



Système modèle de cristallisation de l'amylose A

Nicole Montesanti

► To cite this version:

Nicole Montesanti. Système modèle de cristallisation de l'amylose A. Polymères. Université Joseph Fourier (Grenoble I), 2008. Français. NNT: . tel-02263603

HAL Id: tel-02263603

<https://theses.hal.science/tel-02263603>

Submitted on 5 Aug 2019

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

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

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THÈSE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Spécialité : Sciences des Polymères

présentée par

Nicole MONTESANTI

SYSTÈME MODÈLE DE CRISTALLISATION DE L'AMYLOSE A

Soutenue publiquement le 8 Décembre 2008 devant le jury composé de :

Serge PEREZ	président
Gervaise MOSSER	rapporteur
Annette THIERRY	rapporteur
Gabrielle POTOCKI-VERONESE	examineur
Francesco DI RENZO	examineur
Alain BULEON	co-directeur de thèse
Jean-Luc PUTAUX	co-directeur de thèse

*Dedico questo lavoro ai miei genitori, mi hanno dato
la fiducia necessaria per finire tutto ciò e per questo
non li ringrazierò mai abbastanza.*

Remerciements

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (UPR5301 du CNRS, dirigé par Redouane Borsali). Mes sincères remerciements vont à Serge Pérez et Francois Taravel pour m'avoir accueillie au laboratoire dans le cadre du réseau de Formation Marie Curie "CERMAV-TRAIN" (MEST-CT-2004-503322), ainsi qu'au CERMAV qui a complété mon financement.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements aux membres du jury de cette thèse, Gervaise Mosser, Annette Thierry, Gabrielle Potocki-Véronèse, Francesco Di Renzo et Serge Pérez, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Jean-Luc Putaux pour avoir assuré l'encadrement scientifique de ce travail. Je lui suis particulièrement reconnaissante de m'avoir amenée jusqu'à la fin de la thèse sans laisser les difficultés rencontrées nous barrer la route. J'exprime aussi toute ma gratitude à Alain Buléon (INRA-BIA, Nantes) pour avoir co-encadré ce travail, ainsi que pour ses encouragements et conseils. Je témoigne aussi ma reconnaissance et mon amitié à Gabrielle Potocki-Véronèse (LISBP, Toulouse) pour son aide et ses précieux conseils.

Je n'aurais pas pu réaliser ce travail sans Danielle Dupeyre, qui m'a tout appris de la microscopie à balayage, et Christine Lancelon-Pin, qui a réalisé les images quand je suis rentrée en Italie. Je tiens à remercier aussi Frédéric Dubreuil (AFM, CERMAV), Isabelle Jeacomine (RMN, CERMAV), Stéphanie Boullanger (spectrométrie de masse, CERMAV) et Bruno Pontoire (SAXS-WAXS, INRA) pour les travaux de caractérisation qu'ils ont réalisés, ainsi qu'Alain Heyraud (CERMAV), Shinichi Kitamura (Université d'Osaka, Japon) et la société Roquette pour m'avoir fourni des échantillons. Le GDR CNRS-INRA "Assemblages des Molécules Végétales" a, par ailleurs, en partie financé mon stage au LISBP à Toulouse. Je remercie Pierre-Claude Escalier (LISBP) pour son aide dans la production de l'amylose synthétique utilisée dans ce travail.

Je remercie aussi toute l'équipe "Structure et Propriétés des Glycomatériaux" pour m'avoir accueillie pensant 5 ans, en particulier Camélia Stinga pour avoir partagé de longues journées de travail dans le bureau.

J'exprime aussi toute ma gratitude à Henri Chanzy et Yoshiharu Nishiyama pour leurs précieux conseils.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance de façon moins formelle, mais tout aussi sincère, aux différentes personnes que j'ai rencontrées au cours de ces 4 ans passés au CERMAV : Patrick Pérez pour son amitié et pour avoir sauvé ma moto 2 ou 3 fois (merci, merci, merci !), Marie-France Marais pour ses précieux conseils scientifiques, pour sa gentillesse et pour son soutien psychologique, Pierre Sailer pour son amitié, son aide, sa disponibilité... (je te laisse la machine à café, soit sage avec Bruno...) et Bruno Jean pour le climat de confiance et de dialogue qu'il sait instaurer (soit sage avec Pierre...).

Merci à Marie pour sa gentillesse et sa disponibilité (tu seras toujours la bienvenue à Rome ou à Aoste. Tu peux aussi amener Loïc si tu veux... !!!!).

Merci à Aurélie pour son amitié sincère et sa gentillesse (si de temps en temps tu as besoin de respirer un peu, tu pourras toujours me téléphoner et j'aurai sûrement des aventures magnifiques à te raconter pour rigoler ensemble).

Merci à Sophie. Merci pour tout (tu sais bien que je te considère comme une sœur).

Merci à Brix, pour son soutien, son amitié et son amour.

Nicole Montesanti

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I – TRAVAUX ANTÉRIEURS	3
1. Amidon natif et amylose synthétique	3
1.1. Amidon natif	3
1.1.1. Morphologie des grains d'amidon	3
1.1.2. Organisation structurale de l'amidon natif	4
1.1.2.1. Structure moléculaire	4
a) L'amylose	5
b) L'amylopectine	5
c) Autres composants	7
1.1.2.2. Organisation supramoléculaire	7
1.1.2.3. Structure cristalline	10
1.2. Hydrolyse des grains d'amidon	13
1.2.1. Hydrolyse acide	13
1.2.2. Hydrolyse enzymatique	17
1.3. Amylose synthétique	18
1.3.1. Enzymes	18
1.3.1.1. L'amylosaccharase	19
1.3.1.2. L'amidon-phosphorylase	22
2. Cristallisation des polymères	23
2.1. Introduction	23
2.2. Morphologie des cristaux de polymère	24
2.2.1. Cristaux lamellaires	25
2.2.2. Shish-kebabs	27
2.2.3. Sphérolites	29
2.3. Mécanisme moléculaire de la cristallisation	31
2.3.1. Nucléation	31
2.3.2. Croissance	34
2.4. Morphologie cristalline des polysaccharides autres que l'amylose	36
3. Formes cristallines de l'amylose recristallisée	37
3.1. Monocristaux	38
3.1.1. Type A	38
3.1.2. Type B	40
3.1.3. Type V	41
3.2. Sphérolites	43
3.3. Transition polymorphique B→A	44
CHAPITRE II – MATÉRIEL, MÉTHODES ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES	45
1. Sources d'amylose et méthodes de préparation	45
1.1. Amidons natifs	45

1.1.1. Sources d'amidon.....	45
1.1.2. Hydrolyse acide des grains natifs.....	45
1.1.3. Hydrolyse enzymatique et fractionnement.....	45
1.2. Amylose synthétique.....	46
1.2.1. Synthèse par l'amylosaccharase et fractionnement.....	46
1.2.2. Mesure de l'activité de l'amylosaccharase.....	48
1.2.3. Synthèse par l'amidon-phosphorylase.....	48
2. Techniques de détermination des degrés de polymérisation.....	48
2.1. Chromatographie haute performance d'échange d'anions (HPAEC).....	48
2.2. Désorption-ionisation laser assistée par matrice - spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	50
2.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	51
3. Protocoles de cristallisation.....	53
3.1. Cristaux d'amylose A.....	53
3.2. Sphérocristaux d'amylose de type A et B.....	55
4. Substrats pour la nucléation hétérogène.....	56
4.1. Microcristaux de cellulose.....	56
4.2. Muscovite.....	57
5. Techniques de caractérisation.....	58
5.1. Microscopie optique en lumière polarisée.....	58
5.2. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	61
5.2.1. Principe général.....	61
5.2.2. Microscopie électronique à balayage avec filament thermoïonique.....	62
5.2.3. Microscopie électronique à balayage avec canon à effet de champ (MEB-FEG).....	64
5.3. Microscopie électronique en transmission (MET).....	65
5.4. Diffraction des rayons X.....	68
5.4.1. Diffraction des rayons X aux grands angles (WAXS ou DRX).....	69
5.4.1.1. Principe général.....	69
5.4.1.2. Equipement conventionnel et conditionnement des échantillons.....	70
5.4.1.3. Rayonnement synchrotron.....	71
5.5. Microscopie à force atomique (AFM).....	72
5.6. Densimétrie.....	73

CHAPITRE III – CARACTÉRISATION DES α -GLUCANES PRÉPARÉS PAR HYDROLYSE ACIDE ET SYNTHÈSE ENZYMATIQUE.....75

1. Dextrines limites préparées par hydrolyse acide d'amidon natif.....	75
1.1. Dextrines limites préparées par hydrolyse acide d'amidon de pomme de terre.....	75
1.2. Dextrines limites préparées par hydrolyse acide d'amidon de pois ridé.....	78
2. Maltodextrines préparées par hydrolyse enzymatique d'amidon de maïs standard.....	80
3. Amylose synthétique.....	82
3.1. Amylose synthétisée par l'amylosaccharase.....	82
3.2. Amylose synthétisée par la phosphorylase.....	86
4. Conclusion.....	88

CHAPITRE IV – CRISTALLISATION EN SOLUTION	91
1. Dextrines limites	91
2. Maltodextrines fractionnées	93
3. Amylose synthétique	94
3.1. ASA(F1)	94
3.2. ASA(1)	94
3.3. ASA(2)	97
3.4. ASA(3)	100
3.5. ASP	103
4. Évolution morphologique pendant la cristallisation	106
5. Variation des conditions de cristallisation	109
5.1. Température du réacteur	109
5.2. Concentration en amylose	112
 CHAPITRE V – CRISTALLISATION EN SOLUTION EN PRÉSENCE D'UN SUBSTRAT	119
1. Shish-kebabs	119
2. Surfaces de verre et de mica	119
2.1. Surfaces de verre	123
2.2. Surfaces de mica	124
3. Conclusion	126
 CHAPITRE VI – FACIÈS ET STRUCTURE DES CRISTAUX D'AMYLOSE A	129
1. Analyse cristallographique et faciès des cristaux	129
1.1. Position du problème	129
1.2. Exploration du réseau réciproque par diffraction électronique	129
1.2.1. Mode opératoire et indexation des clichés de diffraction	129
1.2.2. Calibration et détermination des paramètres de la maille cristalline	137
1.3. Densité des cristaux d'amylose A	141
1.4. Modèle moléculaire déterminé par diffraction des rayons X	141
2. Structure des monocristaux de type A	144
3. Discussion	147
3.1. Synthèse des résultats	147
3.2. Morphologie	148
3.3. Polarité	149
 CHAPITRE VII – MÉCANISME DE CROISSANCE	153
1. Les morphologies cristallines	153
2. Influence des paramètres moléculaires	155
2.1. Influence du DP moyen sur la morphologie des cristaux	155
2.2. Influence du DP moyen et de la polydispersité sur la taille des cristaux	157
2.3. Influence du DP moyen et de la polydispersité sur le type cristallin	159
2.4. Influence du taux de branchement	160
3. Les différentes étapes de la cristallisation	161
3.1. Solubilisation de l'amylose	161

3.2. Formation des doubles hélices	161
3.3. Nucléation	162
3.3.1. Les éventails	163
3.3.2. Les rosettes	164
3.3.3. Cas des dextrines limites	164
3.4. Croissance	166
3.4.1. Croissance latérale	166
3.4.2. Croissance longitudinale	167
3.4.3. Forme de l'extrémité apicale	168
4. Conclusion.....	169
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	 171
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 175
 ANNEXE.....	 187

INTRODUCTION

L'amidon est le principal glucide de réserve des végétaux supérieurs et l'une des sources caloriques majeures de l'espèce humaine. Il constitue aussi une matière première abondante, renouvelable et biodégradable. L'amidon natif se présente sous la forme de grains microscopiques (1-100 μm) constitués d'un mélange de deux homopolymères de glucose, l'un linéaire (l'amylose) et l'autre ramifié (l'amylopectine), dont l'architecture supramoléculaire complexe fait toujours débat. Il est aujourd'hui admis que la cristallinité de l'amidon natif (de l'ordre de 35%) trouve son origine dans l'organisation en grappe de l'amylopectine. Les courtes branches de la macromolécule forment des doubles hélices qui s'associent latéralement pour former des lamelles cristallines. La morphologie et la dimension de ces cristallites sont encore mal connues, ainsi que le rôle de points de branchement et de leur distribution. Les résultats publiés montrent que les domaines cristallins sont nanométriques et peu adaptés aux études cristallographiques directes.

Si les méthodes "globales" de caractérisation structurale (diffraction/diffusion des rayonnements, spectroscopies) permettent d'obtenir des informations moyennées sur une population de grains d'amidon, la caractérisation des cristallites à une échelle locale reste problématique. Les grains d'amidon sont des objets trop gros pour être observés directement, par exemple, par microscopie électronique en transmission. Il est alors nécessaire de préparer des échantillons plus petits (ou plus fins) en les fragmentant mécaniquement, en les coupant en "tranches" ultrafines par microtomie ou en les dégradant partiellement avec des acides ou des enzymes. Ces méthodes sont cependant destructives et il reste difficile de reconstruire, par une démarche intellectuelle inverse, l'organisation supramoléculaire à partir des briques élémentaires.

La machinerie enzymatique qui synthétise l'amidon natif étant particulièrement complexe, l'utilisation d'approches *in vitro* pour biosynthétiser l'amylopectine est, pour le moment, difficilement envisageable. Quant à la recristallisation *in vitro* d'amylopectine extraite d'amidon natif, elle ne conduit qu'à des réseaux ou des gels enchevêtrés peu cristallins et ne permet pas de reformer l'architecture en grappe adoptée par la même molécule au sein du grain.

Pour étudier la cristallisation de l'amidon, une alternative consiste donc à concevoir des systèmes *in vitro* simplifiés ou "modèles" dont on peut contrôler certains paramètres. En particulier, on peut s'intéresser au comportement de courtes chaînes dont le degré de polymérisation est de l'ordre de celui des courtes branches de l'amylopectine, celles-là même

qui forment des cristallites dans l'amidon natif. Au cours de ce travail, nous avons donc préparé différentes fractions de courtes chaînes d'amylose, par hydrolyse d'amidon natif ou par synthèse enzymatique *in vitro*, dont les caractéristiques moléculaires se rapprochent de celles des courtes branches de l'amylopectine. Nous avons ensuite utilisé ces fractions pour préparer des cristaux d'amylose à partir de solutions aqueuses diluées et par diffusion lente d'un précipitant. Nous avons étudié l'influence de paramètres moléculaires (degré de polymérisation, polydispersité, taux de branchement) ou opératoires (concentration, température, volume de précipitant, présence de substrats inductifs) sur le mode de cristallisation et la morphologie des produits cristallisés. Les cristaux ont été caractérisés au moyen de méthodes complémentaires d'imagerie et de diffraction.

Ce mémoire s'articule autour de sept chapitres. L'étude bibliographique du chapitre I rappellera des généralités sur l'amidon et présentera des travaux antérieurs sur la cristallisation des polymères et les formes de l'amylose recristallisée. Les différentes sources d'amylose utilisées dans ce travail, les méthodes de préparation des cristaux et les différentes techniques de caractérisation des échantillons sont présentées dans le chapitre II. Le troisième chapitre est consacré à la description moléculaire des courtes chaînes préparées par hydrolyse acide ou enzymatique et synthèse enzymatique. Dans le chapitre IV, nous présentons les cristaux obtenus par cristallisation de ces différentes fractions en solution diluée et en présence de précipitant, ainsi que leur caractérisation au moyen de techniques complémentaires d'imagerie et de diffraction. L'impact de certains paramètres opératoires sur la morphologie cristalline est discuté. Le cinquième chapitre est consacré aux produits cristallisés en présence de substrats solides inductifs. Le chapitre VI présente une analyse cristallographique détaillée des monocristaux d'amylose par diffraction ainsi qu'une description de leur structure lamellaire. Enfin, le septième chapitre propose une synthèse des résultats. Nous montrons comment les concepts de la cristallisation en solution diluée s'appliquent au cas de l'amylose. Nous discutons l'influence des paramètres de cristallisation sur la morphologie, la structure et les mécanismes de croissance des cristaux en termes de cristallisation des polymères (longueur des chaînes, température et type d'interaction dans le milieu). Les conclusions et perspectives de ce travail nous permettront d'évaluer la pertinence de notre système modèle pour comprendre les mécanismes de cristallisation au sein du grain d'amidon pendant sa biosynthèse.

CHAPITRE I

TRAVAUX ANTÉRIEURS

1. AMIDON NATIF ET AMYLOSE SYNTHÉTIQUE

1.1. Amidon natif

L'amidon est un glucide de réserve, synthétisé par les végétaux supérieurs à partir de l'énergie solaire. Après la cellulose, il est le second composé glucidique photosynthétisé sur notre globe. Il est de plus une des principales ressources caloriques pour l'espèce humaine. Il est présent en quantités importantes dans les céréales (riz, maïs, blé, etc.), les légumineuses (haricot, pois, etc.) et les tubercules (pomme de terre, manioc, igname, patate douce, etc.).

Dans les cellules végétales, l'amidon est synthétisé dans des organites spécifiques spécialisés dans le stockage des nutriments glucidiques : les chloroplastes et les amyloplast. Il se présente sous forme de grains microscopiques (1-100 μm). Dans les amyloplast, l'amidon est présent sous forme dense, semi-cristalline, et peu hydratée. Sa morphologie (sphérique, polyédrique, aplatie, etc.), sa composition et sa structure sont contrôlées génétiquement, et varient selon l'origine botanique. La synthèse d'un grain d'amidon n'a jamais été reproduite *in vitro*.

Plusieurs revues bibliographiques ont été consacrées à l'amidon et à ses propriétés (Duprat *et al.*, 1980 ; Whistler et Daniel, 1984 ; Blanchard, 1987 ; Galliard et Bowler, 1987 ; Zobel, 1988 ; Colonna et Buléon, 1992 ; Buléon *et al.*, 1998 ; Jane, 2006 ; Tester *et al.*, 2004 ; Buléon *et al.*, 2007). Les données présentées dans cette partie sont issues de ces revues et de publications spécifiques.

1.1.1. Morphologie des grains d'amidon

Les grains d'amidons extraits des plantes se présentent sous la forme d'une poudre blanche et sont caractérisés par leur forme, leurs dimensions, leur composition et le positionnement du hile, considéré comme le point de départ de la croissance des macromolécules.

Les amidons de tubercules sont généralement ellipsoïdaux et présentent un hile excentré. Les grains d'amidon de pomme de terre, par exemple, ont une forme ellipsoïdale et une taille de 15 à 100 μm (Figure I-1a). Les grains sont plus rarement sphériques ou hémisphériques tronqués. Les amidons de céréales possèdent des grains lenticulaires polyédriques (2-30 μm pour le blé). Les grains d'amidon de maïs standard et cireux sont également polyédriques. Ceux de maïs riche en amylose possèdent une forme allongée. Les amidons de légumineuses sont réniformes (pois lisse, 5-10 μm) ou en rosette (pois ridé, 30-40 μm) (Figure I-1b).

