dans du tampon acétate de sodium pH4,5 à 0,05M (6.5mL) et le mélange est agité à 37°C pendant 30 minutes. Le lysozyme (66mg) est ensuite ajouté, et le mélange réactionnel est agité à 37°C pendant 10 jours. La réaction est ensuite stoppée par dénaturation thermique (15 minute à 100°C), puis le précipité blanc formé est séparé par centrifugation. Le surnageant est concentré puis lyophilisé. Après purification sur SepPack C18 (eau puis gradient de méthanol dans l'eau 0→50% v/v), la fraction contenant le produit est reconcentrée puis purifiée par chromatographie sur gel de silice (acétonitrile/eau 8/2). Le résidu est concentré puis lyophilisé, et le produit **24** est obtenu sous la forme d'un mélange d'isomères (β(1-3)/β(1-4) 1:3) avec 11% de rendement (14mg).

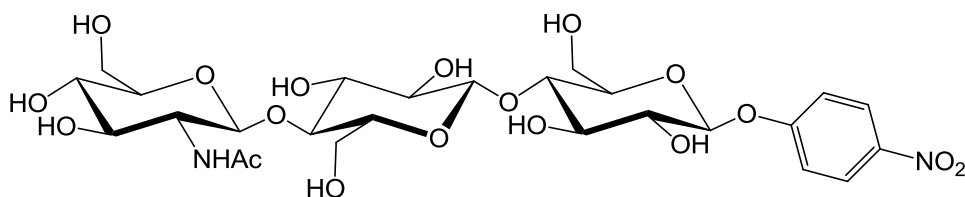
¹H RMN (298K, 400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 7.58 (dd, $J = 9.8, 4.1$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.44 – 7.18 (m, 1H, H_{arom}), 4.75 (d, 0.4H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, $H_{1\beta(1-3)}^{\text{II}}$), 4.63 (2d, 1.6H, $J_{1,2} = 10$ Hz, $H_{1\beta(1-3)}^{\text{I}}$, $H_{1\beta(1-4)}^{\text{I}}$), 4.51(d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, $H_{1\beta(1-4)}^{\text{II}}$), 4.09 – 3.21 (m, 12H, $H_2^{\text{I,II}}$, $H_3^{\text{I,II}}$, $H_4^{\text{I,II}}$, H_5^{II} , $H_{6\text{ab}}^{\text{I,II}}$), 2.15 – 1.87 (2s, 3H, COCH_3).

¹³C RMN (298K, 101 MHz, MeOD) : δ (ppm) 174.34, 173.78 (NCO), 134.98, 132.83, 129.87, 128.45, 128.37 (5x CH arom.), 103.11 ($C_{1\beta(1-4)}^{\text{I}}$), 89.54 ($C_{1\beta(1-3)}^{\text{I}}$), 89.01 ($C_{1\beta(1-3)}^{\text{II}}$), 87.82 ($C_{3\beta(1-3)}^{\text{I}}$), 81.72 ($C_{1\beta(1-4)}^{\text{II}}$), 80.90 ($C_{4\beta(1-4)}^{\text{I}}$), 80.34, 78.14, 78.02, 75.97, 73.41,

71.98 (C_3^I $\beta(1-4)$, C_3^{II} , C_4^I $\beta(1-4)$, $C_5^{I,II}$, C_2^I), 69.85 (C_4^{II}), 62.82, 62.58, 61.82 (C_6^I $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$, C_6^{II}), 57.76, 57.38 (C_2^{II} $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$), 23.01(-COCH₃).

MS ESI⁺ : m/z = 475.9 [M+H]⁺ ; m/z = 497.9 [M+Na]⁺ ; m/z = 513.9 [M+K]⁺

2-Acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside de *p*-nitrophényle (**25**)



Le chitobiose (90mg ; 0,21mmol) et le β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside de *p*-nitrophényle (206mg ; 0,45mmol ; 2,1éq.) sont mis en solution dans un mélange de solution tampon acétate pH4,5 à 0,05M et de dioxane (5mL) (50% v/v). La solution est mise sous agitation à 37°C pendant 20 minutes puis le lysozyme HEW (60mg) est ajouté au mélange et le mélange réactionnel est agité pendant 7 jours. Après dénaturation thermique de l'enzyme (15 minutes à 100°C), le précipité formé est éliminé par centrifugation, puis le surnageant est concentré et lyophilisé. Après purification par chromatographie sur C18 (SepPack) (eau puis gradient de méthanol dans l'eau 0 \rightarrow 50% v/v) suivie d'une purification par chromatographie sur gel de silice (acétonitrile/eau (8/2)), le trisaccharide **25** est obtenu avec 9% de rendement (13mg).

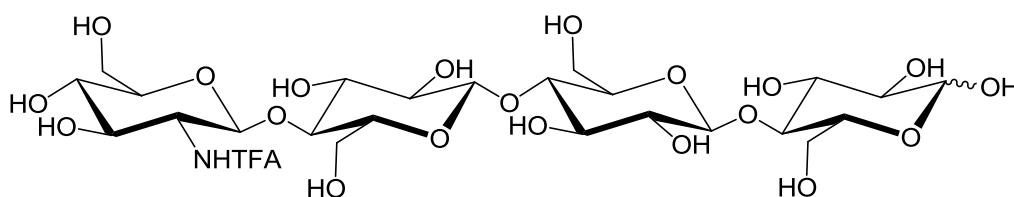
¹H RMN (298K, 400 MHz, D₂O) : δ (ppm) 8.28 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz, arom.), 7.26 (d, 2H, $J = 9.2$ Hz, arom.), 5.30 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, H_1^I), 4.58 (d, 2H, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, $H_1^{II,III}$), 4.06 – 3.43 (m, 18H, $H_{3,4,5,6}^{I,II,III}$, H_2^I), 3.38 (dd, 1H, $J_{2,3} = 8.6$ Hz, H_2^{III}), 2.08 (s, 3H, -COCH₃).

¹³C RMN (298K, 101 MHz, D₂O) : δ (ppm) 174.96 (-COCH₃), 162.04 (C), 142.98 (Cq. arom), 126.50, 122.78, 116.89, 112.20 (CH arom.), 102.65, 101.83 ($C_1^{II,III}$), 99.69 (C_1^I), 79.48, 78.33 ($C_4^{I,II}$), 76.26, 75.48, 74.95, 74.54, 74.31, 73.82, 73.15, 72.90 ($C_{3,5}^{I,II,III}$, $C_2^{I,II}$), 70.11(C_4^{III}), 60.93, 60.41, 60.08 ($C_6^{I,II,III}$), 55.98 (C_2^{III}), 22.54 (-COCH₃).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour C₂₆H₃₈NO₁₈Na = 689.2017 ; m/z obtenue = 689.2003 [M+Na]⁺

2-Désoxy-2-trifluoroacétamido-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-α,β-D-glucopyranose (26)



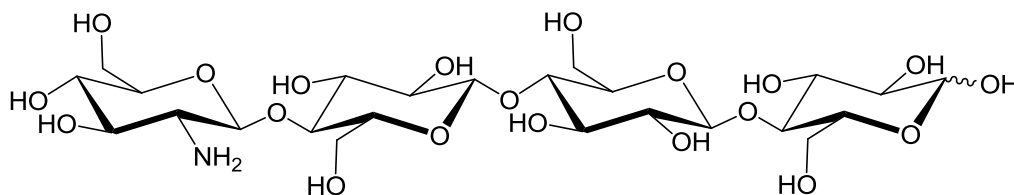
Le tétrasaccharide **23** (50mg ; 0,07mmol) est mis en solution dans un mélange d'anhydride trifluoroacétique et d'acide trifluoroacétique (50:1) (5mL), puis le mélange est chauffé à 100°C sous argon dans un tube scellé pendant 55 heures. Après disparition totale du tétrasaccharide de départ, le milieu réactionnel est dilué avec du toluène puis concentré (5 co-évaporations). Le résidu est alors repris dans le méthanol et concentré deux fois, puis mis en solution dans l'eau et lyophilisé.

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée pour C₂₆H₄₂NO₂₁NaF₃ = 784.2099 ; m/z obtenue = 784.2137 [M+Na]⁺

[α]_D²⁶ 21.5 (C 0.48 H₂O)

2-Amino-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-α,β-D-glucopyranose (27)



Le tétrasaccharide **26** (50mg ; 0,066mmol) est mis en solution dans un mélange d'ammoniaque et d'eau (10mL) (50/50 v/v) puis la solution est agitée à température ambiante pendant 12 heures. Le mélange est ensuite concentré, puis mis en solution dans l'eau et filtré sur résine échangeuse de cation (DOWEX 50). La fraction contenant l'oligosaccharide est alors concentrée, reprise dans l'eau et lyophilisée. Le tétrasaccharide est isolé avec 90% de rendement (40mg).

^1H RMN (298K, 400 MHz, D_2O) : δ (ppm) 5.23 (d, 0.4H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, $\text{H}_1^{\text{I}\alpha}$), 4.86 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H_1^{IV}), 4.67 (d, 0.6H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, $\text{H}_1^{\text{I}\beta}$), 4.54 (2d, 2H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, $\text{H}_1^{\text{II,III}}$), 4.05 – 3.46 (m, 22H, $\text{H}_{3,4,5,6\text{ab}}^{\text{I,II,III,IV}}$), 3.43 – 3.33 (m, 2H, $\text{H}_2^{\text{II,III}}$), 3.30 (dd, 1H, $J = 8.9$ Hz, H_2^{I}), 3.14 (dd, 1H, $J_{\text{NH},2} = 10.6$; $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H_2^{IV}).

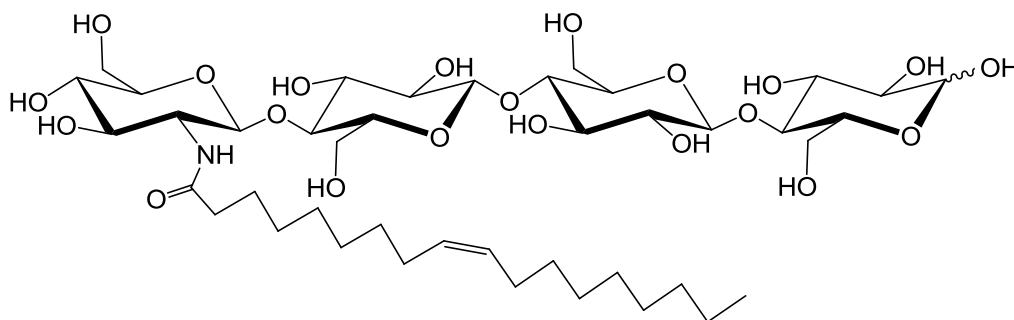
^{13}C RMN (298K, 101 MHz, D_2O) : δ (ppm) 102.32 ($\text{C}_1^{\text{II,III}}$), 97.55 (C_1^{IV}), 95.73 ($\text{C}_{1\beta}^{\text{I}}$), 91.79 ($\text{C}_{1\alpha}^{\text{I}}$), 78.58, 78.42, 78.17, 76.32, 76.22, 74.77, 74.21, 73.95, 73.45, 73.05, 72.93, 71.93, 71.20, 70.09, 69.50 ($\text{C}_{3,4,5}^{\text{I-IV}}$, $\text{C}_2^{\text{I-III}}$) 60.24, 59.97, 59.78, 59.30 ($\text{C}_6^{\text{I-IV}}$), 55.78 (C_2^{IV}).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{NO}_{20}\text{Na} = 666.2457$; m/z obtenue = 666.2467 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

III.5. Synthèse de l'analogue de LCO : acylation

2-(9Z-Octadéca-9-énamido)-2-désoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-α.β-D-glucopyranose (28)



Méthode A :

La *N,N*-diisopropyléthylamine (15μL ; 0,085mmol ; 7éq.) est ajoutée à une solution de 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (5,8mg ; 0,043mmol ; 3,5éq.) et d'hexafluorophosphate de *N,N,N',N'*-bis(tétraméthylène)-chloroformamidium (BTCHP) (9.4mg ; 0,028mmol ; 2,3éq.) dans le DMF (100μL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 minutes, puis l'acide oléique (8,9μL ; 0,028mmol) dissous dans du DMF (60μL) est ajouté. La solution est agitée pendant 45 minutes avant d'être versée dans une solution de tétrasaccharide **27** (8mg ; 0,012mmol) en solution dans le DMF (500μL). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 8 heures, le milieu est concentré. Le résidu est alors repris dans l'acétate d'éthyle et un précipité se forme. Le solide est lavé plusieurs fois à l'acétate d'éthyle puis repris dans l'eau et lyophilisé. Le solide blanc résultant est purifié par SepPack C18 (eau puis gradient de méthanol dans l'eau 0→50% v/v), et l'analogue **28** est obtenu avec 9% de rendement (1mg). Le produit de départ est récupéré à hauteur de 69%.

Méthode B :

Le tétrasaccharide **27** (16mg ; 0,024mmol) et l'acide oléique (23μL ; 0,072mmol ; 3éq.) sont mis en solution dans le DMF (900μL) et agitée à température ambiante. Le DMTMM-BF₄ (23mg ; 0,072mmol ; 3éq.) et la *N*-méthylmorpholine (6μL ; 7,2μmol ; 0,6éq.) sont mis en solution dans un mélange à 50 % en volume de DMF et d'eau (400μL), puis la solution est ajoutée au mélange contenant l'acide et l'amine. Le

mélange réactionnel est alors agité pendant 24h à température ambiante, puis concentrée. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et un précipité blanc se forme. Le solide est lavé plusieurs fois à l'acétate d'éthyle, puis repris dans l'eau et lyophilisé. Après purification sur SepPack C18 (eau puis gradient de méthanol dans l'eau 0→50% v/v), le composé **28** est isolé avec 36% de rendement (8mg).

^1H NMR (298K, 400 MHz, D_2O) δ (ppm) 5.27 (d, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.17 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, $\text{H}_{1\alpha}$), 4.61 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, $\text{H}_{1\beta}$, $\text{H}_{1\text{IV}}$), 4.49 – 4.33 (m, 2H, $\text{H}_{1\text{II,III}}$), 4.13 – 3.12 (m, 30H, sucre), 2.29 – 2.14 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}$), 2.02 – 1.88 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 1.51 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$), 1.22 (s, 21H, $-\text{CH}_2$), 0.83 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

HRMS TOF-ESI⁺ :

m/z calculée $\text{C}_{42}\text{H}_{75}\text{NO}_{21}\text{Na} = 952.4729$; m/z obtenue = 952.4766 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Références

- [1] A. Payen, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **1838**, 7, 1052.
- [2] S. S. C. Chu, G. A. Jeffrey, *Acta Crystallographica Section B*, **1968**, 24, 830-838.
- [3] A. Viswanathan, S. G. Shenouda, *Journal of Applied Polymer Science*, **1971**, 15, 519-535.
- [4] C. Ververis, K. Georghiou, N. Christodoulakis, P. Santas, R. Santas, *Industrial Crops and Products*, **2004**, 19, 245-254.
- [5] Y. Nishiyama, J. Sugiyama, H. Chanzy, P. Langan, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, 14300-14306.
- [6] S. Park, J. Baker, M. Himmel, P. Parilla, D. Johnson, *Biotechnology for Biofuels*, **2010**, 3, 10.
- [7] W. T. Astbury, T. C. Marwick, J. D. Bernal, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, **1932**, 109, 443-450.
- [8] R. H. Atalla, D. L. Vanderhart, *Science*, **1984**, 223, 283-285.
- [9] R. H. Atalla, D. L. VanderHart, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **1999**, 15, 1-19.
- [10] K. H. Gardner, J. Blackwell, *Biopolymers*, **1974**, 13, 1975-2001.
- [11] A. Sarko, R. Muggli, *Macromolecules*, **1974**, 7, 486-494.
- [12] L. M. J. Kroon-Batenburg, B. Bouma, J. Kroon, *Macromolecules*, **1996**, 29, 5695-5699.
- [13] S. V. Heines, *Journal of Chemical Education*, **1944**, 21, 430.
- [14] L. C. Fidale, N. Ruiz, T. Heinze, O. A. E. Seoud, *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2008**, 209, 1240-1254.
- [15] L. Y. Yatsu, T. A. Calamari, R. R. Benerito, *Textile Research Journal*, **1986**, 56, 419-424.
- [16] M. Wada, H. Chanzy, Y. Nishiyama, P. Langan, *Macromolecules*, **2004**, 37, 8548-8555.
- [17] Y.-H. P. Zhang, L. R. Lynd, *Biotechnology and Bioengineering*, **2004**, 88, 797-824.
- [18] G. Schmid, M. Biselli, C. Wandrey, *Analytical Biochemistry*, **1988**, 175, 573-583.
- [19] A. N. Pereira, M. Mobedshahi, M. R. Ladisch, S. T. K. Willis A. Wood, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 160*, Academic Press, **1988**, pp. 26-38.
- [20] P. C. Scherer, *Journal of the American Chemical Society*, **1931**, 53, 4009-4013.
- [21] C. F. Cross, E. J. Bevan, *Journal of the Chemical Society, Transactions*, **1904**, 85, 691-693.
- [22] A. T. Serkov, *Fibre Chemistry*, **1981**, 12, 274-281.
- [23] A. Huebner, M. R. Ladisch, G. T. Tsao, *Biotechnology and Bioengineering*, **1978**, 20, 1669-1677.
- [24] K. Gessler, N. Krauss, T. Steiner, C. Betzel, A. Sarko, W. Saenger, *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 11397-11406.
- [25] R. C. Kuhad, R. Gupta, A. Singh, *Enzyme Research*, **2011**, 10.
- [26] M. Schülein, M. S. Kauppinen, L. Lange, S. F. Lassen, L. N. Andersen, S. Klysner, J. B. Nielsen, in *Enzyme Applications in Fiber Processing, Vol. 687*, American Chemical Society, **1998**, pp. 66-74.
- [27] M. R. Bedford, G. G. Partridge, *Enzymes in farm animal nutrition*, 2nd ed., CAB International, **2000**.
- [28] M. K. Bhat, *Biotechnology Advances*, **2000**, 18, 355-383.
- [29] T.-A. Hsu, C.-S. Gong, G. T. Tsao, *Biotechnology and Bioengineering*, **1980**, 22, 2305-2320.

- [30] M. K. Bhat, A. J. Hay, M. Claeysens, T. M. Wood, *Biochemical Journal*, **1990**, 266, 371-378.
- [31] C. Schou, G. Rasmussen, M.-B. Kalltoft, B. Henrissat, M. SchÜlein, *European Journal of Biochemistry*, **1993**, 217, 947-953.
- [32] M. Dashtban, M. Maki, K. T. Leung, C. Mao, W. Qin, *Critical Reviews in Biotechnology*, **2010**, 30, 302-309.
- [33] S. Armand, S. Drouillard, M. Schülein, B. Henrissat, H. Driguez, *Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272, 2709-2713.
- [34] V. Boyer, S. Fort, T. P. Frandsen, M. Schülein, S. Cottaz, H. Driguez, *Chemistry – A European Journal*, **2002**, 8, 1389-1394.
- [35] R. A. Dixon, *Nature*, **2001**, 411, 843.
- [36] E. Kombrink, I. E. Somssich, J.A. Callow, J. H. Andrews, I. C. Tommerup, in *Advances in Botanical Research, Vol. Volume 21*, Academic Press, **1995**, pp. 1-34.
- [37] T. Boller, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **1995**, 46, 189-214.
- [38] R. A. Dixon, M. J. Harrison, C. J. Lamb, *Annual Review of Phytopathology*, **1994**, 32, 479-501.
- [39] A. Aziz, A. Gauthier, A. Bézier, B. Poinssot, J.-M. Joubert, A. Pugin, A. Heyraud, F. Baillieul, *Journal of Experimental Botany*, **2007**, 58, 1463-1472.
- [40] O. Klarzynski, B. Plesse, J.-M. Joubert, J.-C. Yvin, M. Kopp, B. Kloareg, B. Fritig, *Plant Physiology*, **2000**, 124, 1027-1038.
- [41] A. Schlumbaum, F. Mauch, U. Vogeli, T. Boller, *Nature*, **1986**, 324, 365-367.
- [42] G. Stacey, N. Shibuya, *Plant and Soil*, **1997**, 194, 161-169.
- [43] A. Aziz, A. Heyraud, B. Lambert, *Planta*, **2004**, 218, 767-774.
- [44] A. Margeot, B. r. Hahn-Hagerdal, M. Edlund, R. Slade, F. d. r. Monot, *Current Opinion in Biotechnology*, **2009**, 20, 372-380.
- [45] J. M. Galazka, C. Tian, W. T. Beeson, B. Martinez, N. L. Glass, J. H. D. Cate, *Science*, **2010**, 330, 84-86.
- [46] E. A. Znameroski, S. T. Coradetti, C. M. Roche, J. C. Tsai, A. T. Iavarone, J. H. D. Cate, N. L. Glass, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012**, 109, 6012-6017.
- [47] K. Olofsson, M. Bertilsson, G. Liden, *Biotechnology for Biofuels*, **2008**, 1, 7.
- [48] H. J. Flint, E. A. Bayer, M. T. Rincon, R. Lamed, B. A. White, *Nat Rev Micro*, **2008**, 6, 121-131.
- [49] E. N. Bergman, *Physiological Reviews*, **1990**, 70, 567-590.
- [50] R. Gokarn, M. Eiteman, S. Martin, K. Eriksson, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1997**, 68, 69-80.
- [51] J. H. Cummings, G. T. Macfarlane, *Clinical Nutrition*, **1997**, 16, 3-11.
- [52] K. Swennen, C. M. Courtin, J. A. Delcour, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2006**, 46, 459-471.
- [53] J. B. Russell, *Applied and Environmental Microbiology*, **1985**, 49, 572-576.
- [54] K. Pokusaeva, M. O'Connell-Motherway, A. Zomer, J. MacSharry, G. F. Fitzgerald, D. van Sinderen, *Applied and Environmental Microbiology*, **2010**, 77, 1681-1690.
- [55] M. Otsuka, A. Ishida, Y. Nakayama, M. Saito, M. Yamazaki, H. Murakami, Y. Nakamura, M. Matsumoto, K. Mamoto, R. Takada, *Animal Science Journal*, **2004**, 75, 225-229.
- [56] T. Hasunuma, K. Kawashima, H. Nakayama, T. Murakami, H. Kanagawa, T. Ishii, K. Akiyama, K. Yasuda, F. Terada, S. Kushibiki, *Animal Science Journal*, **2011**, 82, 543-548.
- [57] S. Nakamura, T. Oku, M. Ichinose, *Nutrition*, **2004**, 20, 979-983.
- [58] M. Satouchi, T. Watanabe, S. Wakabayashi, K. Ohokuma, T. Koshijima, M. Kuwahara, *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, **1996**, 49, 143-148.