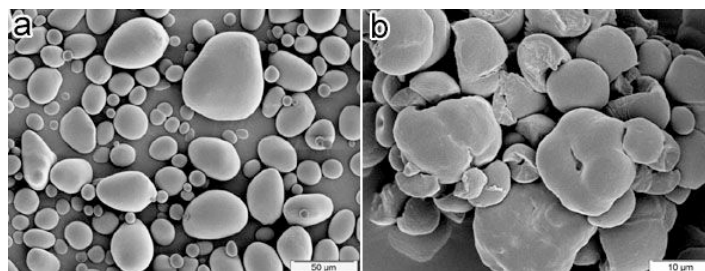


Figure I-1 : Images de MEB de grains natifs d'amidon de pomme de terre (a) et de pois ridé (b).

1.1.2. Organisation structurale de l'amidon natif

1.1.2.1. Structure moléculaire

L'analyse des produits de dégradation des grains d'amidon permet de déterminer sa nature chimique. L'hydrolyse acide totale conduit à un monosaccharide, le glucose (**de Saussure, 1814; Carothers, 1940**). Ce monomère est présent sous sa forme cyclique appelée α -D-glucopyranose (ou α -D-glucose, de formule $C_6H_{10}O_5$). Ce cycle adopte la conformation en chaise plus stable : les hydroxyles C2, C3, C4 et C6 sont en position équatoriale.

Les unités monomériques sont majoritairement liées par des liaisons $\alpha(1,4)$ (95-96 %) et, dans une moindre mesure, par des liaisons $\alpha(1,6)$ (4-5 %). La nature de la liaison chimique principale entre les monomères n'a été élucidée qu'en 1956, par l'équipe de **Charlson** qui a confirmé la proposition faite par **Hudson** en 1909.

Les premières études de fractionnement (**Mayer, 1952**) ont montré que l'amidon est composé de deux homopolymères de glucose : l'**amylose** et l'**amylopectine**. Un troisième composant glucidique, appelé matériel intermédiaire, est parfois observé. D'autres composants (protéines, lipides, minéraux) sont présents en faible proportion, variable d'un amidon à l'autre.

Les amidons dits "cireux" sont principalement constitués d'amylopectine et de seulement 0-8% d'amylose. Les amidons "standard" contiennent environ 75% d'amylopectine et 25% d'amylose. Les amidons riches en amylose contiennent de 40 à 70% d'amylose.

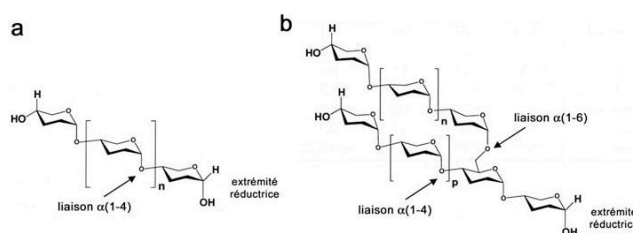


Figure I-2 : Schéma simplifié de la structure chimique de l'amylose (a) et de l'amylopectine (b).

a) L'amylose

L'amylose est un polymère essentiellement linéaire constitué d'unités glucose associées par des liaisons $\alpha(1,4)$ -D-glucosidiques. Les deux extrémités de la chaîne ont une fonctionnalité différente. En position C1, l'extrémité de la chaîne porte un groupement réducteur lié à une fonction hémiacétale de l'alcool secondaire terminal et en position C4 se trouve un résidu sans groupement réducteur (Figure I-2a).

Le degré de polymérisation (DP) de l'amylose peut atteindre 6000 unités glucosyles selon l'origine botanique. La masse moléculaire moyenne est de 10^5 - 10^6 g/mol. Quelques points de branchement de type $\alpha(1,6)$ peuvent être présents dans la molécule (**Hizukuri et al., 1997**). Le DP de l'amylose et le nombre de branches latérales (ce dernier restant toujours faible) varient beaucoup suivant son origine botanique (**Takeda et al., 1987**).

b) L'amylopectine

L'amylopectine est une macromolécule ramifiée formée par l'association de courtes chaînes de résidus D-glucose liés en $\alpha(1,4)$, connectés les uns aux autres par des ramifications $\alpha(1,6)$ (5-6 % des liaisons) (Figure I-2b). La masse moléculaire peut atteindre 10^7 - 10^8 g/mol selon l'origine botanique. L'amylopectine est généralement considérée comme la plus volumineuse des molécules biologiques.

L'amylopectine est constituée de trois types de chaînes. Les chaînes A, de $\overline{DP}$ 15-20, sont liées au reste de la molécule par leur extrémité réductrice. Les chaînes B, de $\overline{DP}$ 40-45, supportent les chaînes A, connectées par liaisons $\alpha(1,6)$, et sont liées au reste de la molécule par une extrémité réductrice. Ces chaînes forment l'ossature de la macromolécule et soutiennent les grappes formées par les chaînes A. Chaque chaîne B porte en moyenne 1,4 grappe constituée de 3,22 chaînes chacune. La distance entre deux grappes sur la même chaîne B est en moyenne de 22 résidus glucose. La chaîne centrale qui porte l'extrémité réductrice de la macromolécule est dite chaîne C. Elle contient plus de 60 résidus glucose.

Les molécules d'amylopectine de diverses origines botaniques diffèrent essentiellement par le rapport de nombre de chaînes de type A sur le nombre de chaînes de type B. Généralement le rapport A/B est de 5-6 pour les amidons de tubercules et de 8-10 pour les céréales. De nombreux travaux ont porté sur la détermination de la distribution en longueur des chaînes constituant l'amylopectine en fonction de l'origine botanique (**Hizukuri, 1985, 1986 ; Kiozumi et al., 1991 ; Bertoft, 1991 ; Hanashiro et al., 1996 ; Koch et al., 1998 ; Bertoft, 2004 ; Vermeulen et al., 2004**). Les points de branchement ne sont pas distribués de

manière aléatoire (O'Sullivan et Pérez, 1999 ; Thompson, 2000 ; Gérard *et al.*, 2000). Leur densité et leur distance sur la chaîne seraient des facteurs déterminants pour le développement du type cristallin et de la cristallinité des grains d'amidon.

La structure de l'amylopectine a été étudiée en combinant l'action de différentes enzymes pour dégrader sélectivement les liaisons glycosidiques et en analysant les différentes fractions obtenues par chromatographie d'exclusion stérique (Mercier, 1973 ; Robin *et al.*, 1974 ; Hall et Manners, 1980 ; Colonna *et al.*, 1981). Plusieurs modèles ont ainsi été proposés et celui qui est actuellement le plus couramment accepté est le modèle en grappe établi par Kainuma et French (1972), revu par Robin *et al.* (1975) et Hizukuri (1986) (Figure I-3).

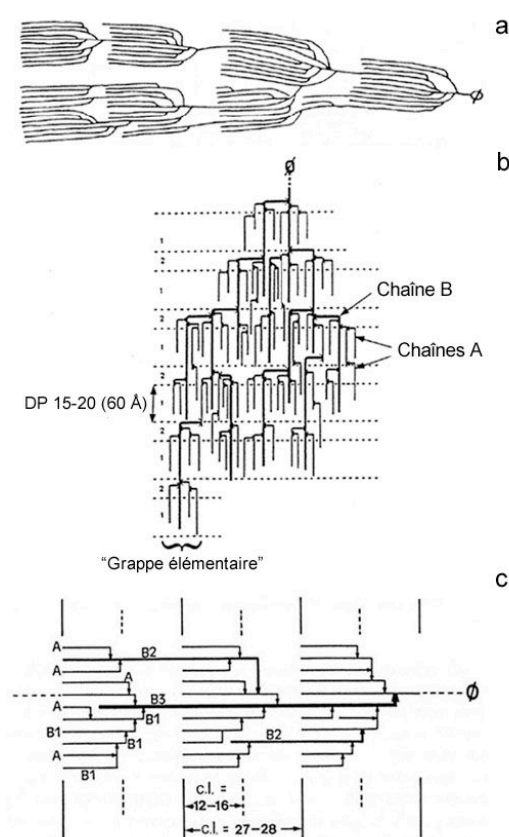


Figure I-3 : Modèles de structure en grappe proposés par a) French (1972), b) Robin *et al.* (1975), c) Hizukuri (1986).

Un nouveau modèle a récemment été proposé dans lequel les grappes sont reliées par un squelette de chaînes de $\overline{DP} > 60$ dans un modèle bidirectionnel, où les grappes ont une direction perpendiculaire à celle des longues chaînes d'amylopectine, qui forment, avec l'amylose, la partie amorphe de la structure du grain (Bertoft, 2004).

c) Autres composants

Un troisième composant glucidique de structure intermédiaire entre celles de l'amylose et l'amylopectine a été mis en évidence par différents auteurs (**Banks et Greenwood, 1975**). Les espèces à teneur en amylose normale en contiennent de faibles quantités et il est plus abondant dans les amidons riches en amylose. Ce composant correspondrait à une forme imparfaite d'amylopectine, créée par le dysfonctionnement des mécanismes de biosynthèse.

Des protéines, des lipides, des substances minérales et d'autres composants de la paroi cellulaire des plantes peuvent être extraits de l'amidon. La masse totale de ces fractions mineures n'excède pas 1%. Ces composants peuvent être localisés à l'extérieur du grain (lipides externes), sur sa surface (fraction azotée) ou à l'intérieur du grain (lipides internes et matières minérales).

1.1.2.2. Organisation supramoléculaire

En lumière polarisée, le grain d'amidon s'illumine et présente une croix de Malte, centrée au niveau du hile, ce qui a conduit à comparer ces grains à des sphérocristaux distordus. Placé entre polariseurs croisés avec une lame de retardement à 45°, le grain d'amidon présente une biréfringence positive ce qui indique, en théorie, une orientation radiale de l'axe principal des cristallites (**French, 1972 ; Blanshard *et al.*, 1987**). Ceci a permis de proposer que les cristaux soient disposés à l'intérieur du grain avec l'axe des chaînes perpendiculaire aux surfaces de croissance (Figure I-4).

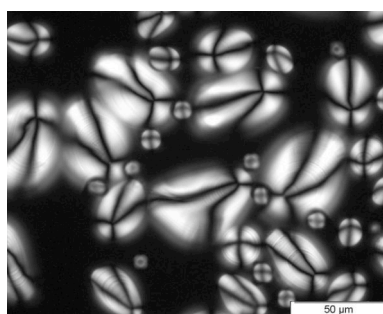


Figure I-4 : Grains d'amidon de pomme de terre observés par microscopie optique en lumière polarisée.

L'ultrastructure du grain a été étudiée le plus souvent après hydrolyse acide, enzymatique ou après oxydation périodique (**Gallant, 1974 ; Robin *et al.*, 1974 ; Yamaguchi *et al.*, 1979 ; Oostergetel et Van Bruggen, 1993 ; Smith, 1999 ; Gallant *et al.*, 1997**). Une organisation de type "oignon", formée de couches concentriques alternativement amorphes et

semi-cristallines, a été mise en évidence par microscopie électronique de grains partiellement hydrolysés (**Gallant et Guilbot, 1969** ; **Kassenbeck, 1978** ; **Yamaguchi *et al.*, 1979**, **Oostergetel et van Bruggen, 1989**). Ces couches d'épaisseur variant de 120 à 400 nm correspondraient aux anneaux de croissance du grain (**Gallant *et al.*, 1992**) (Figure I-5).

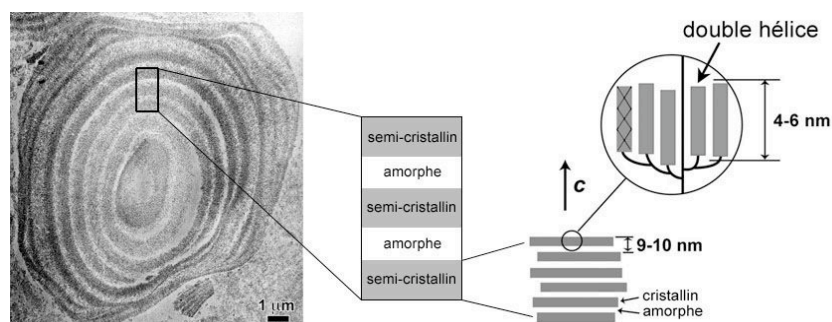


Figure I-5 : A gauche : image MET d'une coupe de grain d'amidon de maïs montrant des anneaux de croissance ; à droite : schéma simplifié de l'organisation en "oignon", formée de couches concentriques alternativement amorphes et semi-cristallines, et de la structure lamellaire interne (de **Buléon *et al.*, 2007**).

Il a été montré que les anneaux semi-cristallins ont eux-mêmes une organisation lamellaire interne (**Yamaguchi *et al.*, 1979**) (Figure I-5). Il s'agit d'une superposition de couches amorphes et cristallines formant des lamelles tangentes aux anneaux de croissance et d'une épaisseur de plusieurs centaines d'angströms. La distance de répétition des lamelles a été déterminée par diffraction des rayons X aux petits angles et évaluée à 9-10 nm (**French, 1984** ; **Blanchard, 1987** ; **Oostergetel et Van Bruggen, 1989** ; **Jenkins *et al.*, 1993** ; **Cameron *et al.*, 1993** ; **Jenkins et Donald, 1995** ; **Donald *et al.*, 2001**). Cette épaisseur (somme des épaisseurs d'une lamelle amorphe et d'une lamelle cristalline) semble être une caractéristique universelle des grains d'amidon quelle que soit leur origine botanique (**Jenkins *et al.*, 1993**).

Selon le modèle proposé par **French (1984)**, l'amylopectine possède une organisation en grappes ce qui lui confère une structure lamellaire : les courtes chaînes linéaires sont associées dans des lamelles cristallines tandis que les points de branchement sont regroupés dans des lamelles amorphes. Selon l'origine de l'amidon, les points de branchements peuvent être partiellement localisés dans les lamelles cristallines (**Jane *et al.*, 1997**).

Sur la base d'images de microscopie électronique à transmission (MET) de fragments de grains d'amidon de pomme de terre hydrolysés, **Oostergetel et van Bruggen (1993)** ont proposé que les domaines semi-cristallins forment un réseau de super-hélices gauches, d'un

diamètre de 18 nm et avec un pas de 10 nm. Ce modèle a été affiné par **Waigh *et al.* (1997, 1998)** à partir de données de microdiffraction des rayons X enregistrées sur grains uniques mais n'a cependant jamais été transposé à d'autres sources d'amidon. Le modèle peut se baser sur le modèle unidirectionnel de **Hizukuri (1986)**, avec les grappes et les longues chaînes d'amylopectine parallèles, et sur le modèle bidirectionnel de **Bertoft (2004)**, avec les domaines semi-cristallins perpendiculaires au squelette amorphe, constitué d'une molécule d'amylopectine.

Plus récemment, **Gallant *et al.* (1997)** ont proposé un modèle selon lequel les lamelles seraient organisées au sein de blocs sphériques (microgranules ou "*blocklets*") ayant un volume qui correspond à une ou plusieurs macromolécules et de diamètre variant de 20 à 500 nm selon l'origine botanique et leur localisation dans le grain.

Les courtes chaînes d'amylopectine auraient un DP suffisant pour former des doubles hélices, elles-mêmes seraient associées parallèlement au sein des lamelles cristallines, les lamelles amorphes contenant les points de branchement (**Robin *et al.*, 1975 ; Umeki et Kainuma, 1981 ; French, 1984 ; Oostergetel et Van Bruggen, 1989 ; Jenkins *et al.*, 1993**).

Des résultats récents ont permis de préciser les dimensions latérales de la partie cristalline de ces édifices lamellaires (**Putaux *et al.*, 2003**). Après deux semaines d'hydrolyse acide (2,2 N HCl à 35°C), les grains d'amidon de maïs cireux observés par MET montrent des fragments compacts ayant une structure lamellaire (Figures I-6a et I-6b). Ces lamelles, d'environ 5-7 nm d'épaisseur, sont parallèles au faisceau.

Le résidu insoluble de l'hydrolyse après 36 jours est constitué d'objets polygonaux, de 20-30 nm de longueur et 12-15 de largeur, avec des angles marqués d'environ 60-65° qui correspondraient aux lamelles cristallines élémentaires vues à plat (Figure I-6c).

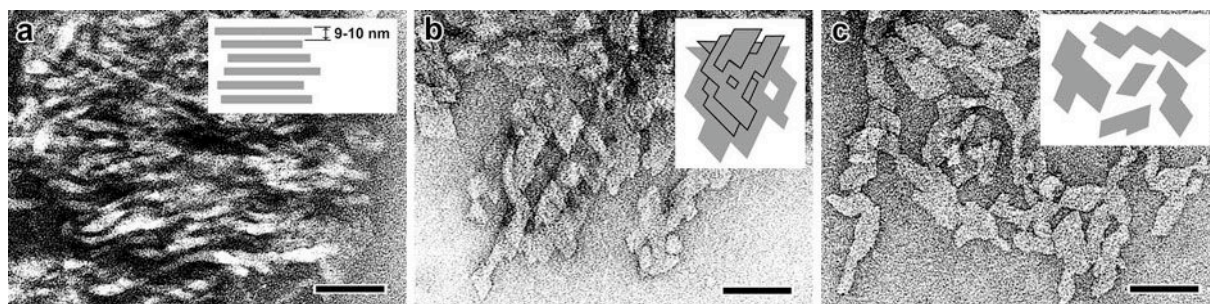


Figure I-6 : Images de MET après coloration négative des lamelles cristallines obtenues par d'hydrolyse acide de grains d'amidon de maïs cireux. Lamelles parallèles au faisceau d'électrons (a) et vues à plat (b) après deux semaines d'hydrolyse et lamelles cristallines élémentaires vues à plat après 36 jours d'hydrolyse (barre d'échelle : 50 nm) (d'après **Putaux *et al.*, 2003**).

L'analyse des chaînes constituant les résidus d'hydrolyse acide à l'aide d'enzymes spécifiques des liaisons $\alpha(1,4)$ et/ou $\alpha(1,6)$ par chromatographie d'exclusion stérique met en évidence deux populations de DP respectivement voisin de 13 et 25 (**Robin et al., 1975**). La première population correspondrait à des chaînes linéaires, et la deuxième à deux chaînes monoramifiées de longueur identique branchées près de l'extrémité réductrice.

1.1.2.3. Structure cristalline

Selon l'origine botanique, les amidons natifs peuvent être classés en deux groupes principaux en fonction de leur type de diagramme de diffraction des rayons X (Figure I-7). De manière schématique, le type A correspond aux amidons de céréales et le type B aux amidons de tubercules ou riches en amylose (**Buléon et al., 1998**). Les amidons de légumineuses donnent un diagramme de diffraction de type C qui a été interprété comme correspondant à un mélange des deux types cristallins A et B. Le diagramme de certains amidons peut présenter des réflexions additionnelles correspondant au type V attribué à la formation partielle de complexes entre l'amylose et les lipides présents dans certains amidons natifs lors du séchage appliqué pendant l'extraction (**Buléon et al., 1998**).

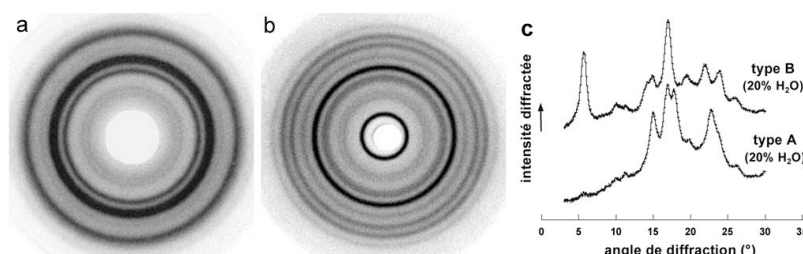


Figure I-7 : Diagrammes de diffraction des rayons X typiques de poudres d'amidon natif de type A (a) et type B (b). c) Profils correspondant aux deux types (d'après **Buléon et al., 2007**).

Le taux d'hydratation est un paramètre majeur dans l'expression de la cristallinité du grain d'amidon (**Buléon et al., 1982**). Les taux d'adsorption en eau dépendent de l'origine botanique, du génotype et du degré d'organisation des grains (**Buléon et al., 1987**). A 100% d'humidité relative, un grain d'amidon absorbe de 30 à 55% d'eau en phase vapeur. Les amidons de type A absorbent moins d'eau que celui de pomme de terre (type B) ou de pois ridé. L'intensité des pics de diffraction des rayons X augmente avec la teneur en eau des grains. Ces résultats s'expliquent par un alignement des cristallites induit par l'expansion de la phase amorphe intercristalline ayant absorbé de l'eau et par la saturation en eau de la maille cristalline, nécessaire pour l'alignement optimal des doubles hélices (**Buléon et al., 1998**).

La cristallinité varie de 15 à 45% et dépend de l'origine botanique de l'amidon, de son taux d'hydratation et de la méthode d'analyse (**Buléon *et al.*, 1982 ; Buléon *et al.*, 1987 ; Zobel, 1988 ; Gernat *et al.*, 1993 ; Lemke *et al.*, 2004**).

La faible taille des cristallites, leurs imperfections et leur orientation multiple à l'intérieur du grain rend l'interprétation des diagrammes de diffraction des amidons natifs très délicate. L'utilisation de cristallites préparés *de novo* à partir d'amylose, en tant que substrats modèles (**Buléon *et al.*, 1984 ; Imberty *et al.*, 1988**) a permis des progrès considérables dans l'interprétation des données cristallographiques. L'amylose peut être cristallisée à partir de solutions par refroidissement ou par addition d'un précipitant. Les morphologies résultantes (agrégats, précipités, gels, cristaux, sphérolites, etc.) et les allomorphes obtenus dépendent de plusieurs facteurs tels que la nature du solvant, le DP, la concentration, la température ou la présence éventuelle de points de branchements. Les structures déduites à partir de cristaux modèles d'amylose de types A et B ont été utilisées pour décrire les régions cristallines des grains d'amidon qui génèrent des diagrammes de diffraction similaires mais moins résolus.

Il a été démontré que, quel que soit le type cristallin A ou B, les chaînes linéaires d' α -glucanes s'organisent en doubles hélices comportant 2 $\times$ 6 unités glycosyl par tour (Figure I-8) avec un pas de 2,13 et 2,08 nm, respectivement, pour le type A et le type B (**Imberty et Pérez, 1988 ; Imberty *et al.*, 1988 ; Imberty *et al.*, 1991**).



Figure I-8 : Modèle de la double hélice d'amylose (**Zobel, 1988**).

Des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogène stabilisent la structure (**Wu et Sarko, 1977 ; 1978a, 1978b ; Zobel, 1988 ; Imberty *et al.*, 1987 ; Imberty et Pérez, 1988a ; Imberty *et al.*, 1988b ; Imberty *et al.*, 1991 ; Buléon *et al.*, 1998b**).

La différence entre les deux allomorphes A et B réside dans la maille cristalline et dans la quantité d'eau présente entre les doubles hélices. L'allomorphe A est organisé suivant une maille monoclinique ($a=2,124$ nm, $b=1,172$ nm, $c=1,069$ nm et $\gamma=123,5^\circ$), chaque maille comportant 12 unités glucose. Chaque double hélice a six voisines. La structure est peu hydratée et contient seulement quatre molécules d'eau par maille (**Imberty *et al.*, 1988**). Le type B se caractérise par une maille hexagonale ($a=b=1,85$ nm, $c=1,04$ nm et $\gamma=120^\circ$). Chaque double hélice possède trois voisines en laissant une cavité centrale qui contient des molécules d'eau. La quantité d'eau est estimée à 36 molécules par maille pour une hydratation de 27%. A cette hydratation, les molécules sont peu mobiles et font partie de la structure cristalline (**Imberty et Pérez, 1988**). La symétrie des doubles hélices est différente dans le type A et le B, l'unité répétitive est un maltotriose pour la structure A et un maltose pour la forme B (**Gidley et Bociek, 1985 ; Hewitt *et al.*, 1986 ; Paris *et al.*, 1999**). La Figure I-9 présente les modèles cristallins des types A et B.

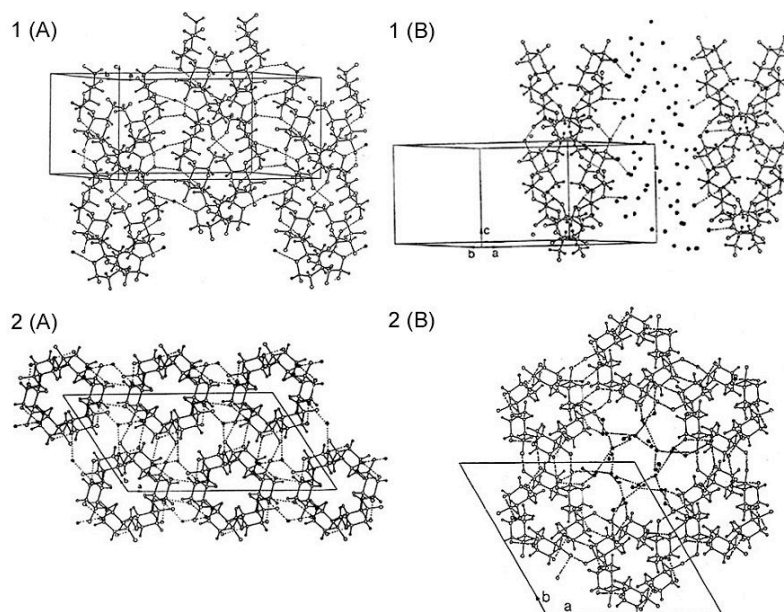


Figure I-9 : Arrangement cristallin des type A et B (**Imberty *et al.*, 1988a, 1988b, 1991**) ; 1) représentation de l'arrangement tridimensionnel selon l'axe de fibre, 2) projection de la structure dans le plan (a,b) perpendiculaire à l'axe des doubles hélices. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés, les molécules d'eau par des ronds noirs.

Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux peuvent influencer la structure du grain d'amidon. La structure fine de l'amylopectine et la teneur en amylose, contrôlées génétiquement, jouent un rôle important dans l'expression du type polymorphique. Les

chaînes d'amylose et/ou les parties linéaires de l'amylopectine, où les grappes sont composées de plusieurs courtes chaînes et où la distance entre deux points de branchement successifs est petite, cristallisent selon le type A. Quand les grappes contiennent des doubles hélices en moins grand nombre mais plus longues et que la distance entre deux liaisons $\alpha(1,6)$ est grande, les structures cristallisent selon le type B (**Hizukuri *et al.*, 1983 ; Hizukuri, 1985 ; Hizukuri, 1986 ; Cheetham et Tao, 1998 ; Gérard *et al.*, 2000**)

Le type polymorphique dépend aussi du rapport amylose/amylopectine. Les amidons de maïs mutant d'une même espèce sont de type A lorsque riches en amylopectine et de type B lorsque riches en amylose (**Cheetham et Tao, 1998 ; Gérard *et al.*, 2001**).

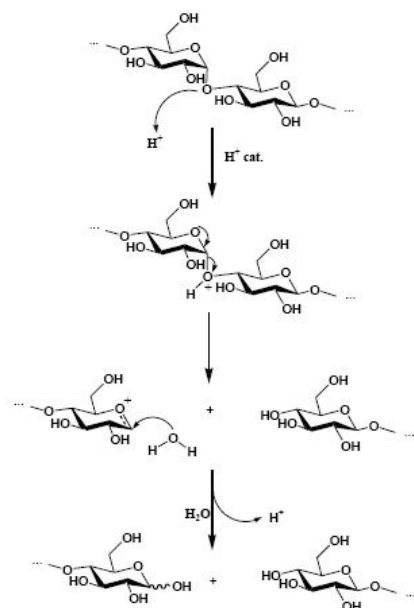
Les conditions environnementales, telles que la température et l'activité de l'eau dans le milieu de synthèse lors de la croissance de la plante ont aussi sûrement une influence. La température et l'humidité peuvent influencer l'activité enzymatique de biosynthèse. Un milieu chaud et sec comporte une organisation de type A. Dans les milieux froids et humides, on trouve des chaînes plus longues et une structure de type B. Tous ces facteurs génétiques ou environnementaux sont interconnectés et leur hiérarchisation est difficile.

1.2. Hydrolyse des grains d'amidon

1.2.1. Hydrolyse acide

L'hydrolyse de l'amidon par un acide, chlorhydrique (HCl) ou sulfurique (H₂SO₄), permet de d'obtenir des résidus insolubles cristallins (**Nägeli, 1874 ; Lintner, 1886 ; Robin *et al.*, 1975 ; Robin, 1976**). Les résidus d'hydrolyse sont respectivement appelés "lintners" (avec HCl) et dextrines de Nægeli (avec H₂SO₄). L'hydrolyse est réalisée en milieu aqueux avec HCl 2,2 N (**Lintner, 1886**), ou avec H₂SO₄ 3 M (**Nägeli, 1874**) à 35°C durant une trentaine de jours. Plus récemment, Angellier *et al.* (**2004**) ont préparé des suspensions aqueuses de nanocristaux d'amidon par hydrolyse H₂SO₄ 3,16 M pendant 5 jours à 40°C (sous agitation mécanique contrôlée et concentration initiale d'amidon 14,7 % p/v) ayant la même morphologie que les nanocristaux obtenus après traitement dans HCl pendant 40 jours.

L'acide catalyse la rupture de la liaison hémiacétal $\alpha(1,4)$, la liaison glycosidique est en effet plus accessible que celles qui constituent le cycle glucose. Un acétal protoné apparaît d'abord sur la liaison glycosidique. Sa rupture conduit ensuite à la formation d'un alcool secondaire en C4 et d'un ion oxycarbonium en C1. Cet ion est instable et libère son proton par hydratation ce qui conduit à la création d'une nouvelle extrémité réductrice (Figure I-10). La liaison $\alpha(1,6)$ est hydrolysée de la même façon.

Figure I-10 : Hydrolyse acide de la liaison $\alpha(1,4)$.

Le traitement d'hydrolyse appliqué directement à l'amidon granulaire est limité par l'hétérogénéité structurale du grain. Les cinétiques d'hydrolyse révèlent, quelle que soit l'origine de l'amidon, l'existence de deux phases principales : une première phase d'hydrolyse rapide, durant les 8-10 premiers jours, et une seconde où l'hydrolyse s'effectue lentement en tendant vers un palier à partir du dixième jour. Ces deux phases reflètent l'existence des deux types principaux d'organisation structurale, différemment susceptibles à l'hydrolyse acide. La première phase est associée à la fraction amorphe et la seconde à la fraction cristalline (**Kainuma et French, 1971 ; Robin, 1976 ; Biliaderis *et al.*, 1981 ; Putaux *et al.*, 2003**). L'indice de cristallinité relative, calculé à partir des spectres de diffraction des rayons X, augmente avec l'avancement de l'hydrolyse, rapidement dans un premier temps et plus lentement à partir du cinquième jour (**Muhr *et al.*, 1984**).

Les chaînes A et B formant des grappes élémentaires peuvent constituer des zones cristallines acido-résistantes. L'hydrolyse acide attaque préférentiellement les zones amorphes du grain natif puis, progressivement, les parties cristallines. Le DP des chaînes constitutives des cristallites est invariable en fonction du temps d'hydrolyse, ce qui peut être expliqué par l'absence de dégradation de ces zones pendant la linnérisation. Les zones inter-cristallites contiennent la majorité des liaisons de ramification $\alpha(1,6)$ et sont plus susceptibles à l'hydrolyse (**Robin *et al.*, 1974 ; Robin *et al.*, 1975 ; Robin, 1976 ; Jenkins et Donald, 1995 ; Jane *et al.*, 1997**).

Robin (1976) a montré que les cinétiques d'hydrolyse au sein de chaque phase ne sont pas les mêmes selon l'origine botanique des amidons. Le type cristallin semble également influencer l'hydrolyse. Pour **Jane et al. (1997)**, dans le cas des amidons de type B, les points de branchements localisés dans la fraction amorphe favoriseraient la dégradation par hydrolyse acide, hypothèse en contradiction avec les résultats de **Robin et al. (1975)** et de **Gérard et al. (2002)** selon lesquels le type B serait au contraire moins sensible à l'hydrolyse acide que les amidons de type A à même teneur en amylose.

Si la variation du logarithme décimal du rapport $100/(100-\% \text{ amidon hydrolysé})$ est exprimée en fonction du temps, l'hydrolyse du grain peut être décrite par deux cinétiques du premier ordre. L'extrapolation à temps zéro de la deuxième phase permet d'obtenir le pourcentage d'amidon facilement hydrolysable (**Robin et al., 1974, 1975 ; Colonna et al., 1982**). La proportion de fraction facilement hydrolysable d'un grain d'amidon par l'acide diminuerait quand la teneur en amylose augmente (Figure I-11).

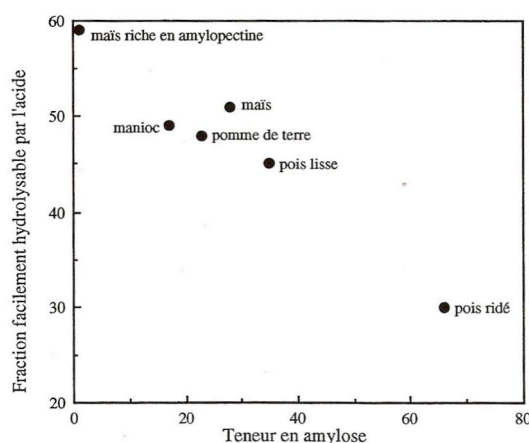


Figure I-11 : Représentation du pourcentage d'amidon facilement hydrolysable en fonction de la teneur en amylose de différents amidons (d'après **Planchot, 1993**).

Ceci a été démontré par **Colonna et al. (1982)** sur le pois ridé et **Robin et al. (1975, 1976)** sur le maïs. Dans le cas du maïs cireux, la cristallinité diminue au cours de l'hydrolyse. Les zones cristallines seraient donc attaquées plus rapidement. Pour les autres amidons, la cristallinité relative augmente car l'hydrolyse attaque préférentiellement les zones amorphes (**Jenkins et Donald, 1997 ; Jayakody et Hoover, 2002**). Cependant, **Gérard et al. (2002)** ont montré que ni le taux de cristallinité, ni le taux d'amylose n'auraient d'influence sur la sensibilité à l'hydrolyse acide.

Après hydrolyse acide ménagée (HCl 2,2 N, 35°C) de grains d'amidon pendant 40 jours, une fraction solide résistante est recueillie. Ce matériel, différent selon l'origine botanique de

l'amidon, est identifié par chromatographie de perméation sur gel comme constitué de 2 populations de chaînes : une fraction monoramifiée (DP 25) près de l'extrémité réductrice et une fraction linéaire (DP 15) (Figure I-12) (**Robin et al., 1975 ; Duprat et al., 1980**).

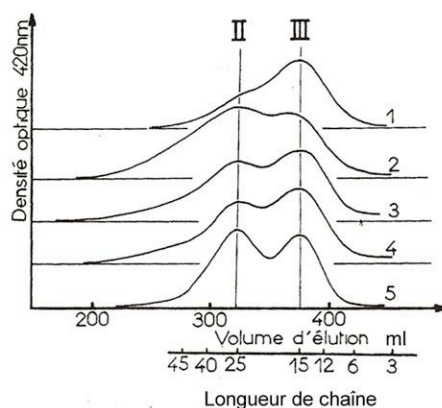


Figure I-12 : Chromatogrammes d'élution des résidus acido-résistants après 40 jours d'hydrolyse de différents amidons : 1) pomme de terre ; 2) blé ; 3) manioc ; 4) maïs standard ; 5) maïs cireux (**Duprat et al., 1980**).

Les travaux de **Colonna et al. (1982)** sur l'amidon de pois ridé ont montré que la fraction facilement hydrolysée pendant la linnérisation est plus faible que pour les autres types d'amidon. La faible cristallinité initiale de cet amidon ou de ceux riches en amylose, et le faible degré d'hydrolyse, entraînent une très forte augmentation de cristallinité pendant la linnérisation. Il y aurait une recristallisation au cours de l'hydrolyse par rupture de contraintes, peut être liées à la présence de l'amylose dans les cristaux. (**Colonna et al., 1982 ; Buléon et al., 1987**). La vitesse de dégradation de la phase plus organisée amène la fraction totale hydrolysée à 43% après 42 jours. Le résidu d'hydrolyse présente une grande cristallinité de type B. La majorité du résidu (97 %) est constituée d'une seule population de chaînes linéaires de DP d'environ 25, comme démontré par l'absence de déramification lors de l'action de la pullulanase (**Colonna et al., 1982**). Le diagramme d'élution de chromatographie d'exclusion stérique, après β -amylolyse de la fraction linnérisée, révèle la présence d'une petite quantité de produit (4,1%) correspondant à des β -dextrines limites.

La structure de l'amylopectine de pois ridé est très différente de celle de la pomme de terre, pour laquelle l'hydrolyse conduit à deux populations, une linéaire de DP moyen 15 et une fraction monoramifiée de DP 25 (**Robin et al., 1975**). Dans l'amidon de pomme de terre, le pourcentage de chaînes linéaires augmente avec l'hydrolyse, alors que la seconde population est préférentiellement hydrolysée.