- [59] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Bohn, *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, *44*, 3358-3393.
- [60] G. L. Miller, J. Dean, R. Blum, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1960**, *91*, 21-26.
- [61] T. Liebert, M. Seifert, T. Heinze, *Macromolecular Symposia*, **2008**, *262*, 140-149.
- [62] M. Voloch, M. R. Ladisch, M. Cantarella, G. T. Tsao, *Biotechnology and Bioengineering*, **1984**, *26*, 557-559.
- [63] F. Camacho, P. González-Tello, E. Jurado, A. Robles, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **1996**, *67*, 350-356.
- [64] Y.-H. P. Zhang, L. R. Lynd, *Analytical Biochemistry*, **2003**, *322*, 225-232.
- [65] S. Larsson, E. Palmqvist, B. Hahn-Hagerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, N. O. Nilvebrant, *Enzyme and Microbial Technology*, **1999**, *24*, 151-159.
- [66] E. E. Dickey, M. L. Wolfrom, *Journal of the American Chemical Society*, **1949**, *71*, 825-828.
- [67] D. Yamaguchi, M. Kitano, S. Suganuma, K. Nakajima, H. Kato, M. Hara, *The Journal of Physical Chemistry C*, **2009**, *113*, 3181-3188.
- [68] F. Guo, Z. Fang, C. C. Xu, R. L. Smith Jr, *Progress in Energy and Combustion Science*, **2012**.
- [69] A. Onda, T. Ochi, K. Yanagisawa, *Green Chemistry*, **2008**, *10*, 1033-1037.
- [70] A. A. Kiss, A. C. Dimian, G. Rothenberg, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2006**, *348*, 75-81.
- [71] M. Zabeti, W. M. A. Wan Daud, M. K. Aroua, *Fuel Processing Technology*, **2009**, *90*, 770-777.
- [72] Y. Li, R. Ruan, P. L. Chen, Z. Liu, X. Pan, X. Lin, Y. Liu, C. K. Mok, T. Yang, *Transaction of the ASAE*, **2004**, *47*, 821-825.
- [73] M. Balat, H. Balat, C. A, *Progress in Energy and Combustion Science*, **2008**, *34*, 551-573.
- [74] C. Krishnan, L. d. C. Sousa, M. Jin, L. Chang, B. E. Dale, V. Balan, *Biotechnology and Bioengineering*, **2010**, *107*, 441-450.
- [75] J. M. Lee, H. Jameel, R. A. Venditti, *Bioresource Technology*, **2010**, *101*, 5449-5458.
- [76] C. Divne, J. Ståhlberg, T. T. Teeri, T. A. Jones, *Journal of Molecular Biology*, **1998**, *275*, 309-325.
- [77] B. Henrissat, H. Driguez, C. Viet, M. Schulein, *Nature Biotechnology*, **1985**, *3*, 722-726.
- [78] A. V. Gusakov, *Trends in Biotechnology*, **2011**, *29*, 419-425.
- [79] G. Davies, B. Henrissat, *Structure*, **1995**, *3*, 853-859.
- [80] D. C. Irwin, M. Spezio, L. P. Walker, D. B. Wilson, *Biotechnology and Bioengineering*, **1993**, *42*, 1002-1013.
- [81] D. Ciolacu, S. Gorgieva, D. Tampu, V. Kokol, *Cellulose*, **2011**, *18*, 1527-1541.
- [82] Y. Sun, J. Cheng, *Bioresource Technology*, **2002**, *83*, 1-11.
- [83] L. T. Fan, Y.-H. Lee, D. H. Beardmore, *Biotechnology and Bioengineering*, **1980**, *22*, 177-199.
- [84] L. Cadoche, G. D. Lopez, *Biological Wastes*, **1989**, *30*, 153-157.
- [85] P. Kumar, D. M. Barrett, M. J. Delwiche, P. Stroeve, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2009**, *48*, 3713-3729.
- [86] W. R. Grous, A. O. Converse, H. E. Grethlein, *Enzyme and Microbial Technology*, **1986**, *8*, 274-280.
- [87] J. Weil, A. Sarikaya, S.-L. Rau, J. Goetz, C. Ladisch, M. Brewer, R. Hendrickson, M. Ladisch, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1997**, *68*, 21-40.
- [88] Y. Zheng, H. M. Lin, G. T. Tsao, *Biotechnology Progress*, **1998**, *14*, 890-896.
- [89] M. Taherzadeh, K. Karimi, *International Journal of Molecular Sciences*, **2008**, *9*, 1621-1651.
- [90] B. E. Dale, M. J. Moreira, *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **1982**, *12*, : 31-43.

- [91] C. Park, Y. Ryu, C. Kim, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **2001**, 18, 475-478.
- [92] Y. Zheng, G. T. Tsao, *Biotechnology Letters*, **1996**, 18, 451-454.
- [93] G. Muratov, C. Kim, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **2002**, 7, 85-88.
- [94] P. Walden, *Bulletin of the Imperial Academy of Sciences of St Petersburg*, **1914**, 405-422.
- [95] J. G. Huddleston, A. E. Visser, W. M. Reichert, H. D. Willauer, G. A. Broker, R. D. Rogers, *Green Chem.*, **2001**, 3, 156.
- [96] D. D. Patel, J.-M. Lee, *The Chemical Record*, **2012**, 12, 329-355.
- [97] K. E. Gutowski, G. A. Broker, H. D. Willauer, J. G. Huddleston, R. P. Swatloski, J. D. Holbrey, R. D. Rogers, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125, 6632-6633.
- [98] N. V. Plechkova, K. R. Seddon, *Chemical Society Reviews*, **2008**, 37, 123-150.
- [99] R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey, R. D. Rogers, *Journal of the American Chemical Society*, **2002**, 124, 4974-4975.
- [100] H. Wang, G. Gurau, R. D. Rogers, *Chemical Society Reviews*, **2012**, 41, 1519-1537.
- [101] H. T. Tan, K. T. Lee, *Chemical Engineering Journal*, **2012**, 183, 448-458.
- [102] J. Vitz, T. Erdmenger, C. Haensch, U. S. Schubert, *Green Chemistry*, **2009**, 11, 417-424.
- [103] R. C. Remsing, R. P. Swatloski, R. D. Rogers, G. Moyna, *Chemical Communications*, **2006**, 1271-1273.
- [104] J. Wu, J. Zhang, H. Zhang, J. He, Q. Ren, M. Guo, *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 266-268.
- [105] S. Barthel, T. Heinze, *Green Chemistry*, **2006**, 8, 301-306.
- [106] H. Zhao, C. L. Jones, G. A. Baker, S. Xia, O. Olubajo, V. N. Person, *Journal of Biotechnology*, **2009**, 139, 47-54.
- [107] A. P. Dadi, S. Varanasi, C. A. Schall, *Biotechnology and Bioengineering*, **2006**, 95, 904-910.
- [108] C. Li, Z. K. Zhao, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2007**, 349, 1847-1850.
- [109] R. Rinaldi, R. Palkovits, F. Schüth, *Angewandte Chemie International Edition*, **2008**, 47, 8047-8050.
- [110] F. Tao, H. Song, L. Chou, *ChemSusChem*, **2010**, 3, 1298-1303.
- [111] O. Kanie, Y. Ito, T. Ogawa, *Journal of the American Chemical Society*, **1994**, 116, 12073-12074.
- [112] P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2005**, 4, 1474-1776.
- [113] B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, *Nucleic Acids Research*, **2009**, 37, D233-D238.
- [114] E. Samain, C. Lancelon-Pin, F. Férigo, V. Moreau, H. Chanzy, A. Heyraud, H. Driguez, *Carbohydrate Research*, **1995**, 271, 217-226.
- [115] J. Seibel, H.-J. Jördening, K. Buchholz, *Biocatalysis and Biotransformation*, **2006**, 24, 311-342.
- [116] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, *Annual Review of Biochemistry*, **2008**, 77, 521-555.
- [117] L. L. Lairson, S. G. Withers, *Chemical Communications*, **2004**, 2243-2248.
- [118] L. C. Pedersen, J. Dong, F. Taniguchi, H. Kitagawa, J. M. Krahn, L. G. Pedersen, K. Sugahara, M. Negishi, *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 14420-14428.
- [119] K. Persson, H. D. Ly, M. Dieckelmann, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, N. C. J. Strynadka, *Nat Struct Mol Biol*, **2001**, 8, 166-175.
- [120] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Chemical Reviews*, **2000**, 100, 4465-4494.
- [121] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *Journal of the American Chemical Society*, **1990**, 112, 9308-9309.
- [122] M. Ichikawa, R. L. Schnaar, Y. Ichikawa, *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 8731-8732.
- [123] D. E. Koshland, *Biological Reviews*, **1953**, 28, 416-436.