Il existerait une relation inverse entre la quantité d'amylose à l'intérieur du grain et la résistance à l'hydrolyse pendant la deuxième phase. Cette relation dépend du type cristallin ainsi que de la forme et de la taille des cristallites. Les amidons de pois ridé et de pomme de terre qui possèdent le même type cristallin, présentent cependant une résistance différente à l'hydrolyse, ce qui suggère que la taille des cristallites soit responsable des différences dans les vitesses d'hydrolyse (**Colonna et al., 1982**). **Robin et al. (1974)** ont montré que dans l'amidon de pomme de terre, l'amylose est rapidement dégradée pendant la première phase d'hydrolyse. Il n'y a aucune évidence de sa contribution à l'organisation des cristallites. Les grappes d'amylopectine imposeraient la taille des cristallites.

1.2.2. Hydrolyse enzymatique

Des nombreuses enzymes dégradent l'amidon. Les enzymes amylolytiques catalysent spécifiquement l'hydrolyse des liaisons glycosidiques $\alpha(1,4)$ et $\alpha(1,6)$. La description de l'hydrolyse enzymatique se limitera à la technique industrielle de dextrinisation dont les produits ont été utilisés dans cette étude. La dextrinisation correspond à la libération de dextrans par l'action d'une α -amylase sur de l'amidon gélatinisé. Cette endo-enzyme (attaque interne de la chaîne du polymère de glucose) hydrolyse au hasard les liaisons $\alpha(1,4)$ des macromolécules telles que l'amidon et ses produits de dégradation jusqu'au stade d'oligosaccharides.

La préparation de maltodextrines avec un DP défini est réalisée en ajustant les conditions de réaction (température, temps, concentrations du substrat et de l'enzyme). Des maltooligosaccharides et toutes les α -dextrans limites possédant une liaison $\alpha(1,6)$ de l'amylopectine sont obtenus par α -amylolyse de l'amylopectine. En effet, les α -amylases ne peuvent pas hydrolyser la liaison $\alpha(1,6)$.

Pour une réaction d'hydrolyse totale, dans le cas de l'amylose, les produits finaux sont du maltose et du maltotriose (**Jane et Robyt, 1984 ; MacGregor et MacGregor, 1985 ; Mazur et Nakatani, 1993 ; Kandra et al., 1997**) qui peuvent inhiber l'action de l'enzyme. Dans le cas de l'amylopectine l'enzyme libère du maltose, du maltotriose et des α -dextrans limites.

Les produits de dégradation sont caractérisés par le nombre de dextrose équivalent (DE) qui correspond au nombre de groupements réducteurs dans l'équivalent de 100 unités glucose de l'échantillon. Le DE du glucose est égal à 100. Pour une hydrolyse d'amidon, un DE de 0 représenterait l'amidon lui-même, un DE de 100 représenterait du glucose pur, soit un amidon totalement transformé. Lorsque le DE est compris entre 3 et 20, on utilise le terme "maltodextrine" ; lorsque le DE est supérieur à 20, on parle de "sirop de glucose".

1.3. Amylose synthétique

A cause des nombreuses étapes de protection et de déprotection des groupements hydroxyles, la chimie des carbohydrates est difficile et de faible rendement. Une des alternatives est la synthèse par voie enzymatique ou chimio-enzymatique. Les enzymes peuvent catalyser des réactions fortement stéréo- et régio-sélectives et peuvent offrir des conditions douces de synthèse sans étape de protection des hydroxyles.

1.3.1. Enzymes

Une enzyme est une protéine jouant le rôle de catalyseur biologique et permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire. La différence entre ces biocatalyseurs et les catalyseurs chimiques standard est leur extrême spécificité pour un substrat donné, grâce à la topologie de leur site actif qui interagit avec les molécules de manière stéréospécifique. La vitesse de réaction enzymatique est mesurée à partir de la quantité de produit formé ou de substrat disparu par unité de temps. L'activité de l'enzyme peut être inhibée par d'autres molécules présentes dans le milieu de réaction.

Tableau I-1: Différentes enzymes synthétisant l'amylose (**Yanase *et al.*, 2007**).

Enzyme	Nombre EC	Substrat
amidon-synthase	(EC 2.4.1.21)	UDP-glucose
α -glucanes phosphorylase	(EC 2.4.1.1)	glucose 1-phosphate
amylosaccharase	(EC 2.4.1.4)	saccharose
pullulanase	(EC 3.2.1.41)	amidon
isoamylase	(EC 3.2.1.68)	
cyclodextrine glycosyltransferase	(EC 2.4.1.19)	cyclodextrine
α -1,6-glucosidase	(3.2.1.33)	glycogene
enzyme disproportionnante	EC 2.4.1.25	α -1,4-glucanes

Plusieurs enzymes peuvent être utilisées pour la production d'amylose (Tableau I-1) (**Yanase *et al.*, 2007**). Les amidon- (ou glycogène-) synthases, les α -glucane-phosphorylases et les amylosaccharases catalysent une réaction de polymérisation d'unités glucosyles, à partir d'un substrat donneur. Les pullulanases, les isoamylases, les amylo-(1,6)-glucosidases et les CGTases, quant à elles, sont impliquées dans l'hydrolyse de liaisons glucosidiques de l'amidon. Enfin, les enzymes disproportionnantes transfèrent un segment d'un α -1,4-glucane

sur une molécules acceptrice (glucose ou un autre $\alpha(1,4)$ -glucane). Au cours de cette étude, nous avons utilisé des fractions d'amylose de faible DP synthétisées *in vitro* par deux enzymes : l'amylosaccharase et la phosphorylase.

1.3.1.1. L'amylosaccharase

Les amylosaccharases sont des transglucosidases (E.C. 2.4.1.4) qui utilisent le saccharose comme donneur d'unités D-glucopyranosyl pour former un polymère d'unités glucosyles liées par des liaisons osidiques $\alpha(1,4)$ (**Potocki et al., 2000**), en libérant du fructose (Figure I-13). Les amylosaccharases puisent l'énergie nécessaire à la synthèse des liaisons osidiques dans la rupture de la liaison osidique du saccharose. Ceci les différencie de la plupart des enzymes bactériennes de synthèse d'amylopolysaccharides qui nécessitent un substrat activé (ADP-ou UDP-glucose) ou du glucose 1-phosphate pour transférer l'unité glucose vers l'extrémité non-réductrice d'un amorceur $\alpha(1,4)$. De plus, lorsqu'une molécule exogène de structure compatible avec le site actif de l'enzyme (comme le maltose par exemple) est ajoutée au milieu réactionnel, les amylosaccharases catalysent le transfert des unités glucosyles provenant du saccharose sur cette molécule acceptrice. Cette réaction (appelée 'réaction d'accepteur') est catalysée au détriment de la synthèse du polymère de type amylose.

Les amylosaccharases appartiennent à la famille 13 des glycoside-hydrolases, qui contient majoritairement des enzymes amylolytiques comme les α -amylases. Au sein de cette famille, les amylosaccharases sont les seules polymérases (**Potocki et al., 1999 ; Skov et al., 2001**). Sur les 17 amylosaccharases putatives présentes dans les banques de séquences, seules trois ont été clonées et caractérisées, toutes par l'équipe de Catalyse et Ingénierie Moléculaire Enzymatiques du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (INSA-INRA-CNRS, Toulouse). Deux d'entre elles, issues de *Neisseria polysaccharea* (**Potocki et al., 1999**) et de *Deinococcus radiodurans* (**Pizzut-Serin et al., 2004**), catalysent la synthèse de l'amylose à 30°C, celle de *Deinococcus geothermalis* étant une enzyme thermostable travaillant à 50°C (**Emond et al., 2008**). L'amylosaccharase de *N. polysaccharea* est la mieux connue à ce jour. Sa structure tridimensionnelle a été résolue en 2001, et son mécanisme catalytique élucidé, d'un point de vue moléculaire (**Albenne et al., 2002**) et cinétique (**Potocki et al., 2000 ; Potocki-Veronese et al., 2005**).

Le mécanisme catalytique de l'ASNp comprend les étapes suivantes, pour chaque molécule de saccharose consommée (Figure I-14) :

- Coupure de la liaison covalente entre le glucose et le fructose ;
- Formation d'un intermédiaire covalent glucosyle-enzyme ;
- Libération d'une molécule de fructose ;
- Transfert de l'unité glucosyle sur une molécule acceptrice présente dans le milieu réactionnel. En début de réaction, le transfert s'effectue sur l'eau (réaction d'hydrolyse) pour former du glucose libre. Celui-ci est alors utilisé comme accepteur pour produire du maltose, qui est à son tour utilisé comme accepteur pour former du maltotriose. Ces réactions successives de glucosylation de maltooligosaccharides se poursuivent jusqu'à l'obtention du polymère de type amylose, qui précipite dans le milieu réactionnel lorsqu'il atteint un degré de polymérisation et une concentration critiques. Deux autres réactions minoritaires ont lieu par transfert de l'unité glucosyle sur le fructose co-libéré dans le milieu. Ces réactions d'isomérisation du saccharose donnent lieu à la production de turanose et de trehalulose (Potocki *et al.*, 2000, Albenne *et al.*, 2004).
- Eventuellement, transfert du résidu glucosyle sur le groupement hydroxyle d'une molécule exogène (glucosidique ou non) présente dans le milieu réactionnel par réaction d'accepteur libérant la molécule glucosylée.

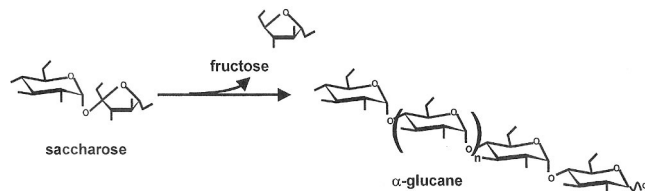


Figure I-13 : Schéma de la réaction catalysée par l'amylosaccharase.

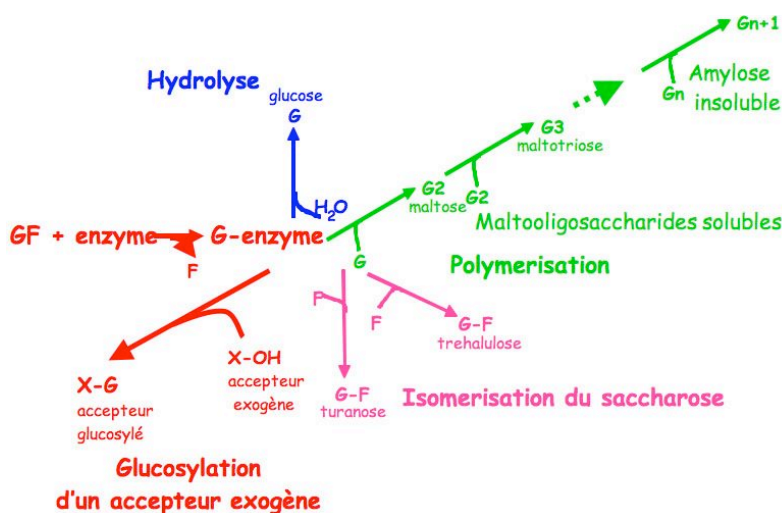


Figure I-14 : Schéma récapitulant les réactions catalysées par l'amylosaccharase de *N. polysaccharea*.

Le polymère insoluble synthétisé par l'amylosaccharase a été caractérisé par chromatographie liquide haute performance (CLHP) d'exclusion de taille, chromatographie haute performance d'échange d'anions à détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD), complexation de l'iode (qui renseigne sur le DP moyen de l'amylose) et RMN du ^{13}C . Les déplacements chimiques des signaux présents dans le spectre correspondent à ceux référencés par **Bock *et al.* (1989)**. Aucun signal caractéristique d'un C6 lié en $\alpha(1,6)$ n'apparaît autour de 66,6 ppm (**Bock *et al.*, 1989**). Les très faibles signaux témoigneraient d'une contamination par de petites molécules, dont le fructose, qui seraient entraînées avec le polymère lors de sa précipitation à l'éthanol (Figure I-15). De plus, une analyse chromatographique par HPAEC-PAD après hydrolyse par l'isoamylase a aussi montré que le polysaccharide ne contient aucune liaison $\alpha(1,6)$. Le polymère formé à partir de saccharose est donc constitué d'unités glucosyles exclusivement liées par des liaisons $\alpha(1,4)$ (**Potocki *et al.*, 2000**), dont la taille moyenne varie en fonction des conditions de synthèse (de DP moyen 35 à partir de 600 mM saccharose à DP moyen 58 à partir de 100 mM saccharose), avec une polydispersité très importante (de 2,3 à partir de 600 mM de saccharose à 3,0 à partir de 100 mM) qui résulte du mécanisme non processif (multi-chaîne) de polymérisation (Figure I-16). Le rendement de formation de ce polymère insoluble est lui-aussi lié à la concentration initiale de substrat, puisque 3 g/L d'amylose sont obtenus à partir de 100 mM de saccharose, contre 54 g/L à partir de 600 mM. Enfin, les chaînes plus longues (obtenues à partir de saccharose à 100 mM) forment des réseaux enchevêtrés et les chaînes plus courtes (obtenues à partir de saccharose à 600 mM), des agrégats polycristallins (**Potocki-Véronèse *et al.*, 2005**).

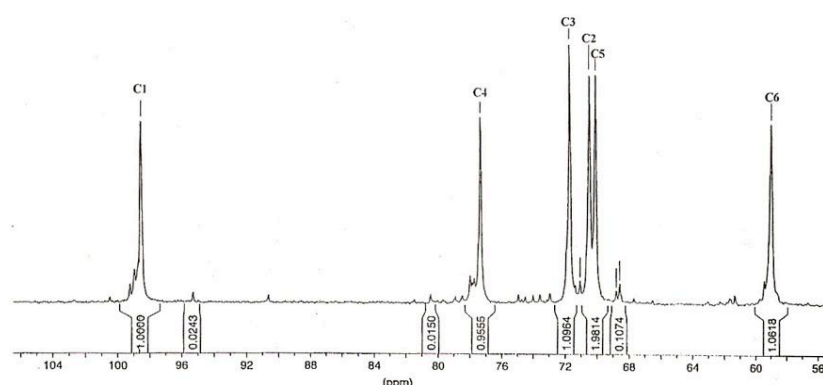


Figure I-15 : Spectre de RMN du ^{13}C du polysaccharide synthétisé par l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* à partir de saccharose (100 mM) (**Potocki de Montalk, 1999**).

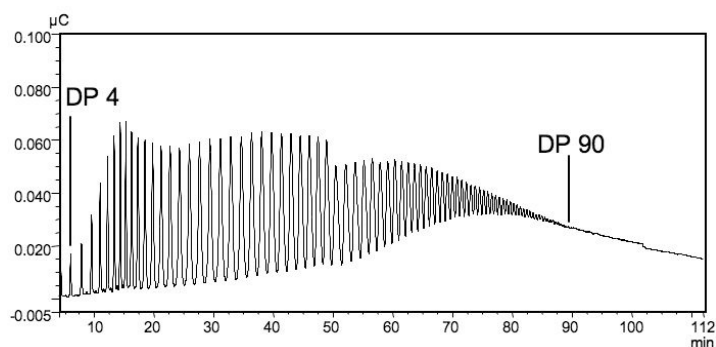


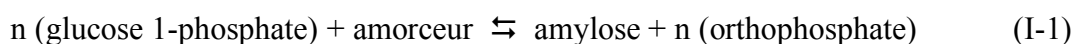
Figure I-16 : Profil chromatographique HPAEC-PAD de l'amylose synthétisée par l'amylosaccharase de *N. polysaccharea* à partir de 100 mM de saccharose.

La cristallinité de type B de l'amylose formée à partir de 600 mM de saccharose est exceptionnellement élevée (94%), et dépasse celle des standards cristallins actuels après traitement thermique à 90°C pendant 5 min (**Potocki-Veronese *et al.*, 2005**). Cette organisation structurale lui confère des propriétés de résistance très élevées aux enzymes de la digestion, puisque 85 % résistent à l'hydrolyse *in vitro* par l' α -amylase et l'amyloglucosidase, ce qui correspond à une teneur de 85 % en amidon résistant.

1.3.1.2. L'amidon-phosphorylase

L'amidon-phosphorylase est une glycosyltransférase qui catalyse le transfert d'un glucose à partir de glucose 1-phosphate (G1P) vers une molécule accepteur. Les glycosyltransférases catalysent généralement la dégradation des polysaccharides de réserve au moyen d'une réaction de phosphorolyse, chez les animaux (substrat : glycogène) et dans les plantes (substrat : amidon). Les réactions biochimiques de phosphorolyse catalysées par la phosphorylase sont très faiblement énergétiques, elle sont donc facilement réversibles. Cette caractéristique est utilisée pour synthétiser des α -glucanes *in vitro* (**Pfannemüller et Burchard, 1969 ; Kitamura *et al.*, 1982, 1984 ; Roger *et al.*, 2000**).

L'accepteur est habituellement un saccharide de DP 4 minimum. La réaction libère du phosphate :



Quand le G1P est présent en excès, la réaction de polymérisation est prédominante et, selon la littérature, toutes les chaînes de l'amorce sont polymérisées à la même vitesse (**Whelan et Bailey, 1954**). Un produit relativement monodisperse en DP est alors obtenu.

La longueur des chaînes d'amylose synthétisées dépend du rapport G1P/substrat initial. Un rapport élevé conduit à une amylose de haute masse moléculaire (jusqu'à DP 14000) tandis qu'un faible rapport induit la formation d'une amylose de faible masse moléculaire (DP autour de 25) (**Pfannemüller, 1968 ; Gidley et Bulpin, 1989**).

2. CRISTALLISATION DES POLYMÈRES

Les travaux de Staudinger dans les années 1920 constituent la base de la science des macromolécules. De nombreux traités scientifiques et revues bibliographiques ont été consacrés à la physique de la cristallisation des macromolécules. La liste suivante présente les oeuvres principales qui ont permis de rédiger ces pages : Principles of Polymer Chemistry – **Flory (1953)** ; Cristallisation of Polymers – **Mandelkern (1964)** ; Structure and Properties of polymer crystal formed in dilute solution – **Mandelkern (1976)** ; Macromolecular Physics in 2005 – **Wunderlich (2005)**.

2.1. Introduction

Les macromolécules sont composées d'un grand nombre d'unités monomériques liées entre elles par des liaisons covalentes. Les propriétés thermodynamiques, hydrodynamiques, physiques et mécaniques des différents types de polymères peuvent être généralement décrites lorsqu'on connaît leur structure covalente et la taille des chaînes macromoléculaires qui les constituent.

Si certains polymères, tels le polystyrène ou les thermodurcissables, sont totalement amorphes à l'état solide, de nombreux autres, en revanche, naturels (cellulose, amylose, certaines protéines) ou synthétiques (polyéthylène, polypropylène, polyamides, polyesters thermoplastiques, etc.), ont la faculté de cristalliser. Pour constituer des cristaux, les chaînes macromoléculaires doivent *a priori* présenter une régularité de structure moléculaire mais aussi conformationnelle et configurationnelle.