- [124] J. D. McCarter, G. Stephen Withers, *Current Opinion in Structural Biology*, **1994**, 4, 885-892.
- [125] L.-X. Wang, W. Huang, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**, 13, 592-600.
- [126] J.-Q. Fan, M. S. Quesenberry, K. Takegawa, S. Iwahara, A. Kondo, I. Kato, Y. C. Lee, *Journal of Biological Chemistry*, **1995**, 270, 17730-17735.
- [127] S. Kobayashi, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2005**, 43, 693-710.
- [128] S. Kobayashi, K. Kashiwa, T. Kawasaki, S. Shoda, *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, 113, 3079-3084.
- [129] L. F. Mackenzie, Q. Wang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Journal of the American Chemical Society*, **1998**, 120, 5583-5584.
- [130] C. Mayer, D. L. Jakeman, M. Mah, G. Karjala, L. Gal, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Chemistry & Biology*, **2001**, 8, 437-443.
- [131] C. Mayer, D. L. Zechel, S. P. Reid, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *FEBS letters*, **2000**, 466, 40-44.
- [132] M. Moracci, A. Trincone, M. Rossi, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 155-163.
- [133] Q. Wang, R. W. Graham, D. Trimbur, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Journal of the American Chemical Society*, **1994**, 116, 11594-11595.
- [134] S. Fort, L. Christiansen, M. Schülein, S. Cottaz, H. Driguez, *Israel Journal of Chemistry*, **2000**, 40, 217-221.
- [135] O. Nashiru, D. L. Zechel, D. Stoll, T. Mohammadzadeh, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Angewandte Chemie International Edition*, **2001**, 40, 417-420.
- [136] M. B. Turner, S. K. Spear, J. G. Huddleston, J. D. Holbrey, R. D. Rogers, *Green Chemistry*, **2003**, 5, 443-447.
- [137] A. Dadi, C. Schall, S. Varanasi, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2007**, 137-140, 407-421.
- [138] Z. Zhang, W. Wang, X. Liu, Q. Wang, W. Li, H. Xie, Z. K. Zhao, *Bioresource Technology*, **2012**, 112, 151-155.
- [139] T. Welton, *Chemical Reviews*, **1999**, 99, 2071-2084.
- [140] M. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Analytical Chemistry*, **1956**, 28, 350-356.
- [141] S. Kongruang, M. J. Han, C. I. Breton, Gil, M. H. Penner, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2004**, 113, 213-231.
- [142] Y. H. P. Zhang, L. R. Lynd, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 1510-1515.
- [143] S. Waffenschmidt, L. Jaenicke, *Analytical Biochemistry*, **1987**, 165, 337-340.
- [144] H. Pala, M. Mota, F. M. Gama, *Carbohydrate Polymers*, **2007**, 68, 101-108.
- [145] K. Gessler, N. Krauss, T. Steiner, C. Betzel, A. Sarko, W. Saenger, *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 11397-11406.
- [146] W. J. Alexander, R. L. Mitchell, *Analytical Chemistry*, **1949**, 21, 1497-1500.
- [147] B. J. Watson, B. Hammouda, R. M. Briber, S. W. Hutcheson, *Journal of Applied Polymer Science*, **2012**, 1-8.
- [148] W. Aehle, *Enzymes in Industry: Production and Applications*, 3rd ed., Wiley-CH, **2007**.
- [149] J. Karlsson, M. Siika-aho, M. Tenkanen, F. Tjerneld, *Journal of Biotechnology*, **2002**, 99, 63-78.
- [150] M. Gruno, P. Våljamäe, G. Pettersson, G. Johansson, *Biotechnology and Bioengineering*, **2004**, 86, 503-511.

- [151] P. Ilankovan, S. Hein, C.-H. Ng, T. S. Trung, W. F. Stevens, *Carbohydrate Polymers*, **2006**, *63*, 245-250.
- [152] J. Puls, C. Altaner, B. Saake, *Macromolecular Symposia*, **2004**, *208*, 239-254.
- [153] K. Sakai, T. Yamauchi, F. Nakasu, T. Ohe, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1996**, *60*, 1617-1622.
- [154] J. Puls, S. Wilson, D. Höltzer, *Journal of Polymers and the Environment*, **2011**, *19*, 152-165.
- [155] T. Heinze, T. Liebert, *Macromolecular Symposia*, **2004**, *208*, 167-238.
- [156] S.-J. Lee, C. Altaner, J. Puls, B. Saake, *Carbohydrate Polymers*, **2003**, *54*, 353-362.
- [157] P. Zugenmaier, *Macromolecular Symposia*, **2004**, *208*, 81-166.
- [158] M. G. Wirick, *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, **1968**, *6*, 1965-1974.
- [159] W. G. Glasser, B. K. McCartney, G. Samaranyake, *Biotechnology Progress*, **1994**, *10*, 214-219.
- [160] B. Saake, S. Horner, J. Puls, in *Cellulose Derivatives, Vol. 688*, American Chemical Society, **1998**, pp. 201-216.
- [161] T. Miyamoto, Y. Sato, T. Shibata, M. Tanahashi, H. Inagaki, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, **1985**, *23*, 1373-1381.
- [162] K. J. Edgar, C. M. Buchanan, in *US Patent 5597912*, **1997**.
- [163] V. W. Goodlett, J. T. Dougherty, H. W. Patton, *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, **1971**, *9*, 155-161.
- [164] K. Kamide, K. Okajima, *Polymer Journal*, **1981**, *13*, 127-133.
- [165] J.-Q. Lai, Z. Li, Y.-H. Lu, Z. Yang, *Green Chemistry*, **2011**, *13*, 1860-1868.
- [166] K. D. Weaver, H. J. Kim, J. Sun, D. R. MacFarlane, G. D. Elliott, *Green Chemistry*, **2010**, *12*, 507-513.
- [167] S. Fort, A. Varrot, M. Schülein, S. Cottaz, H. Driguez, G. J. Davies, *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 319-325.
- [168] V. Moreau, J.-L. Viladot, E. Samain, A. Planas, H. Driguez, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1996**, *4*, 1849-1855.
- [169] K. G. Raghothama, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **1999**, *50*, 665-693.
- [170] D. J. Schachtman, R. J. Reid, S. M. Ayling, *Plant Physiology*, **1998**, *116*, 447-453.
- [171] P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillat, G. Truchet, J. C. Prome, J. Denarie, *Nature*, **1990**, *344*, 781-784.
- [172] F. Maillat, V. Poinot, O. Andre, V. Puech-Pages, A. Haouy, M. Gueunier, L. Cromer, D. Giraudet, D. Formey, A. Niebel, E. A. Martinez, H. Driguez, G. Becard, J. Denarie, *Nature*, **2011**, *469*, 58-63.
- [173] B. Bago, P. E. Pfeffer, Y. Shachar-Hill, *Plant Physiology*, **2000**, *124*, 949-958.
- [174] J. I. Sprent, *New Phytologist*, **2007**, *174*, 11-25.
- [175] M. Parniske, *Nature Reviews Microbiology*, **2008**, *6*, 763-775.
- [176] J. A. Downie, *FEMS Microbiology Reviews*, **2009**, *34*, 150-170.
- [177] X. Perret, C. Staehelin, W. J. Broughton, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2000**, *64*, 180-201.
- [178] J. V. Cullimore, R. Ranjeva, J.-J. Bono, *Trends in plant science*, **2001**, *6*, 24-30.
- [179] W. D'Haese, M. Holsters, *Glycobiology*, **2002**, *12*, 79R-105R.
- [180] C. Masson-Boivin, E. Giraud, X. Perret, J. Batut, *Trends in microbiology*, **2009**, *17*, 458-466.
- [181] D. W. Ehrhardt, E. M. Atkinson, K. F. Faull, D. I. Freedberg, D. P. Sutherlin, R. Armstrong, S. R. Long, *Journal of Bacteriology*, **1995**, *177*, 6237-6245.
- [182] G. E. D. Oldroyd, J. A. Downie, *Annual Review of Plant Biology*, **2008**, *59*, 519-546.

- [183] J. A. Downie, *Science*, **2007**, 316, 1296-1297.
- [184] G. E. D. Oldroyd, J. D. Murray, P. S. Poole, J. A. Downie, *Annual Review of Genetics*, **2011**, 45, 119-144.
- [185] M. Chabaud, A. Genre, B. J. Sieberer, A. Faccio, J. Fournier, M. Novero, D. G. Barker, P. Bonfante, *New Phytologist*, **2011**, 189, 347-355.
- [186] C. Gough, J. Cullimore, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **2011**, 24, 867-878.
- [187] H. H. Felle, É. Kondorosi, Á. Kondorosi, M. Schultze, *The Plant Journal*, **1995**, 7, 939-947.
- [188] B. B. Aam, E. B. Heggset, A. L. Norberg, M. Sørli, K. M. Vårum, V. G. H. Eijsink, *Marine Drugs*, **2010**, 8, 1482-1517.
- [189] C. Bosso, J. Defaye, A. Domard, A. Gabelle, C. Pedersen, *Carbohydrate Research*, **1986**, 156, 57-68.
- [190] J. A. Rupley, *Biochimica et Biophysica Acta - Specialized Section on Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, **1964**, 83, 245-255.
- [191] K. C. Nicolaou, N. J. Bockovich, D. R. Carcanague, C. W. Hummel, L. F. Even, *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, 114, 8701-8702.
- [192] L.-X. Wang, C. Li, Q.-W. Wang, Y.-Z. Hui, *Tetrahedron Letters*, **1993**, 34, 7763-7766.
- [193] D. Tailler, J.-C. Jacquinet, J.-M. Beau, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1994**, 1827-1828.
- [194] E. M. Atkinson, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, S. R. Long, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1994**, 91, 8418-8422.
- [195] S. Koizumi, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2003**, 15, 65-74.
- [196] S. Koizumi, T. Endo, K. Tabata, A. Ozaki, *Nat Biotech*, **1998**, 16, 847-850.
- [197] E. Samain, S. Drouillard, A. Heyraud, H. Driguez, R. A. Geremia, *Carbohydrate Research*, **1997**, 302, 35-42.
- [198] E. Samain, V. Chazalet, R. A. Geremia, *Journal of Biotechnology*, **1999**, 72, 33-47.
- [199] M. Ohsten Rasmussen, B. Hogg, J.-J. Bono, E. Samain, H. Driguez, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2004**, 2, 1908-1910.
- [200] N. Grenouillat, B. Vauzeilles, J.-J. Bono, E. Samain, J.-M. Beau, *Angewandte Chemie International Edition*, **2004**, 43, 4644-4646.
- [201] M.-P. Bec-Ferté, H. B. Krishnan, A. Savagnac, S. G. Pueppke, J. C. Promé, *FEBS Letters*, **1996**, 393, 273-279.
- [202] I. Robina, S. Gómez-Bujedo, J. G. Fernández-Bolaños, J. Fuentes, H. P. Spink, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 521-530.
- [203] I. Robina, E. López-Barba, J. Jiménez-Barbero, M. Martín-Pastor, J. Fuentes, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 1207-1224.
- [204] J. J. Esseling, F. G. P. Lhuissier, A. M. C. Emons, *Plant Physiology*, **2003**, 132, 1982-1988.
- [205] N. Shibuya, E. Minami, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **2001**, 59, 223-233.
- [206] J. E. Barnett, W. T. Jarvis, K. A. Munday, *Biochemical Journal*, **1967**, 105, 669-672.
- [207] S. J. Williams, S. G. Withers, *Carbohydrate Research*, **2000**, 327, 27-46.
- [208] R. Fauré, D. Cavalier, K. Keegstra, S. Cottaz, H. Driguez, *European Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 2007, 4313-4319.
- [209] R. Fauré, M. Saura-Valls, H. Brumer, A. Planas, S. Cottaz, H. Driguez, *The Journal of Organic Chemistry*, **2006**, 71, 5151-5161.

- [210] S. Fort, V. Boyer, L. Greffe, G. J. Davies, O. Moroz, L. Christiansen, M. Schülein, S. Cottaz, H. Driguez, *Journal of the American Chemical Society*, **2000**, *122*, 5429-5437.
- [211] G. Just, K. Grozinger, *Synthesis*, **1976**, *1976*, 457-458.
- [212] G. Blatter, J.-M. Beau, J.-C. Jacquinet, *Carbohydrate Research*, **1994**, *260*, 189-202.
- [213] U. Ellervik, G. Magnusson, *Carbohydrate Research*, **1996**, *280*, 251-260.
- [214] M. N. Kamat, C. De Meo, A. V. Demchenko, *The Journal of Organic Chemistry*, **2007**, *72*, 6947-6955.
- [215] A. F. G. Bongat, M. N. Kamat, A. V. Demchenko, *The Journal of Organic Chemistry*, **2007**, *72*, 1480-1483.
- [216] M. N. Kamat, A. V. Demchenko, *Organic Letters*, **2005**, *7*, 3215-3218.
- [217] W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydrate Research*, **1996**, *296*, 135-147.
- [218] A. L. Fink, G. W. Hay, *Canadian Journal of Biochemistry*, **1969**, *47*, 353-359.
- [219] W. Bonner, *The Journal of Organic Chemistry*, **1959**, *24*, 1388-1390.
- [220] T. Horrobin, C. Hao Tran, D. Crout, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1998**, 1069-1080.
- [221] S. J. Angyal, G. J. H. Melrose, *Journal of the Chemical Society*, **1965**, 6501-6504.
- [222] O. Kirk, M. W. r. Christensen, F. Beck, T. Damhus, *Biocatalysis and Biotransformation*, **1995**, *12*, 91-97.
- [223] M. Niemietz, L. Perkams, J. Hoffman, S. Eller, C. Unverzagt, *Chemical Communications*, **2011**, *47*, 10485-10487.
- [224] L. Rosenfeld, C. E. Ballou, *Carbohydrate Research*, **1974**, *32*, 287-298.
- [225] L. D. Hall, J. F. Manville, *Canadian Journal of Chemistry*, **1967**, *45*, 1299-1303.
- [226] K. Bauck, C. Pedersen, *Acta Candida Scandinavica B*, **1975**, *29*, 682-686.
- [227] G. Zemplén, E. Pacsu, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, **1929**, *62*, 1613-1614.
- [228] R. B. Woodward, K. Heusler, J. Gosteli, P. Naegeli, W. Oppolzer, R. Ramage, S. Ranganathan, H. Vorbrüggen, *Journal of the American Chemical Society*, **1966**, *88*, 852-853.
- [229] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, in *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2002**, pp. 17-245.
- [230] V. Moreau, H. Driguez, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1996**, 525-527.
- [231] S. Kobayashi, A. Makino, H. Matsumoto, S. Kunii, M. Ohmae, T. Kiyosada, K. Makiguchi, A. Matsumoto, M. Horie, S.-I. Shoda, *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 1644-1656.
- [232] K. Bock, C. Pedersen, H. Pedersen, in *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Data for Oligosaccharides, Vol. 42*, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, **1984**, pp. 193 - 225.
- [233] J. Dvorakova, D. Schmidt, Z. Hunkova, J. Thiem, V. Kren, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, *11*, 225-232.
- [234] E. Rajnochova, J. Dvorakova, Z. Hun kova, V. Kren, *Biotechnology Letters*, **1997**, *19*, 869-872.
- [235] S. Singh, J. Packwood, C. J. Samuel, P. Critchley, D. H. G. Crout, *Carbohydrate Research*, **1995**, *279*, 293-305.
- [236] T. Yasukochi, C. Inaba, K. Fukase, S. Kusumoto, *Tetrahedron Letters*, **1999**, *40*, 6585-6589.
- [237] B. Masschalck, C. W. Michiels, *Critical Reviews in Microbiology*, **2003**, *29*, 191-214.
- [238] J. A. Rupley, V. Gates, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1967**, *57*, 496-510.
- [239] B. D. Sykes, D. Dolphin, *Nature*, **1971**, *233*, 421-422.

- [240] U. R. I. Zehavi, J. J. Pollock, V. I. Teichberg, N. Sharon, *Nature*, **1968**, 219, 1152-1154.
- [241] K. Akiyama, K. Kawazu, A. Kobayashi, *Carbohydrate Research*, **1995**, 279, 151-160.
- [242] D. M. Chipman, J. J. Pollock, N. Sharon, *Journal of Biological Chemistry*, **1968**, 243, 487-496.
- [243] Y. Matahira, K. Ohno, M. Kawaguchi, H. Kawagishi, T. Usui, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **1995**, 14, 213-225.
- [244] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, in *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2002**, pp. 494-653.
- [245] J. L. Frahn, J. A. Edgar, A. J. Jones, P. A. Cockrum, N. A. Anderton, C. C. J. Culvenor, *Australian Journal of Chemistry*, **1984**, 37, 165-182.
- [246] E. Valeur, M. Bradley, *Chemical Society Reviews*, **2009**, 38, 606-631.
- [247] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10827-10852.
- [248] M. Kunishima, C. Kawachi, K. Hioki, K. Terao, S. Tani, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 1551-1558.
- [249] Z. J. Kaminski, B. Kolesinska, J. Kolesinska, G. Sabatino, M. Chelli, P. Rovero, M. Blaszczyk, M. L. Glowka, A. M. Papini, *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, 127, 16912-16920.
- [250] S. A. Raw, *Tetrahedron Letters*, **2009**, 50, 946-948.
- [251] R. Albert, K. Dax, A. E. Stütz, H. Weidmann, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **1983**, 2, 279-292.

Annexe : Valorisation des compétences des docteurs®

Nathalie Claisse

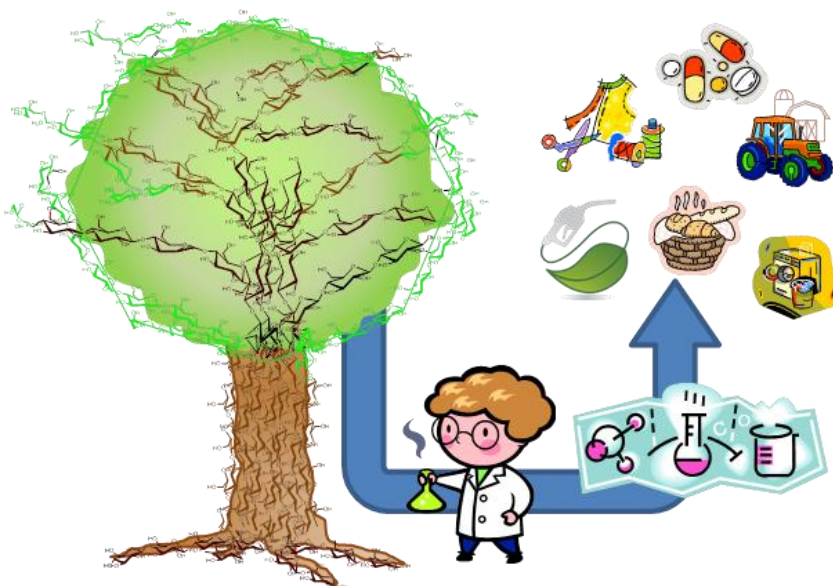
Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant 

Doctorat en Chimie Organique,

Université de Grenoble , CERMAV-CNRS 

Mentor : Jean-Christophe Klein

Valorisation de la biomasse pour la synthèse de biomolécules



Sujet de thèse : Valorisation de la biomasse par procédés verts pour la production d'oligosaccharides et leur fonctionnalisation

Directeur de thèse : Dr. Sébastien Fort

Date de soutenance de thèse prévue en Décembre 2012

Valorisation des compétences des docteurs®- NCT

<u>I. Cadre général et enjeux de ma thèse</u>	5
I.1. Contexte	5
I.2. Mon projet	6
I.3. Situation au regard de la concurrence	8
I.4. Compétences scientifiques, techniques, humaines mobilisées pour le projet	9
I.5. Moi dans le contexte de ma thèse	9
<u>II. Déroulement, gestion et coût estimé de mon projet de thèse</u>	10
II.1. Préparation et cadrage du projet	10
II.2. Choix des partenaires nationaux ou internationaux	11
II.3. Contribution à la mobilisation des financements externes à l'équipe	11
II.4. Gestion des aspects contractuels, confidentialité, propriétés intellectuelles, industrielles et éthiques	11
<u>III. Conduite du projet</u>	12
III.1. Principales étapes	12
III.2. Gestion des relations avec les partenaires	13
III.3. Problèmes rencontrés et solutions envisagées	13
III.4. Estimation et prise en charge du coût du projet	14
III.5. Répartition des charges financières	15
<u>IV. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles</u>	15
IV.1. Mes expertises scientifiques, techniques et personnelles	15
IV.2. Construction des réseaux professionnel et personnel	17
IV.3. Compétences transférables en dehors de mon domaine de recherche	18
<u>V. Résultats et impacts de ma thèse</u>	18
V.1. Pour le labo, l'équipe et les partenaires	18

I. Cadre général et enjeux de ma thèse

I.1. Contexte

Ma thèse s'est déroulée au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) appartenant au CNRS, au sein de l'équipe Chimie et Biotechnologies des Oligosaccharides (CBO). Mon projet a été dirigé par Sébastien Fort, chargé de recherche au CNRS et responsable de l'équipe CBO comprenant 20 personnes. Ils encadrent également deux autres doctorants. Le CERMAV est une Unité Propre de Recherche dépendante de l'Institut de Chimie du CNRS, et qui travaille en étroite relation avec l'Université Joseph Fourier de Grenoble. Le CERMAV accueille 120 personnels et comporte 5 équipes de recherche multidisciplinaires :

- Chimie et Biotechnologies des Oligosaccharides (CBO)
- Physico-Chimie des Glycopolymères (PDG)
- Structure et Propriétés des Glycomatériaux (SPG)
- Structure et Modification des Polysaccharides (SMP)
- Glycobiologie Moléculaire (GM)

Le CERMAV fait partie de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG) et a été labellisé Institut Carnot Polynat. Mon école doctorale de rattachement est l'Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant du Collège Doctoral de l'Université de Grenoble. J'ai bénéficié d'une Bourse de Docteur Ingénieur (BDI) financée par le CNRS et l'entreprise grenobloise ERAS Labo, ainsi que par des fonds propres à l'équipe CBO pour le fonctionnement.