La conformation (terme utilisé pour décrire les angles de rotation possibles d'une liaison entre unités monomères) d'une chaîne est gouvernée par les interactions à courte distance entre atomes non-liés voisins. Ainsi, une seule molécule peut avoir plusieurs conformations spatiales. Les unités structurales ne sont pas coordonnées entre elles et sont désordonnées. La chaîne peut être linéaire ("zig-zag") ou en hélice.

Dans certaines conditions de température, pression, concentration ou contrainte, une organisation peut se manifester entre différentes parties des chaînes macromoléculaires. Cet ordre de configuration (arrangement tridimensionnel qui ne peut pas être altéré sans casser les

liaisons impliquées) est dû à la préférence des chaînes à s'organiser selon des orientations tridimensionnelles spécifiques pour minimiser l'énergie du système. Les chaînes sont liées entre elles par des liaisons inter-chaînes de van der Waals ou des ponts hydrogène. Dans les zones ordonnées, les axes des chaînes macromoléculaires sont parallèles entre eux.

L'ordre tridimensionnel est décrit au moyen d'une maille cristalline caractérisée par des paramètres définis. La totalité de la figure périodique infinie peut être décrite en précisant la partie de la figure découpée par la maille cristalline (le motif) et la manière dont le réseau répète ce motif pour produire l'ensemble tridimensionnel (opérations de symétrie). La maille cristalline, le motif et l'ensemble des symétries de position dans la maille définissent le groupe d'espace qui décrit complètement l'occupation spatiale.

Par comparaison avec les cristaux de petites molécules ou les métaux, la maille cristalline d'un polymère ne contient pas d'atomes indépendants et chaque chaîne peut contribuer à plusieurs mailles élémentaires à l'intérieur du cristal. Dans l'espace tridimensionnel, la conformation et la configuration de la même chaîne peuvent être différentes. Il en résulte alors un polymorphisme. Une chaîne macromoléculaire régulière, soit chimiquement, soit dans sa structure, peut facilement cristalliser. De façon générale, tous les défauts dans la chaîne (irrégularités, ramifications, etc.) sont défavorables à la cristallisation. En principe, la présence d'irrégularités ne compromet pas la possibilité d'un ordre de configuration. Dans tous les cas, il faudra toujours déterminer les conditions précises afin que la cristallisation intervienne pendant le temps d'observation.

2.2. Morphologie des cristaux de polymère

De façon générale, un polymère amorphe est caractérisé par l'absence d'ordre à longue portée. Par contre, un polymère sous forme cristallisée présente des régions où les chaînes sont ordonnées. Cependant, sans considérer les monocristaux et les possibles repliements de la chaînes, en raison de la longueur des chaînes, les polymères forment rarement des cristaux à chaînes étendues, donc dans un état complètement cristallin. Ils ont le plus souvent une structure semi-cristalline où coexistent des régions cristallines et amorphes.

Cette structure a d'abord été interprétée par le modèle des micelles à franges (*fringed micelles*) proposé par **Hermann *et al.*** en 1930 pour expliquer la structure de la gélatine et successivement approfondie par **Flory (1949, 1962)**. Dans ce modèle, les zones cristallines sont représentées par des séquences ordonnées où les chaînes sont alignées parallèlement les unes aux autres (Figure I-17). La croissance latérale des ces régions cristallines peut avoir lieu

par addition de segments provenant d'autres chaînes, mais elle est limitée par la présence des zones amorphes. Les franges correspondent aux zones où les chaînes passent d'une région cristalline aux zones amorphes voisines. Une macromolécule peut faire partie de plusieurs cristallites, orientés au hasard et également traverser des zones moins ordonnées.

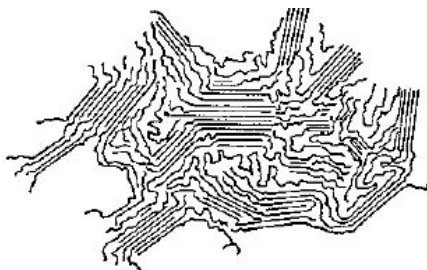


Figure I-17 : Modèle de micelle à franges (**Brückner *et al.*, 2001**).

Bien que longtemps accepté, le modèle des micelles frangées ne permettait pas de rendre compte des structures cristallines observées par microscopie optique sur des échantillons de polymères cristallisés à partir de fondus. Ces structures, qualifiées de "sphérolitiques", représentent des entités symétriques essentiellement de forme sphérique ayant des propriétés de biréfringence.

Un autre modèle de structure des polymères est apparu dans les années 1957-1960, à la suite de l'étude des monocristaux formés en solution diluée entreprise par **Schlesinger et Leeper (1953)**, **Keller et Waring (1955)** et **Jaccodine (1955)**. Ces études ont confirmé la notion de repliement de chaînes introduite auparavant par **Storks (1938)** (Figure I-18).

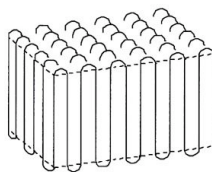


Figure I-18 : Schéma représentant la structure d'une lamelle cristalline formée par repliements successifs de chaînes polymères (d'après **Gourgues-Lorenzon et Haudin, 2006**).

2.2.1. Cristaux lamellaires

L'existence de cristaux lamellaires a été démontrée en préparant des monocristaux à partir de solutions diluées (<1% p/v). La dimension latérale de ces monocristaux lamellaires est de quelques μm à quelques dizaines de μm et l'épaisseur est d'une dizaine de nm.

En interprétant les clichés de diffraction des électrons enregistrés à partir de ces cristaux et en replaçant la maille cristalline dans le monocristal, il a été déduit que l'axe c , c'est-à-dire l'axe des chaînes, était perpendiculaire au plan de la lamelle. Ce résultat fondamental a conduit au concept de repliements des chaînes (Storks, 1938 ; Schlesinger et Leeper, 1953 ; Keller et Waring, 1955 ; Keller, 1957). En effet, si l'on considère simultanément la longueur de la chaîne macromoléculaire, l'épaisseur des monocristaux et l'orientation des chaînes à l'intérieur des cristaux, il apparaît nécessaire que les chaînes se replient sur elles-mêmes dans l'épaisseur du monocristal. Les plis et les boucles sont situés sur les faces supérieure et inférieure de la lamelle et ne font pas partie du réseau cristallin, bien qu'ils puissent l'influencer.

Deux types de repliements des chaînes macromoléculaires peuvent être distingués pour le modèle lamellaire. Dans le modèle de repliements désordonnés ("*random switchboard*"), une chaîne peut se replier à la surface de la lamelle en formant une boucle et rentrer en un point plus éloigné ou participer à une autre lamelle (Flory, 1962). Dans le modèle à repliements serrés ("*adjacent reentry chain-folded model*"), la chaîne se replie à la surface de la lamelle pour former une boucle en rentrant dans le site voisin.

L'existence du repliement des chaînes introduit des concepts et des méthodes d'étude spécifiques aux polymères. La détermination de la structure précise de la surface contenant les repliements et les bouts de chaîne, dans laquelle se concentrent les défauts chimiques ou structuraux, est très difficile car cette zone est peu ordonnée et très fine (10-20 Å d'épaisseur).

L'épaisseur de la lamelle est influencée par le degré de surfusion, l'écart entre la température de dissolution du système étudié et la température de cristallisation. Dans le cas d'une cristallisation à partir de solutions diluées, l'épaisseur dépend aussi du temps de cristallisation et de la masse moléculaire moyenne.

L'existence de cristaux lamellaires a été mise en évidence aussi dans les polymères cristallisés à partir de l'état fondu. Toutefois, à l'état massif, la situation est plus complexe du fait de la coexistence de la phase cristalline et de la phase amorphe. Le modèle à deux phases est le modèle le plus simple qui rende compte à la fois d'une cristallinité partielle et de l'existence de cristaux lamellaires (Figure I-19a).

Les lamelles cristallines, avec une épaisseur typique d'environ 10 nm, ont tendance à s'empiler lors de la cristallisation. Ainsi, une chaîne de polymère peut participer à plusieurs lamelles. La périodicité (Figure I-19b) de cet édifice est décrite par:

$$L = l_{\text{crist}} + l_{\text{am}} \quad (\text{I-2})$$

où l_{crist} est l'épaisseur de la lamelle cristalline et l_{am} , celle de la zone amorphe. Les lamelles cristallines sont connectées à travers la phase amorphe par des molécules de liaison.

De nombreux polymères cristallisent selon une morphologie lamellaire à chaînes repliées. En général, une macromolécule suffisamment régulière, linéaire et flexible, cristallise selon une macroconformation à chaînes repliées à partir d'un état instable et désordonné (**Wunderlich, 2005**).

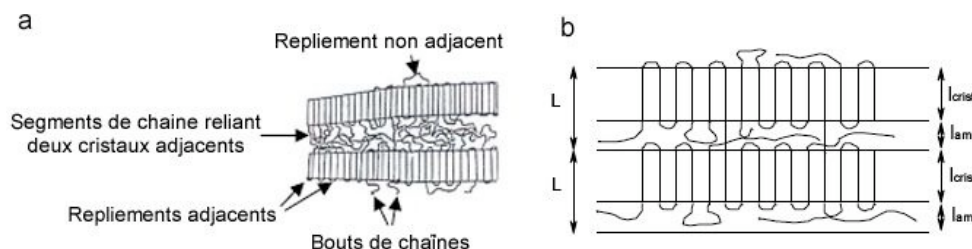


Figure I-19 : a) Modèle à deux phases pour un polymère semi-cristallin ; b) description de la périodicité de la structure (d'après **Gourgues-Lorenzon et Haudin, 2006**).

2.2.2. Shish-kebabs

Cette terminologie imagée décrit des structures composites formées par nucléation et croissance orientées d'une substance sur un substrat en général fibreux. Il s'agit d'un cas d'épithaxie, une technique de croissance orientée de deux cristaux partageant certains éléments de symétrie dans leurs réseaux cristallins. Cette structure a été montrée par **Wunderlich et Melillo (1966)** sur des chaînes étirées de polyéthylène avec une méthode de fusion de surface des couches du polymère. Sont distinguées habituellement l'homoépithaxie, qui consiste à faire croître un cristal sur un cristal de nature chimique identique, et l'hétéroépithaxie, dans laquelle les deux cristaux sont de nature chimique différente.

Les shish-kebabs comportent une fibre centrale (le "shish") qui sert de germe pour la cristallisation en chaînes repliées de lamelles formant les "kebabs" (Figure I-20). Un des processus à la base de cette méthode de cristallisation est l'étirement de longues chaînes pour former des cristaux fibreux. L'étirement entraîne la distorsion des chaînes de leur conformation plus probable et donc une diminution de l'entropie conformationnelle. Si cette déformation est maintenue dans cet état entropique conformationnel alors une plus faible quantité d'entropie conformationnelle doit être utilisée pour la transformation cristalline. Cette diminution de l'entropie totale de fusion permet d'obtenir la cristallisation à plus haute température par rapport aux conditions standard. Le caoutchouc naturel et le polyisobutylène sont d'excellents exemples de cet effet (**Mendelkern, 1964**). Ces deux polymères cristallisent facilement pendant l'étirement mais lentement dans des conditions standard.

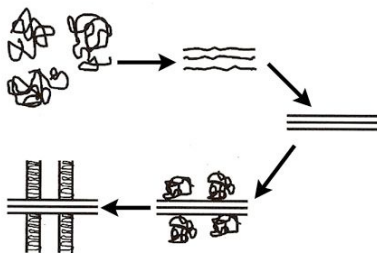


Figure I-20 : Représentation schématique de la cristallisation induite orientée : orientation et cristallisation des chaînes de base, nucléation et croissance des chaînes repliées autour de la fibre.

La formation de cette morphologie fibreuse est accompagnée de celle d'une couche épitaxiée autour de l'axe de la fibre (**Pennings et Kiel, 1965 ; Pennings *et al.*, 1970**). Les régions "shish" se forment en premier. La zone "kebab" est constituée essentiellement de régions à chaînes repliées qui n'ont pas cristallisé pendant le processus d'étirement. La formation du disque de chaînes repliées est induite par la nucléation sur la surface des chaînes étirées. L'axe cristallographique c des chaînes repliées est parallèle à l'axe c du substrat.

Après plusieurs études de l'épitaxie de chaînes repliées sur des chaînes étendues, plusieurs chercheurs ont travaillé sur l'épitaxie de cristaux de polymère lamellaires sur d'autres substrats cristallins orientés comme des fibres ou des films (**Horio, 1964 ; Mauritz *et al.*, 1978 ; Wittmann et Lotz, 1990**). Ce type de shish-kebab peut être obtenu entre deux cristaux qui possèdent des paramètres cristallins similaires mais aussi quand aucune corrélation cristallographique n'existe entre les deux polymères. Dans ce cas, la morphologie shish-kebab résulte plus d'un mécanisme de nucléation simple que d'une croissance due à l'épitaxie.

La croissance orientée des cristaux de polymère sur des substrats étirés n'est pas limitée aux polymères synthétiques. Les polysaccharides de faible masse moléculaire peuvent aussi cristalliser avec une structure de type shish-kebab.

Buléon *et al.* (1976, 1977) ont étudié la cristallisation par épitaxie de la cellulose II sur des microfibrilles natives de cellulose I de *Valonia*. Les structures résultantes sont similaires à la morphologie en shish-kebab obtenue avec les polymères synthétiques, la structure fibrillaire (shish) étant la cellulose native de *Valonia* et les lamelles épitaxiales (kebabs) étant la cellulose II. La même morphologie a été observée avec la cellulose II, IV_{II} (**Buléon et Chanzy, 1980**), le mannane (**Chanzy *et al.*, 1978, 1979**) et le chitosane (**Cartier *et al.*, 1990**).

Des complexes cristallins d'amylose avec le butanol peuvent aussi nucléer sur des microfibrilles de cellulose de *Valonia* et des microcristaux de cellulose de tunicier (**Helbert et**

Chanzy, 1994) (Figure I-21). Il n'existe pas de relation cristallographique évidente entre la cellulose et l'amylose. Il ne s'agit donc pas d'épitaxie. Dans ce cas, la morphologie "shish-kebab" serait donc due à une nucléation hétérogène des cristaux d'amylose sur la cellulose. Selon **Binsbergen (1973)** et **Gray (1974)**, la présence d'imperfections le long des arêtes de la cellulose pourrait faciliter la nucléation hétérogène.

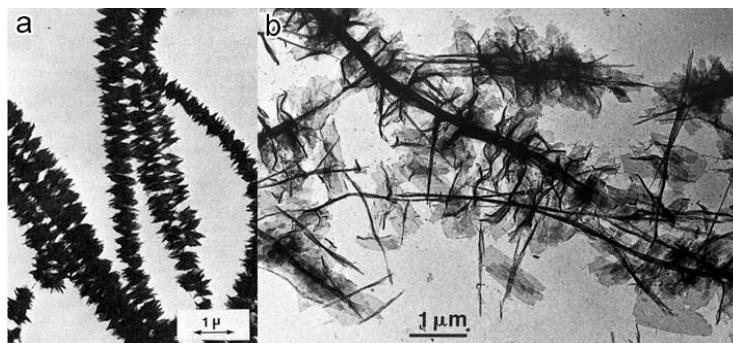


Figure I-21 : a) Shish-kebabs préparés par recristallisation de triacétate de cellulose sur des microfibrilles de cellulose de *Valonia* (**Buléon et al., 1977**) ; b) microcristaux de cellulose de tunicier décorés par les cristaux d'amylose V_{butanol} (**Helbert, 1994**) (clichés de MET).

2.2.3. Sphérolites

Les sphérolites sont observés non seulement dans les polymères (**Keller, 1955 ; Keller et Waring, 1955 ; Geil, 1963 ; Mendelkern, 1964 ; Basset et Vaughan, 1986**) mais aussi dans les agrégats minéraux, les alliages et verres métalliques et d'autres substances inorganiques (**Popoff, 1934 ; Keith et Padden, 1986 ; Marentette et Brown, 1993**). Deux modes de croissance sont généralement décrits. Le premier consiste en une organisation radiale des molécules à partir d'un germe central (Figure I-22a). Le remplissage uniforme du sphérocrystal serait atteint grâce à des cristallites plus petits, connectés aux structures cristallines principales qui démarrent du centre de la sphère. Dans le second mode de croissance, les molécules s'arrangent selon le modèle à bi-feuille de **Popoff (1934)** (Figure I-22b).

Dans ce deuxième cas, le sphérolite est généré par un monocristal (**Popoff, 1934 ; Keller et Waring 1955**). L'axe central du sphérocrystal est inhomogène à cause de la formation de nouveaux germes sur le front de croissance du monocristal. Ces branchements vont former une structure en gerbe qui se ramifie pendant la croissance. Au final, la gerbe forme deux "yeux" non-cristallisés des deux côtés du monocristal.

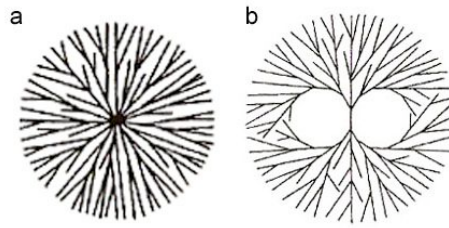


Figure I-22 : représentation schématique bidimensionnelle des deux modes de croissance des sphérolites. a) organisation radiale ; b) organisation en bi-feuille de Popoff. (Wunderlich, 2005).

Les sphérolites de polymère présentent des propriétés optiques particulières car les polymères cristallins sont optiquement anisotropes. Ils sont biréfringents et leur indice de réfraction varie selon les directions cristallographiques. Ces propriétés optiques résultent de la nature diélectrique des polymères, du caractère fortement anisotrope des cristaux et de l'organisation particulière de ces cristaux au sein des sphérolites.

La biréfringence d'un sphérocristal est définie par $n_r - n_t$, où n_r est l'indice de réfraction radial (parallèle au rayon du sphérocristal) et n_t l'indice de réfraction tangentiel (perpendiculaire au rayon du sphérocristal). Ainsi, observés par microscopie optique entre polariseur et analyseur croisés, ils présentent souvent une figure d'extinction en forme de croix de Malte (Figure I-23).

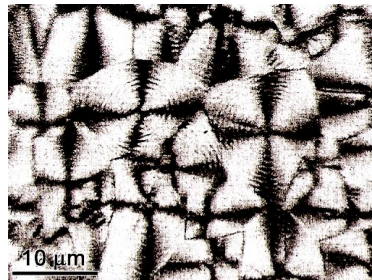


Figure I-23 : Sphérolites de polyéthylène photographiés entre polariseurs croisés (Wunderlich, 2005).