Le thème de mon projet de recherche se situe dans la continuité des travaux de recherche effectués par l'équipe CBO. J'ai travaillé sur la synthèse chimio-enzymatique de biomolécules à base de sucre, qui est un thème phare de l'équipe. Les objectifs scientifiques de ma thèse ont tout d'abord été de développer de nouvelles méthodes sélectives et plus respectueuses de l'environnement pour la production de sucres à partir de la biomasse. Dans un second temps ils ont consisté en la valorisation de ces sucres en produits à haute valeur ajoutée ayant des applications dans des domaines tels que le diagnostic enzymatique ou encore les fertilisants naturels.

I.2. Mon projet

Mon thème de recherche est en adéquation avec les tendances actuelles de développer une chimie plus durable pour l'environnement, que ce soit dans la production de produits ou dans leurs applications. J'ai ainsi participé au développement d'une chimie utilisant de ressources végétales, également définie comme "chimie verte".

L'augmentation constante des populations mondiales engendre des besoins alimentaires et énergétiques croissants qu'il devient de plus en plus difficile de satisfaire. Afin de palier au proche épuisement des ressources fossiles, de nombreuses recherches sont menées pour développer des carburants verts issus de la biomasse, comme le bioéthanol. Afin de ne pas impacter la surface des terres cultivées pour la production de denrées alimentaires, les résidus de paille, de bambou, de canne à sucre sont devenus la matière première pour la production de biocarburants, dits de 2^{ème} génération. Cette "matière verte" est également employée pour la production de matériaux ou de produits chimiques bio-sourcés. Plus récemment, des recherches ont été initiées pour le développement d'une 3^{ème} génération de biocarburants synthétisés à partir des algues. Le composant majoritaire des plantes est la cellulose, constituée de chaîne de molécules de sucre : le glucose, qui une fois fermenté produit l'éthanol. En raison de son abondance sur Terre, la cellulose apparaît donc *a priori* comme la matière première de référence pour la production de bioéthanol. Par souci de produire une chimie plus respectueuse de l'environnement, la tendance générale est de recourir autant que faire se peut à des outils enzymatiques. L'objectif consiste alors à utiliser des enzymes spécifiques, les cellulases qui ont vocation à dégrader les chaînes de cellulose en glucose. Ce dernier est ensuite fermenté en éthanol grâce à l'action de levures. Des recherches sont actuellement menées pour optimiser les performances des cellulases en termes d'efficacité de dégradation de la cellulose. Par ailleurs, le développement de l'ingénierie enzymatique implique de tester et maîtriser l'activité des enzymes employées. Dans le cas présent, le développement de molécules de contrôle de l'activité des cellulases est devenu indispensable. Du point de vue de leur structure, ces molécules doivent notamment être composées d'une base comportant une courte chaîne de quelques unités de glucose. Cependant, si plusieurs méthodes permettent aujourd'hui de dégrader les chaînes de cellulose en unités de glucose, peu de techniques ont été développées pour la production de chaînes de 3 à 5 unités de glucose alors utilisables comme bases. Les méthodes chimiques existantes exigent des

conditions très agressives et ne sont pas sélectives. Les méthodes enzymatiques sont sélectives mais peu efficaces. L'enjeu de ma thèse a donc été de développer des méthodes de production sélective de ces courtes chaînes de glucose avec le souci de développer une chimie alternative. Dans un deuxième temps l'objectif a été de les transformer par modifications chimiques afin de les valoriser. Dans ma thèse, j'ai donc été amenée à développer deux méthodes de dégradation contrôlée de la cellulose en courtes chaînes de glucose. Ces méthodes mettent en œuvre des procédés qui présentent des rendements améliorés par rapport aux technologies existantes. Elles sont également plus respectueuses de l'environnement. Elles représentent un accès facile vers de telles molécules et ouvrent le champ pour le développement de biomolécules à base de ces sucres.

La deuxième partie de ma thèse a porté sur la transformation de courtes chaînes de glucose, les cellodextrines, en molécules à haute valeur ajoutée. Dans ce cas, le recours judicieux aux outils chimiques et enzymatiques ouvre le champ à de nombreuses possibilités de modifications de la structure chimique de ces molécules.

De nouvelles molécules naturelles impliquées dans le processus de croissance des plantes ont récemment été découvertes. Ces molécules signal déclenchent une cascade de réactions à l'origine de la croissance de la plante. Cette famille de molécules constitue un puissant fertilisant vert puisqu'elles sont actives à des échelles inférieures au nanogramme par hectare. Celles-ci sont d'ailleurs d'ores et déjà utilisées dans certaines formulations d'engrais naturels. Elles sont en outre composées d'une courte chaîne d'unités de sucre décorée par des composants chimiques qui lui confèrent leur activité fertilisante. La synthèse de telles molécules par voie chimique est très délicate et nécessite de nombreuses étapes. Une synthèse alternative par voie biotechnologique existe mais requiert une technologie pointue, qui a été développée par l'équipe CBO. Ces fertilisants naturels représentent de grands enjeux économiques et environnementaux. Ils rencontrent un intérêt croissant des communautés scientifique et industrielle. Par exemple, les retombées sur l'agronomie permettraient le développement d'une agriculture raisonnée, durable et respectueuse de l'environnement. Cela permettrait notamment de diminuer les dommages causés par l'utilisation intensive de fertilisants chimiques. Les mécanismes d'actions des molécules signal sur la croissance des plantes sont encore mal connus. Pour permettre de les élucider, des analogues de ces molécules sont synthétisés.

Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai pu développer deux méthodes de synthèse chimio-enzymatique d'analogues de ces fertilisants naturels, en apportant des modifications chimiques sur les courtes chaînes de glucose que j'ai produites. Ces analogues diffèrent des molécules naturelles par la nature du squelette sucre de la molécule qui ici est constitué de cellodextrines. L'activité biologique des molécules analogues ainsi synthétisées sera testée par nos collaborateurs pour valider leur fonction de fertilisant naturel. Dans le cas échéant, elles permettront d'avancer dans l'élucidation des mécanismes d'interactions des molécules sur la croissance des plantes. Les méthodes de synthèse développées sont un accès rapide et efficace vers ces biomolécules et ouvrent la voie au développement éventuel d'autres analogues d'intérêt.

I.3. Situation au regard de la concurrence

La valorisation de la biomasse est un thème actuel qui va de paire avec le développement de la chimie verte et des procédés de synthèse respectueux de l'environnement. Plus de 500 000 articles scientifiques ont été publiés sur le thème de la cellulose par de nombreuses équipes de recherche travaillant sur des thématiques similaires. Même si l'objectif scientifique diffère suivant les équipes, cela représente une importante concurrence. L'essor des matériaux et des énergies biosourcés nécessite le développement de produits de contrôle nécessaires au bon fonctionnement de cette industrie nouvelle. L'enjeu consiste par ailleurs d'exploiter au maximum les produits dérivables de la cellulose. Dans cette optique, les méthodes de production de cellodextrines que j'ai développées ouvrent la voie au développement de plusieurs classes de molécules d'intérêt, obtenues à partir de la biomasse.

La modification enzymatique de biomolécules est un thème de recherche passionnant et très étudié, les enzymes présentent en effet de nombreux avantages par rapport aux outils chimiques classiquement utilisés. Le choix de développer des analogues de fertilisants naturels à base des sucres produits s'inscrit dans une démarche verte. De plus, il s'intègre dans les projets phares développés par mon équipe. Le thème des fertilisants naturels représente des enjeux agronomiques et économiques importants. En France, plusieurs équipes travaillent sur la synthèse de telles molécules ou sur leurs études mécanistique et structurale. L'équipe CBO est l'un des acteurs du développement des fertilisants naturels et travaille d'ailleurs en collaboration avec l'INRA et des industriels. Plusieurs entreprises se partagent le marché des fertilisants et effectuent des recherches parallèlement aux laboratoires académiques

sur les mêmes produits cibles. Ces fertilisants naturels représentent une réelle pépite pour l'industrie. Leur production par voie synthétique constitue donc un défi industriel majeur.

I.4. Compétences scientifiques, techniques, humaines mobilisées pour le projet

Mon projet de thèse a nécessité de développer et d'employer des compétences en synthèse organique et enzymatique, ainsi qu'en caractérisation de composés organiques. La partie expérimentale a été réalisée par l'utilisation du matériel classique du laboratoire en chimie, ainsi que des appareils d'analyses chimiques. Le matériel nécessaire étant intégralement disponible au sein du CERMAV, mon projet n'a pas nécessité d'achat de matériel ou d'équipements complémentaires. Pour la réalisation de mes essais, j'ai bénéficié d'une paillasse de laboratoire, ainsi que d'un bureau. Une technicienne de laboratoire et une ingénieure d'études ont contribué pendant l'équivalent de 4 semaines au total à l'avancement de ma thèse. Le test de l'activité biologique des analogues de fertilisants verts est effectué en collaboration avec des biologistes reconnus dans le domaine.

I.5. Moi dans le contexte de ma thèse

Je suis Ingénieur Chimiste diplômée de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand. Je me suis spécialisée en Chimie Organique et Catalyse Organométallique lors de mon Master ès Science in Chemistry and Biochemistry que j'ai effectué à l'Université d'Oklahoma aux Etats-Unis. J'ai toujours apprécié particulièrement les sciences physiques et j'ai rapidement développé un intérêt particulier pour la chimie organique. J'ai découvert les glycosciences durant mon parcours universitaire, domaine qui m'a plu par sa diversité, par l'importance des sucres en général et par le fort potentiel de ces molécules. J'ai toujours voulu participer au développement de projets innovants. C'est notamment ce qui m'a déterminée à poursuivre mon parcours en Doctorat afin d'acquérir une forte expérience dans le domaine de la recherche. Mon objectif est de devenir chercheur ou chargée de projets R&D.

J'ai postulé à plusieurs offres de thèse pour des projets de recherche liés à l'énergie, aux biotechnologies ou aux matériaux de haute technologie, ayant tous des

fins industrielles. J'ai porté mon choix sur la thèse proposée par le CERMAV parce qu'elle correspondait à un projet de recherche appliqué, à l'interface de plusieurs domaines et connecté à l'industrie, le tout dans un environnement de travail de qualité.

Je n'ai pas joué de rôle dans l'établissement de base du projet, les objectifs étaient définis dans leurs grandes lignes et le financement acquis. J'ai répondu à une offre de thèse.

La programmation du projet sur les trois années s'est faite suivant les objectifs et l'évolution des travaux en accord avec mon encadrant au travers de réunions d'avancement.

II. Déroulement, gestion et coût estimé de mon projet de thèse

II.1. Préparation et cadrage du projet

Mon projet présentait un certain facteur de risques quant au développement des nouvelles méthodes de production de cellodextrines. En effet, ce thème de recherche est étudié depuis plusieurs dizaines d'années par de nombreuses équipes scientifiques, et la capacité à innover et développer de nouvelles méthodes n'était *a priori* pas garantie. Pour atteindre mes objectifs, j'ai mis en œuvre de nouveaux outils chimiques issus de recherches émergentes qui m'ont permis d'explorer une voie de recherche innovante et concluante.

Développer des méthodes de production de cellodextrines ainsi que deux applications pour leur valorisation était très ambitieux et représentait un risque temporel, qui a été maîtrisé à l'aide de mon directeur de thèse, en favorisant l'un des projets de valorisation prometteur. Ce projet en lui-même présentait le risque de ne pas aboutir en raison de la complexité de la synthèse des analogues. Nous avons donc parallèlement développé une autre stratégie de synthèse alternative.

Enfin, le risque existe qu'une fois les analogues de fertilisants naturels synthétisés, ceux-ci ne présentent pas d'activité biologique. L'unique approche permettant de limiter

ce risque est de réaliser si possible une étude bibliographique pour conforter l'hypothèse. Ce risque, ou plutôt non garantie du résultat est intrinsèque aux métiers de la recherche scientifique. Aussi décevant qu'il soit, un résultat négatif constitue un résultat scientifique potentiellement valorisable. Une part de chance contribue souvent aux avancées scientifiques. Les molécules développées permettront le cas échéant d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes réactionnels impliqués dans la croissance des plantes. Les méthodologies envisagées permettront d'imaginer la synthèse d'autres analogues.

II.2. Choix des partenaires nationaux ou internationaux

J'ai travaillé en collaboration avec un industriel, qui a financé une partie de mes travaux de thèse, et indirectement avec l'un des clients de cet industriel pour le développement et la mise au point de synthèses de produits à des fins commerciales. Le principe d'une des méthodologies de production de cellodextrines est d'ailleurs à ce jour utilisé industriellement. Pour mon second projet, le test de l'activité biologique des molécules est réalisé par des biologistes compétents en collaboration avec l'équipe CBO.

II.3. Contribution à la mobilisation des financements externes à l'équipe

Ma bourse de thèse est une bourse BDI consistant en un financement à 50% par le CNRS et 50% par l'industriel du coût salarial d'un doctorant pendant trois ans. Le financement pour le fonctionnement reste supporté par des fonds propres à mon équipe (CBO) et à mon laboratoire (CERMAV) d'accueil.

II.4. Gestion des aspects contractuels, confidentialité, propriétés intellectuelles, industrielles et éthiques

Mes travaux sur le projet de valorisation de la cellulose en cellodextrines feront l'objet d'une publication dans un journal scientifique à comité de revue et ont été présentés lors de deux communications à des congrès internationaux et nationaux.

- European Carbohydrate Symposium, Naples, Italie, 2011. (récompensé par le prix du meilleur poster par The European Polysaccharide Network of Excellence. Article dans la 19^{ème} Newsletter EPNOE et dans la gazette CERMAV-CNRS)
- 15^{ème} Journée Scientifique du Groupe Lyonnais des Glyco-Sciences, Lyon, France, 2011.

Une des méthodologies de production de cellodextrines est utilisée industriellement et reste pour l'instant gardée sous discrétion. Elle fera l'objet d'une future publication.

Mes travaux sur la synthèse chimio-enzymatique de potentiels fertilisants verts feront l'objet d'une voire de deux publications dans des journaux scientifiques et ont été présentés lors de trois congrès nationaux et internationaux.

- 24^{èmes} Journées du Groupe Français des Glyco-Sciences, Val Joly, France, 2012.
- Journée Rhône-Alpes des Biomolécules, Grenoble, France, 2012.
- International Carbohydrate Symposium, Madrid, Espagne, 2012.

III. Conduite du projet

III.1. Principales étapes

Le cadrage et la programmation des projets de ma thèse ont évolué en fonction de l'avancement des travaux. L'échéancier initial prévoyait une première étude de 12 à 18 mois sur la valorisation de la cellulose en cellodextrines, une seconde étude de 12 mois sur la valorisation des cellodextrines, et enfin 6 mois pour la rédaction du manuscrit.

Suite à une réunion d'avancement avec les industriels après 8 mois de thèse, j'ai démarré deux nouveaux projets de valorisation de cellodextrines. Le premier a consisté à l'utilisation comparative d'un procédé différent de celui utilisé jusqu'alors, le second en la valorisation des cellodextrines en analogues de fertilisants naturels. Cette multiplicité de projets a nécessité leur priorisation, avec notamment la mise en suspens d'un des projets de valorisation, qui sera poursuivi et valorisé scientifiquement par la rédaction d'un article après la thèse. J'ai finalement démarré la rédaction de mon manuscrit de thèse au mois 32. La rédaction a été effectuée en parallèle avec la fin des travaux expérimentaux

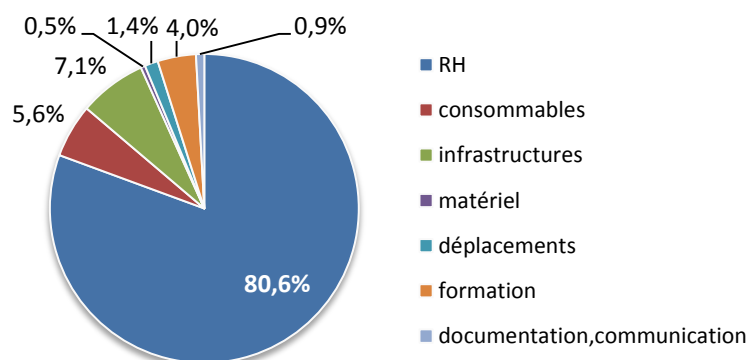
laboratoire, mais une solution alternative a été trouvée dans la plupart des cas, nécessitant alors du temps de développement.

III.4. Estimation et prise en charge du coût du projet

Le coût de mon projet de thèse englobe les différents domaines du coût salarial, du matériel, des infrastructures et des frais de fonctionnement. Le montant du projet est estimé à un peu plus de 130 000 Euros.

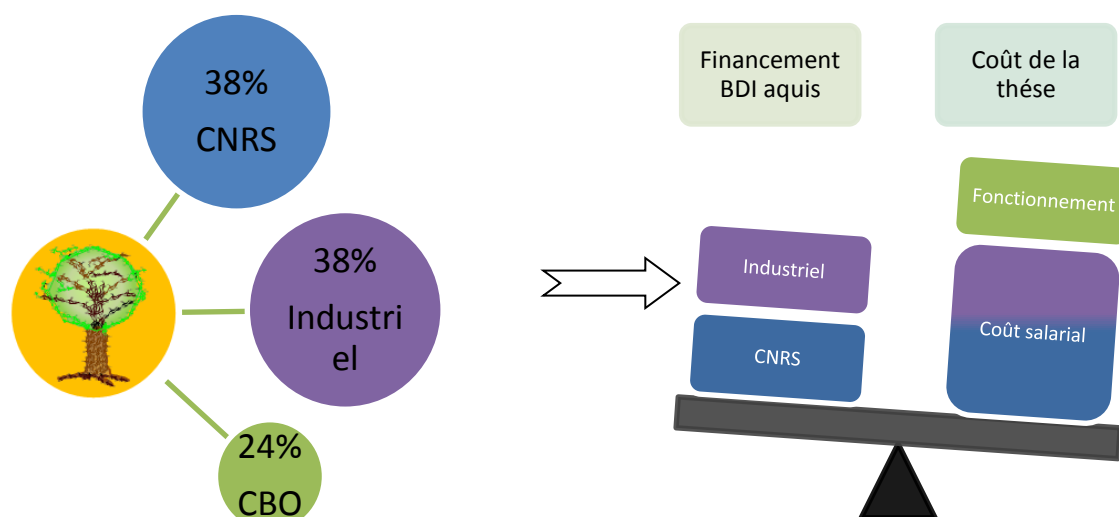
ÉLÉMENT	Montant (€)
Ressource humaines	106767
Consommables	7418
Infrastructures	9344
Matériel	608
Déplacements	1850
Formation	5316
Documentation, Communication	1145
Total	132448

La répartition des frais ci-dessous montre que les pôles de dépenses les plus importants sont les ressources humaines, les infrastructures et les consommables.



III.5. Répartition des charges financières

La bourse BDI finance le coût salarial du doctorant à hauteur de 50% par partie. Les fonds nécessaires au fonctionnement du projet proviennent d'autres sources.



Les frais non supportés par la bourse de thèse ont été couverts par des fonds propres à l'équipe CBO et issus d'autres financements.

IV. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

IV.1. Mes expertises scientifiques, techniques et personnelles

De par ma formation académique d'Ingénieur en Chimie et mon Master ès Science en Chimie et Biochimie, je suis spécialisée en synthèse organique. Lors de ma thèse, j'ai développé une expertise en glycochimie, en synthèse organique chimique et enzymatique ainsi qu'en caractérisation.

Pour mener à bien mes projets de thèse, j'ai exploré le domaine de la synthèse enzymatique, qui était pour moi totalement nouveau. J'ai acquis un savoir-faire spécifique en synthèse impliquant des enzymes, en particulier lors de mon étude sur la valorisation des cellodextrines en fertilisants naturels. J'ai également pu développer des compétences sur différentes techniques de synthèse organique, notamment par micro-ondes et en liquide ionique. J'ai pu aiguiser mon expertise en caractérisation de composés organiques classiques, par l'utilisation quotidienne des techniques de Résonance Magnétique Nucléaire et de Spectrométrie de Masse appliquées à la caractérisation de sucres. J'ai développé des compétences en dosage chimique des sucres, que j'ai par la suite transmis à des personnels du laboratoire, par exemple par la rédaction de protocoles opératoires. J'ai par ailleurs développé des compétences en purification des molécules par les techniques classiques de séparation, notamment par chromatographie. J'ai mis au point des méthodes de purification de famille de molécules, qui sont désormais utilisées au laboratoire. Ma thématique de recherche m'a permis de développer des connaissances pointues dans le domaine des polymères naturels en particulier la cellulose et ses dérivés. Mon laboratoire d'accueil étant un lieu où collaborent chimistes, biologistes et physico-chimistes, j'ai acquis des connaissances transverses dans la thématique des macromolécules végétales. Je suis capable d'évoluer à l'interface de ces domaines, d'échanger et de suivre un raisonnement scientifique multidisciplinaire. Ma thèse a également été l'occasion de renforcer mon sens critique et ma rigueur scientifique. J'ai affirmé mon sens des résultats et de la performance par le développement de deux méthodologies de synthèse de production de molécules à haute valeur ajoutée à partir de la biomasse. Ma thèse m'a permis d'apprendre à m'organiser rigoureusement pour mener à bien quatre projets de recherche en simultané. Cette expérience a renforcé mes capacités d'autonomie et de prise de décision.