Sur la base de la biréfringence, les sphérolites peuvent être séparés en deux catégories. Les biréfringents négatifs possèdent un indice de réfraction tangentiel supérieur à l'indice radial parallèle à la direction de croissance. Les sphérolites biréfringents positifs, au contraire, possèdent un indice de réfraction radial supérieur à l'indice tangentiel.

2.3. Mécanisme moléculaire de la cristallisation

La cristallisation des polymères est un phénomène complexe. De nombreuses théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes moléculaires qui en sont à la base. Cette situation est compliquée par le fait qu'il n'existe pas, à ce jour, de technique expérimentale capable d'étudier directement le processus d'assemblage des chaînes de polymère sur le front de croissance cristallin, étape élémentaire de la cristallisation.

2.3.1. Nucléation

La cristallisation peut être définie comme la formation d'un germe cristallin induite par une fluctuation de densité ou d'ordre à l'intérieur d'un fondu ou d'une solution (**Wunderlich, 2005**). La formation de ce germe primaire est la première étape pour démarrer la cristallisation. Ce phénomène est appelé "nucléation primaire". L'avancement de la cristallisation à la surface de croissance par addition de molécules de polymère est appelée "nucléation secondaire".

Une autre manière de distinguer différents modes de nucléation est de décrire les caractéristiques du "site" où la germination a lieu. Il est question de nucléation "homogène" s'il n'y a aucune surface secondaire ou germe préexistant et si la germination a lieu spontanément simplement grâce au sous-refroidissement. Cependant, si une seconde phase est présente, alors la nucléation est dite "hétérogène". **Wunderlich et al. (1976)**, à la suite des travaux de **Blundell et al. (1966)**, ont aussi décrit une troisième catégorie, appelée "auto-ensemencement", observée en présence germes préexistants/résiduels qui ont survécu à l'étape de fusion ou solubilisation. Si la nucléation primaire peut être homogène ou hétérogène, la nucléation secondaire est, par sa définition, d'origine hétérogène.

Par la suite, nous traiterons de la cristallisation en solution, le formalisme étant similaire pour la cristallisation en phase vapeur et à partir de l'état fondu. Soit C la concentration de la solution avant que la cristallisation ne démarre. C^* est la concentration critique de nucléation, C_∞ la concentration d'équilibre et $\beta = C/C_\infty$ le degré de sursaturation. De manière générale, la cristallisation d'un système en fonction de la concentration de soluté peut être décrite par trois régimes illustrés par les trois zones de la Figure I-24. Dans la première zone, dite de nucléation, la concentration C est supérieure à C^* . Le système est sursaturé et de nouveaux cristaux se forment. Dans la zone de métastabilité, $C_\infty < C < C^*$. Le système est sursaturé et les cristaux déjà formés croissent. La nucléation est négligeable. Dans la zone de dissolution, $C < C_\infty$, le système est sous-saturé et les cristaux présents se dissolvent.

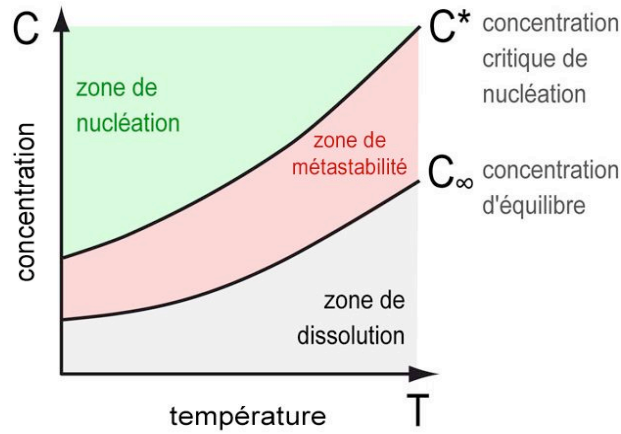


Figure I-24 : Variation de la concentration de soluté en fonction de la température. Zone de nucléation : $C > C^*$; zone de métastabilité : $C^* < C < C_\infty$; zone de dissolution : $C < C_\infty$.

La nucléation est la formation, par addition successive de molécules du soluté, d'un germe, dont la croissance est énergétiquement favorable. Pour la formation de germes stables, la barrière d'énergie à la cristallisation doit être franchie. Or, la création d'un germe implique la création d'un volume et d'une surface. Le processus de nucléation est décrit thermodynamiquement de la façon suivante. La formation d'un germe de volume V et de surface S à partir d'une solution sursaturée entraîne une variation d'enthalpie libre égale à :

$$\Delta G = V\Delta G_v + S\Delta G_s \quad (\text{I-3})$$

où $\Delta G_v = -\frac{kT}{v} \ln \beta$ est la variation d'enthalpie libre par unité de volume formé, $\Delta G_s = \gamma$ l'enthalpie libre interfaciale entre le germe et le liquide par unité de surface, k la constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-27} \text{ JK}^{-1}$), v le volume de l'unité de croissance et $\beta = C/C_\infty$ le degré de sursaturation.

Si l'on considère un germe sphérique de rayon r :

$$\Delta G = -\frac{4}{3} \frac{\pi r^3 kT}{v} \ln \beta + 4\pi r^2 \gamma \quad (\text{I-4})$$

$$r^* = \frac{2\gamma v}{kT \ln \beta} \quad (\text{I-5})$$

où r^* est le rayon du germe critique. La variation d'enthalpie libre devient (Figure I-25):

$$\Delta G^* = \frac{16\pi v^2 \gamma^3}{3(kT \ln \beta)^2} \quad (\text{I-6})$$

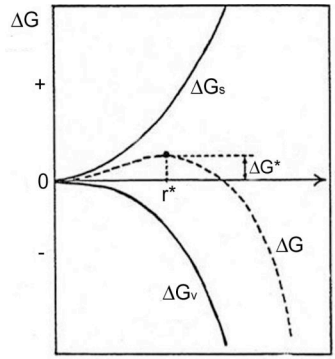


Figure I-25 :Variation de l'énergie libre ΔG en fonction du rayon r du germe primaire. La barrière initiale d'énergie libre doit être dépassée pour que le germe devienne stable. ΔG_s est l'enthalpie libre interfaciale par unité de surface, ΔG_v la variation d'enthalpie libre par unité de volume formé et r^* rayon du germe critique.

A la taille critique r^* , le germe est en équilibre instable. Il est viable quand l'énergie de volume l'emporte sur l'énergie de surface. Le ΔG maximum correspond à la taille critique du germe (Figure I-25). Les germes qui possèdent une taille inférieure à la taille critique du germe sont dits sous-critiques ou embryonnaires et ont tendance à se dissoudre. Les germes avec $r > r^*$ sont dits sur-critiques durant le temps où leur ΔG reste positif. Les germes avec ΔG négatif sont stables et ont tendance à croître. A plus haute sursaturation, la taille du germe critique diminue et un embryon atteindra la taille critique plus facilement par des mécanismes de fluctuation locales. La vitesse à laquelle apparaissent les germes est:

$$R_n = \frac{dN}{dt} = A_n e^{-\frac{\Delta G^*}{kT}} = A_n e^{-\frac{k}{(kT)^3 \ln^2 \beta}} \quad (I-7)$$

où R_n est le nombre de germes critiques formés par unité de volume et par unité de temps, et N nombre de cristaux (ou d'agrégats amorphes) par unité de volume. La fréquence de nucléation dépend du degré de sursaturation β . Globalement, il existe une sursaturation limite, β^* , au dessous de laquelle la nucléation est très faible. La nucléation acquiert une vitesse significative seulement au-delà de β^* (Figure I-26).

La zone de métastabilité (Figure I-26) est la zone dans laquelle la nucléation est pratiquement nulle alors que la solution est sursaturée. Elle a comme limite β^* . Au-delà de cette valeur, la nucléation est spontanée. L'intensité de la nucléation est liée à la largeur de la zone métastable et les germes créés au moment de la nucléation seront de plus en plus nombreux à largeur de zone métastable croissante. Les solutions peuvent rester dans cet état pendant plusieurs jours si le milieu n'est pas agité, mais cristalliser très rapidement sous agitation. L'agitation réduit la sursaturation limite du système.

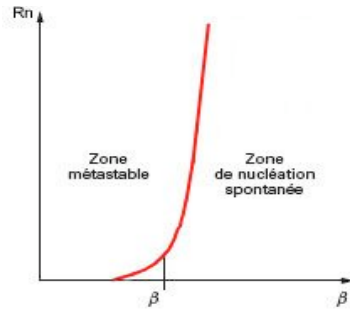


Figure I-26 : Représentation schématique de la variation du nombre de germes formés, R_n , en fonction de degré de sursaturation β (d'après **Boistelle et Astier, 1998**).

Lorsque le germe se forme sur un substrat, le mécanisme de nucléation devient hétérogène. Trois énergies interfaciales doivent être considérées: $\gamma_{g,l}$, entre germe et liquide, $\gamma_{s,l}$, entre substrat et liquide et $\gamma_{s,g}$, entre germe et substrat. Elles sont reliées par la relation de Young :

$$\gamma_{s,l} = \gamma_{g,s} + \gamma_{g,l} \cos \alpha \quad (\text{I-8})$$

avec α l'angle de contact du germe avec le substrat.

La barrière énergétique à franchir pour création de germes sur le substrat, $\Delta G_{\text{hét}}^*$, est fonction de l'angle de contact α , elle diminue à affinité germe/substrat croissante. Grâce à la contribution du substrat, de moins en moins de molécules sont nécessaires pour former un germe stable de rayon $r=r^*$. Les germes vont donc apparaître à un degré de sursaturation inférieur par rapport à la nucléation homogène.

2.3.2. Croissance

Une fois que le germe primaire est formé, la croissance s'effectue par dépôt successif de chaînes sur les surfaces du germe initial. Le "germe secondaire" est celui qui vient se déposer sur la surface du germe primaire et les germes tertiaires sont ceux qui seront ajoutés successivement pour le remplissage de la couche.

Globalement, le mécanisme de croissance change avec la sursaturation S . Les faces planes du cristal seront favorisées à faible sursaturation, les faces rugueuses à sursaturation élevée. La forme finale d'un cristal est déterminée par les rapports entre les vitesses de croissance des faces. Selon la loi du recouvrement, quand une face croît très vite, elle tend à s'effacer (**Valeton, 1923 ; Bentivoglio, 1927**).

Si, pour simplifier, on considère que la croissance d'une face cristalline se fait couche par couche (modèle de Kossel), les particules peuvent se condenser sur trois type de sites différents de la couche incomplète : site I, sur face plane, nécessite un germe bidimensionnel

pour qu'une nouvelle couche incomplète puisse se développer tangentiellement ; site II, profil en escalier, constitué des éléments de faces planes, nécessite un germe unidimensionnel pour amorcer une nouvelle rangée le long de la précédente ; site III, dans un recoin, le plus probable jusqu'à ce que la rangée à laquelle il appartient soit complète (Figure I-27).

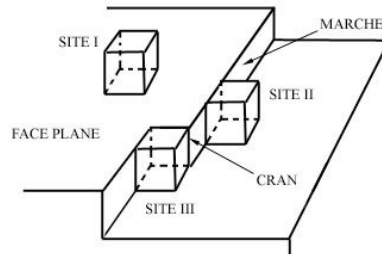


Figure I-27 : Représentation schématique des sites de croissance d'un cristal. Les unités de croissance sont représentées par des blocs parallélépipédiques.

Dans ce modèle, la probabilité de formation d'un germe sur le site I par diffusion superficielle est faible, il est nécessaire de diminuer ses dimensions critiques et donc d'augmenter le niveau de sursaturation. Dans le modèle de **Burton *et al.* (1951)**, les cristaux réels présentent des dislocations qui maintiennent en surface des éléments de gradins. Les dislocations peuvent naître, par exemple, d'un décalage des "blocs" constitutifs de l'ordre de grandeur de la maille élémentaire par un cisaillement dans une partie limitée du cristal (Figure I-28a). Ce cisaillement provoque l'apparition d'un gradin sur la face où la dislocation vis émerge du cristal. La surface n'est donc pas parfaitement plate mais hélicoïdale. Les molécules de soluté qui s'absorbent sont piégées le long du gradin où se trouvent les sites de croissance. Le gradin avance en tournant autour du point émergeant de la dislocation, en formant une spirale de croissance (Figure I-28b).

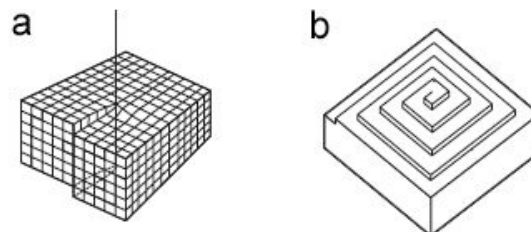


Figure I-28 : a) Dislocation vis générée par un cisaillement dans une partie du cristal et apparition d'un gradin à la surface; b) spirale de croissance générée par la rotation du gradin autour de la dislocation émergeante à la surface (de **Puel *et al.*, 2005**).

La taille du cristal dépend donc de la compétition entre la vitesse de nucléation, R_n , et la vitesse de croissance, R_c . La première se base sur un processus d'activation et dépend de la sursaturation au travers d'une loi exponentielle, la seconde dépend de la sursaturation au moyen d'une loi du premier ou deuxième ordre (Figure I-29).

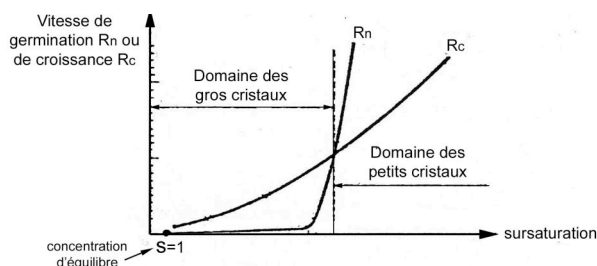


Figure I-29 : Variation de la vitesse de germination ou de croissance par rapport à la sursaturation du système. Pour une sursaturation faible, la nucléation est faible et la croissance élevée (domaine des gros cristaux), pour une sursaturation élevée, la nucléation est favorisée et la croissance est faible (domaine des petits cristaux).

Il faut noter que la vitesse de croissance cristalline est aussi gouvernée par la diffusion des chaînes macromoléculaires jusqu'au front cristallin. La vitesse de cristallisation globale dans la théorie de Lauritzen-Hoffman tient compte de ces deux facteurs indépendants et est exprimée comme le produit de la vitesse de diffusion des chaînes et de la vitesse de croissance R .

En dehors des conditions thermiques, la cristallisation dépend également de l'architecture moléculaire du polymère. Les chaînes longues auront donc tendance à favoriser la germination du fait de leur mobilité réduite. La présence de longues branches modifie la cinétique globale de cristallisation. La présence de ce type de défaut structural change le mécanisme de repliement de la chaîne en favorisant des repliements aléatoires et/ou en empêchant la formation de repliements serrés.

2.4. Morphologie cristalline des polysaccharides autres que l'amylose

Les cristaux de polysaccharides offrent une grande variété de formes et de structures (Chanzy et Vuong, 1985). On observe des différences entre les cristaux natifs, dont les caractéristiques sont contrôlées *in vivo* par la machinerie enzymatique qui les biosynthétise, et les produits recristallisés préparés *in vitro* à partir de solutions.

On rencontre souvent les polysaccharides cristallins natifs sous forme de microfibrilles jouant le rôle d'éléments de structure dans les parois cellulaires. C'est notamment le cas de la cellulose chez les plantes ainsi que certaines algues et quelques animaux (tuniciers). La forme,

la taille et la cristallinité des microfibrilles dépendent de l'origine de la cellulose (**Chanzy, 1990**). La largeur des microfibrilles varie de 2 à 3 nm dans les parois des cellules des tissus primaires de certaines plantes à 60 nm chez certaines algues (*Micrasterias*). Des microfibrilles de cellulose sont aussi excrétées par des bactéries (*Acetobacter*) (**Gorham et Colvin 1957**).

Les microfibrilles de chitine existent dans de nombreux champignons, dans les cuticules de certains crustacés (**Giraud-Guille, 1984**), dans les tubes de vers marins (**Gaill *et al.*, 1992**) ou encore dans la "plume" cartilagineuse des calamars. Par ailleurs, certaines algues excrètent (diatomées – **Herth et Zugenmaier, 1977**) ou éjectent (*Phaeocystis* – **Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1997**) des filaments cristallins dont l'enchevêtrement permet d'établir des colonies.

Avec une largeur de 2 à 50 nm et une longueur de plusieurs μm , les microfibrilles de polysaccharides sont constituées de molécules parallèles ou anti-parallèles, l'axe des chaînes étant parallèle à celui des microfibrilles. Les microfibrilles ne sont pas des monocristaux car des zones moins organisées se forment durant la biosynthèse. Par hydrolyse acide préférentielle de ces zones, des nanocristaux individuels plus courts aussi appelés *whiskers* sont obtenus (**Battista et Smith, 1962 ; Elazzouzi-Hafraoui *et al.*, 2008 ; Revol et Marchessault, 1993**).

Des sphérolites ont été préparés par recristallisation de cellulose (**Kobayashi *et al.*, 2000a**), de chitine (**Kobayashi *et al.*, 2000b**) ou de $\beta(1,3)(1,4)$ -glucanes (**Faijes *et al.*, 2004**) biosynthétisés *in vitro*. En partant de solutions plus diluées, des cristaux lamellaires ont été préparés à partir de cellulose (**Buléon et Chanzy, 1978**), de dextrane (**Guizard *et al.*, 1984**) et de chitine (**Persson *et al.*, 1992**).

Une caractéristique majeure qui différencie les polysaccharides natifs des polymères synthétiques est qu'ils n'existent pas à l'état fondu puisque la température de fusion théorique est supérieure à la température de dégradation du polysaccharide. L'emploi de plastifiants permet néanmoins d'abaisser la température de fusion.

3. FORMES CRISTALLINES DE L'AMYLOSE RECRISTALLISÉE

La morphologie et la dimension des cristallites dans les grains d'amidon natifs sont encore peu connues. Les résultats publiés montrent que les domaines sont petits et peu adaptés aux études cristallographiques directes. Les auteurs ont donc eu recours à des objets cristallins "modèles" préparés *in vitro* par recristallisation de chaînes d'amylose (dextrines limites ou amylose synthétique) : **Buléon *et al.*, 1984 ; Gidley et Bulpin, 1987 ; Pfannemüller, 1987 ; Ring *et al.*, 1987 ; Imberty *et al.*, 1987 ; 1988 ; Helbert *et al.*, 1993 ; Helbert et Chanzy, 1994 ; Ziegler *et al.*, 2003 ; Creek *et al.*, 2006 ; Cardoso *et al.*, 2007**.

Le solvant, la concentration initiale de la solution, la température et la longueur des chaînes sont les principaux paramètres déterminant l'obtention d'un type allomorphique donné. En règle générale, des chaînes longues et une basse température favorisent la formation de type B, tandis que des chaînes courtes, une température de cristallisation et une concentration élevées induisent le type A (**Buléon *et al.*, 1984 ; Pfannemüller, 1987; Gidley et Bulpin, 1987**).

3.1. Monocristaux

3.1.1. Type A

La cristallisation *in vitro* de chaînes d'amylose de DP similaire à celui des courtes chaînes latérales de l'amylopectine ne conduit pas à la formation des mêmes nanocristaux lamellaires observés après hydrolyse acide des grains natifs (**Putaux *et al.*, 2003**).

Les monocristaux d'amylose de type A préparés à partir de solutions aqueuses diluées en présence d'acétone possèdent une forme oblongue en aiguille et une longueur de plusieurs micromètres (**Buléon *et al.*, 1984; Imberty *et al.*, 1987**) (Figure I-30).

La préparation des cristaux d'amylose de type A nécessite des conditions où les cristaux se forment en solution aqueuse en présence d'un agent précipitant à basse polarité comme l'acétone ou l'éthanol (**Buléon *et al.*, 1984**). La croissance des cristaux résulte de la compétition entre les interactions hydrophobes (dues au précipitant qui limite la quantité d'eau) et hydrophiles (qui stabilisent les doubles hélices).

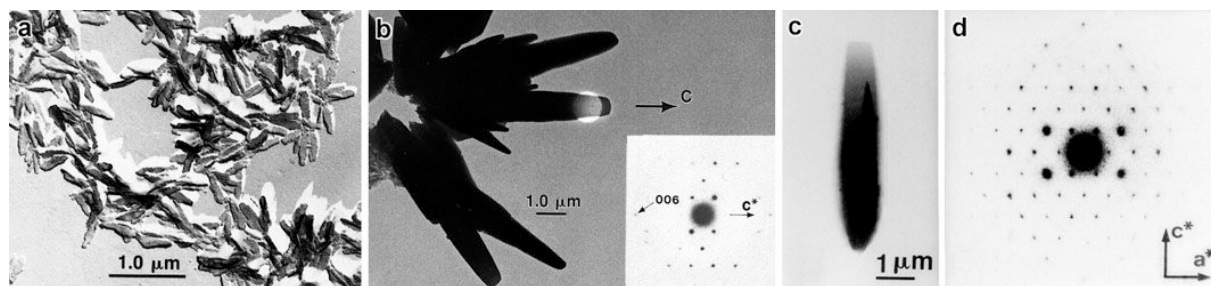


Figure I-30 : Microcristaux d'amylose de type A observés par microscopie électronique en transmission : a) après ombrage directionnel (de **Buléon *et al.*, 1984**) ; b,c) cristaux en champ clair ; d et insert en c) exemples de clichés de diffraction électronique enregistrés à partir de monocristaux (de **Imberty *et al.*, 1987**).

Les clichés de diffraction électronique des cristaux individuels montrent que l'axe *c* de la maille cristalline est parallèle à l'axe principal de l'ogive (**Buléon *et al.*, 1984; Imberty *et al.*, 1987**). Les doubles hélices d'amylose, parallèles à l'axe *c*, sont donc parallèles au grand

axe du cristal. Si l'on utilise de l'amylose de faible DP, les cristaux sont constitués d'hélices de longueur inférieure ou égale à l'épaisseur des lamelles cristallines et le repliement de chaîne, typique des cristaux de polymère à chaînes longues, n'est pas nécessaire.

Le premier modèle tridimensionnel de l'amylose A a été proposé par **Wu et Sarko (1977, 1978)** à partir de données de diffraction des rayons X de fibre collectées sur des films de triacétate d'amylose orientés et désacétylés sous tension. Ce modèle proposait une maille orthorhombique avec un arrangement antiparallèle des doubles hélices de chiralité droite.

En couplant ces données de diffraction de fibre à de nouvelles données de diffraction électronique (**Buléon *et al.*, 1984**), de diffraction des rayons X obtenues en déconvoluant les spectres de diffraction des rayons X de poudres, et une analyse conformationnelle, **Imberty *et al.* (1987, 1988)** ont proposé un nouveau modèle basé sur le groupe d'espace monoclinique B2 ($a=2,124$ nm, $b=1,172$ nm, $c=1,069$ nm et $\gamma=123,5^\circ$). Dans ce modèle, les doubles hélices sont de chiralité gauche et organisées parallèlement les unes par rapport aux autres. L'unité asymétrique est constituée par un maltotriose une molécule d'eau. Dans la maille monoclinique du type A, les doubles hélices voisines sont alternativement décalées de $+c/2$ et $-c/2$ le long de l'axe de l'hélice. La densité mesurée pour les monocristaux est de 1,48 (**Imberty *et al.*, 1988**) (Chap I, § 1.1.2.3).

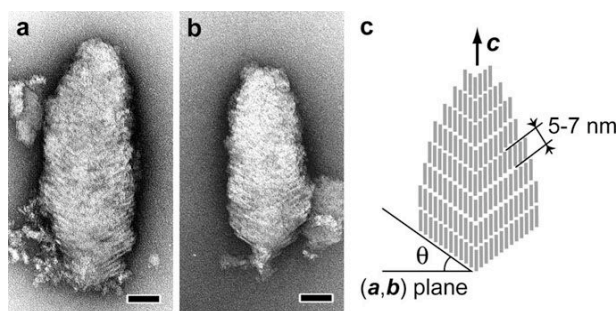


Figure I-31 : a,b) cristaux d'amylose A préparés à partir de solutions diluées en présence d'acétone, observés par MET après coloration négative (barre d'échelle: 50 nm) ; c) représentation schématique de l'organisation des doubles hélices (barres grises verticales) dans le cristal. (d'après **Pohu *et al.*, 2004a**).

Suite à l'observation par MET de cristaux de type A, **Pohu *et al.* (2004a)** ont révélé une organisation lamellaire. Chaque lamelle a une épaisseur de 5-7 nm (Figures I-31a et I-31b). Deux empilements symétriques de lamelles parallèles sont organisés des deux côtés du long axe de l'ogive. Les lamelles forment un angle de 58° - 60° avec l'axe. L'épaisseur d'une lamelle étant en accord avec la longueur d'une double hélice d'amylose de DP moyen 15. **Pohu *et al.***

(2004a) ont proposé une organisation moléculaire de doubles hélices parallèles à l'axe c du cristal (Figure I-31c). Si les hélices étaient toutes décalées de $+c/2$, les lamelles seraient inclinées d'un angle d'environ 27° par rapport au plan (a,b) . Cette valeur est très proche de l'angle de 30° - 32° (angle complémentaire de 58° - 60°) mesuré à partir des images de MET.

3.1.2. Type B

Des cristaux de type B peuvent être préparés dans des conditions similaires à celles utilisées pour former des cristaux d'amylose A mais en l'absence de précipitant. La suspension d'amylose (0,05% p/v) a été solubilisée à haute température (160°C) et conservée à 4°C durant des périodes de 6 mois à 2 ans (Buléon *et al.*, 1984). Le précipité lamellaire résultant n'a pas de forme géométrique clairement identifiable mais les clichés de diffraction électronique enregistrés sur des échantillons hydratés-congelés ont permis d'identifier des zones monocristallines. Les réflexions correspondent au plan $(hk0)$ du système hexagonal (Figure I-32).

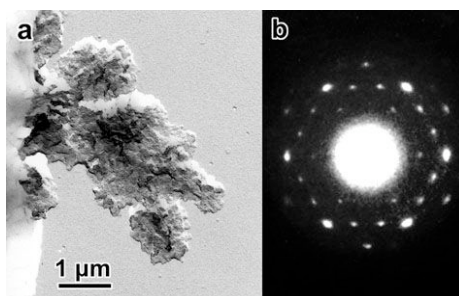


Figure I-32 : Cristaux lamellaires d'amylose B observés par MET (a) et cliché de diffraction électronique enregistré sur un cristal (b) (d'après Buléon *et al.*, 1984).

Pfannemüller et Bauercarnap (1977) avaient essayé d'obtenir des cristaux d'amylose de type B, mais avaient obtenu un précipité polycristallin. Buléon *et al.* (1984) ont pu, pour la première fois, obtenir et caractériser des monocristaux. Cette réussite est probablement due à l'utilisation de chaînes courtes d'amylose, qui permettaient la formation des cristaux de type B sans repliement de chaîne.

Le système cristallin couramment accepté pour le type B est hexagonal (Cleven *et al.*, 1978 ; Wu et Sarko, 1978a). La description de la maille cristalline a suivi une longue évolution. Non seulement la géométrie des modèles a été très discutée, mais aussi le nombre d'unités glucose à l'intérieur de la maille (Imberty et Pérez, 1988). De telles variations d'interprétation peuvent être expliquées par la grande influence des molécules d'eau contenues dans les cristaux (de 10    50% p/p).

Imberty et Pérez (1988), à partir des valeurs de diffraction de **Wu et Sarko, (1978a)**, ont proposé une nouvelle structure tridimensionnelle pour l'amylose B. A l'intérieur de la maille hexagonale ($a=b=1,85$ nm, $c=1,04$ nm), les doubles hélices gauches s'organisent parallèlement entre elles dans le groupe d'espace $P6_1$. L'unité asymétrique est un maltose et 12 résidus glucose se trouvent à l'intérieur de la maille hexagonale. 36 molécules d'eau trouvent place à l'intérieur du canal central formé par l'arrangement de 6 doubles hélices voisines, ce qui correspond à une hydratation de 27%. La moitié des molécules d'eau est liée aux doubles hélices, les molécules restantes n'étant liées qu'à d'autres molécules d'eau (cf. § 1.1.2.3)

3.1.3. Type V

Ce type cristallin fut mis en évidence en 1930 par Katz et van Itallie par précipitation d'un empois d'amidon par des alcools (V = *Verklesterung* pour reprécipitation). Plusieurs formes cristallines de type V peuvent être obtenues, cette multiplicité étant liée à la grande variété de complexants hydrophobes ou hydrophiles, inorganiques ou organiques qui peuvent s'associer à l'hélice de l'amylose (**Tomasik et Schilling, 1998a, 1998b**). La complexation de l'amylose est une forme d'encapsulation moléculaire et présente un intérêt pour les industries agroalimentaire et pharmaceutique, qui peuvent mettre à profit le processus de rétention ou relargage de molécules.

Les cristaux d'amylose de type V correspondent à des empilements d'hélices simples, d'ordre 6, 7 ou 8 (**Buléon et al., 2007**). Des trois allomorphes A, B et V, seul le type V conduit à une organisation en chaînes repliées typique des cristaux de polymère. **Gessler et al. (1999)** ont récemment montré que le repliement des simples hélices d'amylose était facilitée par le "flip", changement de conformation énergétiquement favorable correspondant à une rotation de 180° d'une unité glucose autour de la liaison osidique et conduisant à une inversion de la trajectoire moléculaire. L'existence de ce "flip" a été validée à partir de données de diffraction des rayons X, en montrant que des macrocycles d'amylose constitués de 26 unités glucose relaxaient en formant deux simples hélices d'ordre 6 antiparallèles.

A partir de solutions diluées, l'amylose forme des monocristaux lamellaires de type V de taille micrométrique et d'une épaisseur d'environ 10 nm (**Yamashita et al., 1973 ; Booy et Chanzy, 1979 ; Buléon et al., 1984 ; Whittam et al., 1989 ; Buléon et al., 1990 ; Welland et Donald, 1991 ; Cardoso et al., 2007**). Selon le complexant utilisé, on connaît cinq familles de cristaux de type V avec des morphologies et des diagrammes de diffraction distincts. La première, correspondant au type V_H (hydraté), présente une morphologie et un cliché de

diffraction de symétrie hexagonale (Figure I-31a). Les cristaux sont préparés par addition d'éthanol chaud ou d'acide gras à la solution aqueuse d'amylose (**Yamashita *et al.*, 1973 ; Whittam *et al.*, 1989 ; Welland et Donald, 1991**). Deux autres familles présentent une morphologie rectangulaire mais deux différents types de clichés de diffraction : le type $V_{\text{isopropanol}}$ (Figure I-31b), préparé en présence d'isopropanol ou d'autres complexants (**Buléon *et al.*, 1990 ; Nuessli *et al.*, 2000 ; Cardoso, 2007**), et le type V_{butanol} (Figure I-31c), qui résulte de l'addition du *n*-butanol ou *n*-pentanol (**Yamashita *et al.*, 1973 ; Helbert et Chanzy, 1994**). La quatrième famille est le type $V_{\text{glycérol}}$ (Figure I-31d) de forme carrée et formé à haute température, en présence de glycérol et en l'absence d'eau (**Hulleman *et al.*, 1996**). La cinquième famille est obtenue par complexation de l'amylose avec l' α -naphthol ou la quinoléine (type $V_{\alpha\text{-naphthol}}$) (Figure I-31e). Ces cristaux ont une forme carrée et un cliché de diffraction de symétrie tétragonale (**Winter *et al.*, 1998 ; Helbert, 1994 ; Cardoso *et al.*, 2007**).

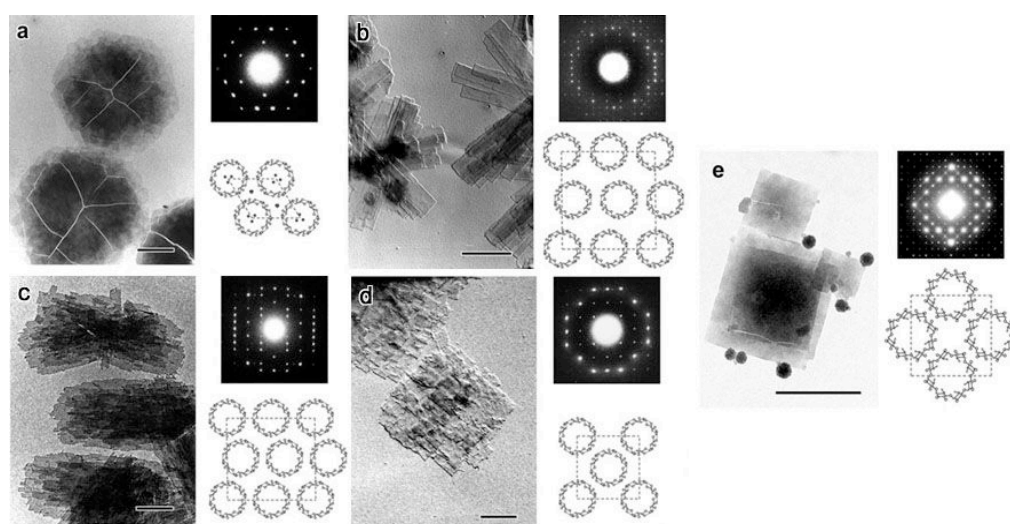


Figure I-33 : Images de MET de monocristaux d'amylose de type V, clichés de diffraction électronique et représentations schématiques de l'organisation des hélices correspondantes : a) V_H ; b) $V_{\text{isopropanol}}$; c) V_{butanol} ; d) $V_{\text{glycérol}}$; e) $V_{\alpha\text{-naphthol}}$ (d'après **Buléon *et al.*, 2007**).

La structure cristalline du type V_H correspond à un arrangement cristallin hexagonal d'hélices gauches constituées de six résidus glucose par tour avec des molécules d'eau inter- et intra-hélices (**Rappenecker et Zugenmaier, 1981 ; Brisson *et al.*, 1991**). Dans le cas du V_H , l'espace inter-hélices est restreint; mais des molécules complexées peuvent aussi s'organiser dans la cavité intra-hélicoïdale (**Godet *et al.*, 1993**). La déshydratation des cristaux d'amylose V_H produit une transition cristalline $V_H \leftrightarrow V_A$ (anhydre) réversible, correspondant au retrait

des molécules d'eau inter-hélices. Le séchage des cristaux de V_{butanol} , $V_{\text{isopropanol}}$ et V_{glycerol} produit une transition cristalline à l'état solide vers la structure du V_H qui suggère la présence des mêmes hélices d'ordre 6 que dans le V_H (**Buléon et al., 1990 ; Helbert et Chanzy, 1994 ; Hullemann et al., 1996**). Le $V_{\alpha\text{-naphthol}}$ est lui constitué d'hélices d'amylose à 8 unités glucose par tour, avec le complexant à l'intérieur et entre les hélices (**Yamashita et Monobe, 1971 ; Helbert, 1994 ; Cardoso et al., 2007**).

3.2. Sphérolites

Il est possible de préparer des sphérocristaux d'amylose de type A et B par précipitation de courtes chaînes linéaires en solution aqueuse concentrée (**Ring et al., 1987**). Plusieurs auteurs ont étudié la formation de sphérolites à partir d'amidon natif recristallisé (**Nordmark et Ziegler, 2002a, 2002b ; Ziegler et al., 2003 ; Ziegler et al., 2005**). La concentration requise pour former des sphérolites est d'au moins 5% (p/p) et la présence majoritaire de chaînes linéaires est favorable à la cristallisation.

Les sphérocristaux de type A sont obtenus par ajout d'un égal volume d'éthanol à 78°C à une solution aqueuse d'amylose minimum 5% (p/p) (**Ring et al., 1987 ; Helbert et al., 1993**). La surface de ces sphérolites est souvent rugueuse. Ils sont constitués d'une série de cristaux allongés en forme d'aiguille disposés radialement (**Helbert et al., 1993**) (Figure I-34a).

Dans ces sphérolites, l'axe des double hélices est aligné avec l'axe principal des blocs cristallins comme dans les monocristaux d'amylose A (**Buléon et al., 1984 ; Imberty et al., 1987, 1988**), ce qui leur confère une orientation radiale (**Helbert et al., 1993**) (Figure I-34b).

Les sphérocristaux d'amylose de type B sont préparés par précipitation de chaînes d'amylose en solution aqueuse concentrée sans l'ajout d'un précipitant (**Ring et al., 1987 ; Helbert et al., 1993 ; Planchot et al., 1997 ; Creek et al., 2006**). Les cristaux ont une forme ellipsoïdale et présentent deux orifices symétriques, l'axe passant par les deux orifices correspondant au plus petit axe de l'ellipsoïde (Figure I-34c) (**Helbert, 1994**). Ces sphérocristaux ont une figure de biréfringence très particulière, différente de la croix de Malte observée dans le cas des grains d'amidon ou des sphérolites positifs. Les sphérolites de type B possèdent une biréfringence négative, l'axe des chaînes étant tangentiels par rapport à la surface du sphérocrystal (Figure I-34c). (**Helbert, 1994**).