Grâce aux formations scientifiques pour doctorants, j'ai complété mon portefeuille de compétences techniques en me formant aux techniques de diffraction de Rayons X pour petites molécules, ainsi qu'en cristallographie des macromolécules au Synchrotron de Grenoble.

Au-delà des compétences scientifiques et techniques, j'ai pu accroître mes qualités de communication scientifiques, écrites et orales, en français et en anglais. Cela s'est illustré par plusieurs présentations de mes travaux lors de congrès nationaux et internationaux (posters et conférences), par la formation de personnels techniques au laboratoire, mais également par la rédaction de rapports, d'articles scientifiques et de

mon manuscrit de thèse. J'ai également occupé la fonction de représentante des doctorants du CERMAV. Ceci m'a permis de développer mes capacités de reporting et d'organisation au travers des réunions et des événements de socialisation comme des dîners, ou des activités extra-professionnelles.

J'ai suivi la formation Doctoriales®, au cours de laquelle j'ai géré une équipe de dix personnes spécialisées dans des domaines différents pour l'élaboration d'un projet innovant, de l'idée à la création d'entreprise. Ainsi j'ai accru mes capacités à être critique et à prendre des décisions. Je me suis familiarisée avec les notions règlementaires du monde de l'entreprise. Nous avons d'ailleurs remporté le prix de l'esprit d'équipe. J'ai également participé à la fête de la Science au travers de la présentation des travaux de l'équipe CBO à des lycéens, avec des démonstrations en chimie à l'appui. Ainsi j'ai appris à m'adapter et à tenir un discours scientifique approprié au public.

IV.2. Construction des réseaux professionnel et personnel

J'appartiens à l'association des doctorants en Chimie et Sciences du Vivant de Grenoble (Globule 38), ainsi qu'à l'Association des Anciens Elèves de l'ENSC de Clermont-Ferrand (AAE ENSCCF). Je suis également membre du Groupe Français des Glycos-Sciences et du Groupe Lyonnais des Glyco-Sciences. Je fais partie d'un réseau social personnel (Facebook), ainsi que de deux réseaux sociaux professionnels (Viadeo et Linked In). Lors des séminaires et congrès auxquels j'ai participé, j'ai pu échanger et établir des contacts avec des chercheurs d'autres laboratoires ainsi qu'avec des acteurs du monde de l'industrie. Grâce aux formations dispensées par l'Université de Grenoble, j'ai rencontré des doctorants provenant d'autres domaines et nous avons ainsi pu échanger sur nos expériences de thèse.

IV.3. Compétences transférables en dehors de mon domaine de recherche

Ma thèse m'a permis de développer et de renforcer des compétences et qualités qui sont transférables dans d'autres domaines que celui qui est le mien.

Compétences/Qualités	Justifications
Organisation et rigueur	<ul style="list-style-type: none"> - Elaboration de planning de travail et de plans d'expériences obéissant aux bonnes pratiques de laboratoire - Tenue d'un cahier de laboratoire - Analyse et reporting de mes résultats
Gestion de projets, autonomie	<ul style="list-style-type: none"> - Gestion de 4 projets de recherche simultanément - Travaux de recherche effectués en autonomie - Prise d'initiatives pour le développement des projets
Combativité et créativité	<ul style="list-style-type: none"> - Apport de solutions innovantes à des problématiques anciennes - Développement de nouvelles méthodes de synthèse
Dynamisme, leadership, esprit d'équipe	<ul style="list-style-type: none"> - Organisation d'évènements de socialisation - Participation active aux réunions de travail - Gestion d'une équipe de 10 scientifiques lors de la formation Doctoriales®
Communication, pédagogie	<ul style="list-style-type: none"> - 5 présentations de mes travaux en congrès - Présentations en séminaires internes - Formation de personnels à des techniques de laboratoire - Liaison doctorants-direction - Suivi d'une formation en marketing pour la R&D
Pragmatisme, sens critique	<ul style="list-style-type: none"> - Veille scientifique et évaluation des résultats - Conseils techniques et conseils en communication (au laboratoire et pour la relecture de documents)
Modération et diplomatie	<ul style="list-style-type: none"> - Gestion des conflits internes - Ecoute de mes pairs

V. Résultats et impacts de ma thèse

V.1. Pour le labo, l'équipe et les partenaires

Les résultats de ma thèse vont aboutir à la publication de 2 à 4 articles scientifiques dans des journaux à comité de lecture. Un des projets a débouché sur une collaboration entre mon équipe et un industriel leader de son domaine et client de l'entreprise partenaire de ma thèse. Cette collaboration a permis à l'entreprise partenaire d'entretenir ses bonnes relations avec ce client.

Une de mes communications à un congrès européen a été récompensée par un prix décerné par the European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE). Un article relatant mon travail, l'équipe et le partenaire industriel a été publié dans la newsletter du réseau ainsi que dans la gazette du CERMAV-CNRS tous deux consultables en ligne.

Mon dernier projet de thèse concernant les potentiels fertilisants verts à base de sucre va déboucher sur une collaboration avec un autre laboratoire afin de tester leur activité biologique. Cela permettra si les résultats révèlent une activité d'envisager le développement de nouveaux projets de synthèse d'autres molécules, de déposer éventuellement un brevet et de pérenniser la collaboration. Des débouchés économiques et environnementaux sont également envisageables puisque ces molécules constituent accès potentiel au développement d'une agriculture plus raisonnable, plus économique et plus durable pour l'environnement.

V.2. Impact de ma thèse sur moi-même

Pour ma part, la thèse m'a permis de développer des multiples compétences tant sur les plans professionnel (côté scientifique et côté organisationnel) que personnel. La thèse m'a permis de découvrir les polymères naturels, et de me spécialiser en glycochimie, particulièrement dans les techniques de synthèse de molécules par voie enzymatique. La coloration « chimie verte » de ma thèse m'a permis de développer une démarche de synthèse plus respectueuse de l'environnement utilisant des milieux réactionnels et des outils de synthèse pour une chimie durable. Du point de vue personnel, ma thèse m'a permis d'accroître mes capacités à être critique et à gérer mon temps selon les priorités, à être créative et combative pour apporter des solutions aux problèmes rencontrés dans le but de faire aboutir le projet et d'obtenir des résultats. J'ai enrichi ma culture scientifique dans d'autres domaines que mon domaine de prédilection qu'est la chimie organique, et j'ai gagné en persévérance et pugnacité. L'environnement de travail multidisciplinaire dans lequel j'ai évolué m'a affirmé mon goût pour les projets scientifiques impliquant plusieurs domaines de compétences. La formation par la recherche m'a donné l'opportunité de me munir de tous les outils et compétences pour prendre en main et gérer un projet scientifique.

La période de thèse est une aventure parfois difficile où l'on se remet beaucoup en question, et où le fait d'avoir un moral d'acier et une détermination à toute épreuve est impératif. J'ai appris à m'ouvrir aux autres, à échanger mes expériences et à écouter

mes autres collègues thésards, avec lesquels je garderai sans aucun doute une amitié certaine.

Pour moi, la thèse est aussi une expérience humaine au cours de laquelle je me suis affirmée en tant que scientifique, j'ai pris de l'assurance, mais c'est aussi une expérience où l'on se découvre. Les tensions et le stress liés à cette expérience m'ont permis d'apprendre à me détacher de mon travail, à évoluer de l'état d'esprit étudiant pour adopter une démarche professionnelle.

PREPARATION ET MODIFICATION D'OLIGOSACCHARIDES DE CELLULOSE PAR CHIMIE DOUCE BIO-INSPIREE

Résumé

La valorisation de la biomasse saccharidique pour la production de dérivés biosourcés d'intérêt est un enjeu important. La cellulose est le polysaccharide le plus abondant sur Terre et représente une source de matière première considérable. Dans ce travail, de nouveaux procédés de dépolymérisation de la cellulose pour l'obtention contrôlée de cellodextrines sont décrits. Ils proposent une approche alternative plus douce aux procédés de production actuels en privilégiant l'utilisation d'enzymes, et de liquides ioniques comme solvants alternatifs. Ce travail rapporte l'élaboration de deux méthodes d'obtention contrôlée d'oligosaccharides à partir de cellulose et de cellulose acétate par combinaisons successives d'hydrolyses acide et enzymatique. Ces procédés ont permis l'obtention de cellodextrines de tailles ciblées avec de bons rendements, et constituent une voie prometteuse pour la valorisation de la cellulose en dérivés biosourcés.

La deuxième partie de ce travail consiste en la modification chimio-enzymatique des oligosaccharides de cellulose produits pour leur valorisation en biomolécules d'intérêt, plus particulièrement dans le domaine de l'agrochimie. Les cellodextrines sont utilisées en tant que base saccharidique pour la synthèse d'analogues de lipo-chitooligosaccharides comme potentiels fertilisants verts. Deux méthodes de préparation ont été élaborées à l'aide des glycoside-hydrolases comme outils de synthèse. Les stratégies développées permettent un accès efficace à la synthèse d'analogues et peuvent être adaptées pour la production d'autres molécules.

Mots clé : cellulose, oligosaccharides, liquides ioniques, synthèse chimio-enzymatique, synthèse multi-étapes, biocatalyse

SOFT BIO-INSPIRED CHEMISTRY FOR THE PREPARATION AND MODIFICATION OF CELLULOSE OLIGOSACCHARIDES

Abstract

Valorisation of biomass is a timely challenge and its bio-conversion raises a growing interest from academics and industrials. Cellulose is the most abundant biopolymer on Earth and offers a wide range of applications including value added bio-derived compounds. In this work we report the design of new methods to produce cellodextrins from cellulose and from cellulose acetate, by a combination of successive hydrolyses. These strategies imply the use of ionic liquids and enzymes to perform the depolymerisation. They represent a soft alternative to the current processes of production. The controlled hydrolysis of cellulose was realised in two steps involving first the partial fragmentation of cellulose in ionic liquids by acid catalysis. Then, the selective hydrolysis of those cellulose fragments was performed by an endoglucanase to produce the targeted sizes of cellodextrins. The second method deals with the depolymerisation of water soluble cellulose acetate by enzymatic hydrolysis. Those two methods have led to the controlled production of cellodextrins of interest, with significantly improved yields.

In the second part of this work, cellodextrins were used as building block for the synthesis of analogs of lipo-chitooligosaccharides as potential natural fertilizers. Several chemo-enzymatic routes were investigated to produce these biomolecules, and two methods of synthesis were elaborated using glycoside-hydrolases as coupling tools. Those methods offer an easy access to analogs and can be adapted for the production of further molecules.

Key words : cellulose, oligosaccharides, ionic liquids, chemo-enzymatic synthesis, multi-steps synthesis, biocatalysis