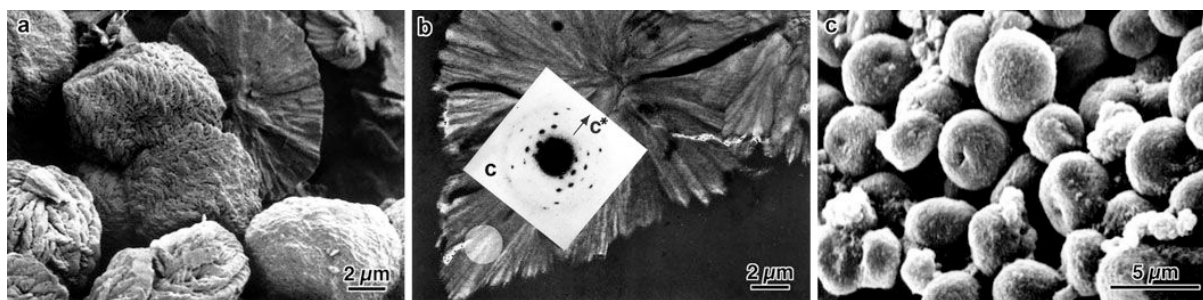


Figure I-34 : a) Image de MEB de sphérocristaux d'amylose de type A ; b) section de sphérocristaux préparée par ultramicrotomie et observée par MET en contraste de diffraction. En insert : cliché de diffraction électronique enregistré sur l'aire circulaire claire et convenablement orienté (de **Helbert et al., 1993**). c) Image de MEB de sphérocristaux d'amylose de type B (de **Helbert, 1994**).

3.3. Transition polymorphique B→A

Une transition polymorphique des grains d'amidon natifs de type B intervient lors d'un traitement à des températures de 100 à 120°C et à faible hydratation (18-24%), durant 18 à 24 h. Ce traitement est utilisé industriellement sous le nom de *heat-moisture treatment* (**Zobel, 1988 ; Stute, 1992 ; Hoover et Vasanathan, 1994 ; Lim et al., 2001**). La transition du type B vers le type A est plus rapide pour des objets constitués de chaînes plus courtes comme les lintners de pomme de terre de DP 15 (**Le Bail et al., 1993 ; Buléon et al., 1998**). Dans ce cas, la transition est induite par chauffage entre 88°C et 105°C (3°C/min), à une hydratation de 20 et 42%.

La distance d'environ 1 nm entre deux doubles hélices et le décalage de $c/2$ suivant l'axe de chaîne sont les mêmes pour les arrangements cristallins A et B. La transition du type B vers le type A, qui ne modifie pas l'association en paires des doubles hélices (duplex) (**Pérez et al., 1990 ; Imberty et al., 1991**), pourrait s'expliquer par un retrait progressif des molécules d'eau induisant une réorganisation des duplex et l'établissement d'un empilement plus compact. Un second mécanisme de transition a été proposé par **Buléon et al. (1998)** : une fusion des cristaux de type B suivie d'une recristallisation en type A. Les températures de fusion déterminées pour les sphérocristaux des deux allomorphes (**Whittam et al., 1990**) sont compatibles avec un tel mécanisme car la température de fusion des sphérolites de type B est inférieure de 20°C à celle des sphérolites de type A pour un même DP.

La transition polymorphique contraire, du type A au type B, ne peut pas avoir lieu sans la destruction de l'organisation dense des doubles hélices du type A et fait donc intervenir une recristallisation.

CHAPITRE II

MATÉRIEL, MÉTHODES ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1. SOURCES D'AMYLOSE ET METHODES DE PREPARATION

1.1. Amidons natifs

1.1.1. Sources d'amidon

Les amidons de pomme de terre et de maïs standard (Roquette Frères, Lestrem, France), et l'amidon de pois ridé (*Pisum sativum* L., variété Frogel., INRA Nantes) ont été utilisés comme matière première pour la préparation des courtes chaînes d'amylose branchées. L'amidon de pomme de terre et celui de pois ridé sont de type cristallin B et contiennent respectivement 20% et 75,4% d'amylose (Robin *et al.* 1974 ; Colonna *et al.*, 1982). L'amidon de maïs standard est de type cristallin A et contient environ 25% d'amylose. Nous avons aussi utilisé une fraction de maltodextrines issue de maïs standard, fournie par la société Roquette.

1.1.2. Hydrolyse acide des grains natifs

Les amidons subissent une hydrolyse acide ménagée à l'acide chlorhydrique en phase hétérogène. Les conditions de ce procédé, aussi appelé "lintnérisation" (Lintner, 1886), ont été détaillées par Robin *et al.* (1974) (HCl 2,2 N, 35°C, 40 jours) et conduisent à des dextrines dites "limites". Les hydrolyses ont été effectuées dans des Erlenmeyers de 500 mL dans un bain d'eau thermostaté. Chaque jour, les particules ont été remises en suspension en agitant manuellement chaque Erlenmeyer. Après 40 jours, les résidus insolubles ont été lavés à l'eau distillée par centrifugations successives dans une centrifugeuse Sigma 6K15 pendant 10 min, à une vitesse de 10000 tr.min⁻¹ (16200 g). Le pH a ainsi été ramené à celui de l'eau distillée. Les culots ont ensuite été récupérés sur verre fritté n°4 et lavés à l'éthanol absolu par filtration sous vide. Les résidus ont été séchés à l'air durant 3 jours et conservés à température ambiante. Les dextrines issues d'amidon de pomme de terre et préparées au cours de deux hydrolyse, seront notées **DLP(1)** et **DLP(2)**. Celles issues d'amidon de pois ridé seront notées **DLPR**.

1.1.3. Hydrolyse enzymatique et fractionnement

Principe

Les enzymes amylolytiques sont largement utilisées à l'échelle industrielle pour dégrader l'amidon. Les produits de dégradation sont caractérisés par la grandeur "dextrose équivalent" (DE) qui correspond au nombre de groupements réducteurs dans l'équivalent de 100 unités glucose de l'échantillon. Plus le DE est élevé, plus l'hydrolyse est avancée. Un DE de zéro représenterait l'amidon lui-même, un DE de 100 représenterait du dextrose pur, soit un amidon totalement transformé en glucose.

L'hydrolyse enzymatique est effectuée par l'action d'une α -amylase thermostable sur une suspension d'amidon gélatinisé. Cette endo-enzyme hydrolyse aléatoirement les liaisons $\alpha(1,4)$ des macromolécules telles que l'amidon et ses produits de dégradation. Les α -amylases ne peuvent pas hydrolyser la liaison $\alpha(1,6)$.

Le fractionnement des maltodextrines est effectué par chromatographie d'exclusion stérique sur gel (GPC). Le phénomène physique permettant la séparation des différentes macromolécules constituant le polymère n'est pas basé sur l'affinité chimique avec le support, mais simplement sur la taille des macromolécules (leur volume hydrodynamique). En effet, suivant leur taille, les molécules éluées peuvent ou non pénétrer dans les billes poreuses de gel dont sont remplies les colonnes. Ainsi, les molécules les plus petites sont retenues alors que les plus grosses sont éluées plus rapidement.

Matériel et mode opératoire

Des maltodextrines issues de l'hydrolyse enzymatique d'amidon de maïs standard ont été fournies par la société Roquette Frères, sous la référence MD03 (qui correspond actuellement au produit Glucidex 17 - DE 15-18). Le fractionnement de ces maltodextrines a été réalisé au CERMAV par Alain Heyraud. La séparation a été effectuée par chromatographie liquide d'exclusion stérique sur Biogel P-6 extra-fine (Biorad). Les maltodextrines ont ensuite été séchées par lyophilisation. Le produit obtenu par fractionnement des maltodextrines Roquette sera nommé **MDR**.

1.2. Amylose synthétique

L'amylose peut être synthétisée *in vitro* par voie enzymatique en utilisant l'amylosaccharase ou la phosphorylase. La synthèse enzymatique et le fractionnement des produits obtenus permettent la production de chaînes d'amylose de taille contrôlée, linéaires et relativement peu polydisperses.

1.2.1. Synthèse par l'amylosaccharase et fractionnement

Matériel

Le principe de la synthèse de maltooligosaccharides par l'amylosaccharase a été décrit dans le Chapitre I (§ 1.3.1.1). L'amylosaccharase de *Neisseria polysaccharea* a été produite sous forme recombinante chez *E. coli* par Gabrielle Potocki-Véronèse dans l'équipe de Catalyse et Ingénierie Moléculaire Enzymatiques du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP, INSA-INRA-CNRS) de Toulouse, suivant les méthodes

prises au point dans ce laboratoire (**Potocki de Montalk et al., 1999**). L'enzyme a été purifiée sous forme de protéine de fusion avec la Glutathion-S-Transférase (GST) par chromatographie d'affinité entre la GST et le support Glutathion-Sepharose 4B (**Potocki et al., 1999**). Dans le cadre de la présente étude, l'amylosaccharase a été utilisée sous forme de protéine de fusion avec la GST, puisqu'il a été montré que les propriétés catalytiques de cette enzyme sont identiques avec et sans étiquette GST.

Mode opératoire

Les fractions correspondantes seront nommées par la suite **ASA** (pour "amylose synthétique / amylosaccharase") avec l'indication des DP minimum et maximum des fractions. Un chiffre entre parenthèse permet de distinguer la synthèse prise en considération. Pour la production des fractions **ASA(1)**, **ASA(2)** et **ASA(3)**, les réactions d'accepteur sur le maltose ont été réalisées à 30°C pendant 24 h dans le tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,0), à partir de 600 mM de saccharose et de 100 mM de maltose, en utilisant 0,5 U/mL d'amylosaccharase purifiée. En fin de synthèse, le milieu réactionnel, resté soluble à 30°C, contient du fructose, du glucose et des maltooligosaccharides polydisperses de DP allant jusqu'à 30. Le fractionnement des maltooligosaccharides et l'élimination du fructose ont été réalisés par GPC sur des colonnes préparatives différentes selon les fractions. Un collecteur automatique a permis la récupération des fractions qui ont ensuite été analysées par HPAEC-PAD.

Les fractions nommées **ASA(1)** et **ASA(2)** ont été séparées par filtration sur gel sur une colonne préparative de 480 mL de Biogel P-6 extra-fine (Biorad). Les maltooligo-saccharides ont été élués à 60°C dans l'eau au débit de 0,66 mL/min. Les fractions **ASA(3)** ont été préparées en utilisant une colonne de filtration sur gel de dimension 120 mL de Biogel P-6 Fine (Biorad). Les polysaccharides ont été élués à 60°C dans l'eau au débit de 0,5 mL/min et des fractions de 14 mL ont été récupérées. Les fractions **ASA(1)**, **ASA(2)** et **ASA(3)** ont été obtenues en mélangeant les fractions contenant des maltooligosaccharides de DP identiques, de façon à obtenir entre 10 et 500 mg de produit lyophilisé.

La fraction **ASA(F1)** a été préparée par Cécile Albenne et Pierre Escalier au LISBP de Toulouse lors d'une étude antérieure. Cette fraction est issue d'une synthèse à 30°C de 48 h dans le tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7) à partir de saccharose et de maltose comme accepteurs, en utilisant 1,7 U/mL d'amylosaccharase purifiée. Deux réactions ont été réalisées dans un volume final de 40 mL chacune, en utilisant, pour la première, 300 mM de saccharose et 50 mM de maltose et, pour la seconde, 600 mM de saccharose et 100 mM de maltose. Après synthèse des maltooligosaccharides, glucose et fructose, les deux milieux réactionnels

ont été additionnés et fractionnés par filtration sur gel sur une colonne de 7 L de Biogel P-2 Fine (Biorad). Les maltooligosaccharides ont été élués à température ambiante dans l'eau au débit de 13 mL/min.

1.2.2. Mesure de l'activité de l'amylosaccharase

Une unité d'activité amylosaccharase standard correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la formation d'une micromole de fructose par minute. La détermination de l'activité initiale de l'amylosaccharase a été réalisée à 30°C dans le tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7), additionné de saccharose (50 g/L) et de glycogène (0,1 g/L) (Sigma). La concentration en fructose a été mesurée par la méthode à l'acide-3,5-dinitrosalicylique (DNS) (**Summer et Howell, 1935**). Le dosage de l'activité a été effectué durant 10 min. La réaction de synthèse enzymatique a été stoppée à des temps intermédiaires par dilution du milieu réactionnel (100 µL) dans le réactif basique contenant le DNS (100 µL). Après 5 min à 95°C et l'ajout de 1 L d'eau froide, l'absorbance a été mesurée à 540 nm par un spectrophotomètre. La courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant du fructose entre 0 et 2 g/L.

1.2.3. Synthèse par l'amidon-phosphorylase

Le principe de la synthèse de maltooligosaccharides par l'amidon-phosphorylase a été décrit dans le Chapitre I (§ 1.3.1.2). Les fractions d'amylose synthétisées par l'amidon-phosphorylase de pomme de terre ont été fournies par Shinichi Kitamura, de l'Université d'Osaka au Japon. Les échantillons d'amylose ont été synthétisés selon la méthode décrite dans la littérature (**Kitamura *et al.*, 1982 ; Nakanishi *et al.*, 1993**). Les produits seront nommés par la suite **ASP** (pour "amylose synthétique / phosphorylase").

2. TECHNIQUES DE DÉTERMINATION DES DEGRÉS DE POLYMÉRISATION

2.1. Chromatographie haute performance d'échange d'anions (HPAEC)

Principe

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés (positifs ou négatifs) fixes. Des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile. La séparation est basée sur cette propriété d'échange d'ions et ne peut donc s'appliquer qu'à des solutés ionisables. A pH basique supérieur à leur pKa, les glucides se comportent comme des acides faibles et sont donc chargés négativement.

Ils sont retenus sur une colonne constituée de billes greffées avec des groupements ammonium quaternaires. Le passage d'un contre-ion acétate de sodium induit la désorption des glucides fixés sur la colonne. En utilisant le passage d'un éluant à concentration variable en acétate de sodium, les molécules sont séparées selon leur degré d'ionisation.

La concentration en glucides est déterminée par oxydation des groupements alcools secondaires électrochimiquement actifs. Un potentiel permettant leur oxydation est appliqué entre une électrode en or et une électrode de référence. Le courant d'oxydation produit est proportionnel à la concentration en groupement alcools, donc à celle des glucides. L'électrode est soumise à 3 potentiels successifs selon un cycle répété environ 2 fois par seconde, pour éviter que les sucres ne se déposent en compromettant l'efficacité de la détection. Cette méthode est appelée détection par ampérométrie pulsée (PAD).

L'étalonnage est réalisé avec des maltooligosaccharides commerciaux (Sigma-Aldrich) de DP de 1 à 7 pour déterminer leur facteur réponse, et leur temps de rétention et attribuer, par incrémentation, les degrés de polymérisation aux pics des produits analysés.

Matériel et mode opératoire

Les produits solubilisés ont été filtrés sur filtre Millipore 0,45 µm. Le chromatographe liquide haute performance utilisé est un système Dionex équipé d'une colonne 4x250 mm Carbo-Pac PA-100. La détection est effectuée par un module Dionex ED40 avec une électrode de travail en or et une électrode Ag/AgCl de référence. Le débit de NaOH 150 mM est 1,0 mL/min et le gradient d'acétate appliqué est le suivant : 0-2 min : 115 mM ; 2-12 min : 115-225 mM ; 12-47 min : 225-300 mM ; 47-48 min : 300-300 mM ; 48-58 min : 115 mM.

Pour chaque DP_i, la concentration des maltooligosaccharides a été calculée en utilisant la relation linéaire entre le facteur réponse par mole des chaînes α(1,4) et leur degré de polymérisation (**Koch et al., 1998**). Les coefficients de la courbe ont été déterminés au moyen des standards d'oligosaccharides de DP de 2 à 7, utilisés pour quantifier le DP des produits plus longs. Les DP moyens en nombre, en masse et la polydispersité ont été calculés comme suit :

$$\overline{DP}_n = \frac{\sum_i C_i}{\sum_i \left(\frac{C_i}{DP_i} \right)} ; \overline{DP}_w = \frac{\sum_i (C_i * DP_i)}{\sum_i C_i} ; P = \frac{\overline{DP}_w}{\overline{DP}_n} \quad (\text{II-2})$$

où C_i est la concentration du spécimen i et DP_i , son degré de polymérisation.

2.2. Désorption-ionisation laser assistée par matrice - spectrométrie de masse MALDI-TOF

Principe

La technique MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight) est un couplage entre la technique MALDI (technique d'ionisation par matrice) et la spectrométrie de masse dite à temps de vol (TOF - time-of-flight mass spectrometry).

La désorption-ionisation laser par matrice est une technique d'ionisation douce permettant l'analyse de biomolécules. L'ionisation est provoquée par un faisceau laser. Une matrice, composée de cristaux d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), protège la biomolécule de la destruction par le faisceau direct et facilite la vaporisation et l'ionisation. La solution matrice est mélangée avec l'échantillon et déposée sur une coupelle. Le solvant se vaporise, laissant la matrice recristalliser, contenant les molécules d'analyte (dispersées dans tout le cristal). La matrice et l'analyte sont alors dits co-cristallisés dans un *spot* MALDI. Le laser est dirigé sur les cristaux. Le spot absorbe l'énergie laser et la matrice transfère une partie de sa charge au produit, le ionisant tout en le protégeant du laser.

Les ions observés après cette étape sont quasi-moléculaires, résultant de l'addition d'un proton ou d'un autre cation comme l'ion sodium, ou de la soustraction d'un proton par exemple. L'ionisation se fait en mode pulsé. La séparation des différents ions dans le spectromètre de masse à temps de vol est basée sur le fait que les ions avec un rapport masse/charge (m/z) différent se déplacent à des vitesses différentes. Tous les ions produits sont accélérés par un champ électrique puis traversent un tube où il y a absence de champ.

L'énergie cinétique ainsi appliquée E est égale à qV où q est la charge de l'ion et V est le potentiel appliqué. L'énergie d'un ion peut également s'exprimer en fonction de sa vitesse :

$$\frac{1}{2}mv^2 = qV \quad (\text{II-3})$$

où m est la masse de l'ion et v sa vitesse, celle-ci est égale à $\sqrt{\frac{2qV}{m}}$. Ce qui montre que les ions de masse plus faible se déplacent plus vite que ceux de masse plus élevée.

Matériel et mode opératoire

Les analyses ont été réalisées au moyen d'un spectromètre Maldi-Tof Autoflex Bruker. La matrice DHB et l'échantillon sont déposés en même quantité (environ 1 μL) sur la coupelle MALDI (méthode de la goutte sèche). Les deux substances sont mélangées et laissées à cristalliser. Le chauffage rapide de la matrice par le laser conduit à la désorption des molécules de l'échantillon complexées avec la matrice. Les molécules sont ionisées en mode pulsé et passent dans l'analyseur qui les sépare selon leur temps de vol (typiquement de 5 à 20 μs).

2.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Principe

La résonance magnétique nucléaire est une technique de spectroscopie qui repose sur la mise en résonance du noyau d'un atome par l'absorption de rayonnements électromagnétiques d'une fréquence spécifique en présence d'un fort champ magnétique. Des relations ont été établies empiriquement entre les déplacements chimiques (δ) des noyaux sur les spectres et la structure des molécules. Ainsi peuvent être déterminés l'environnement dans lequel se trouvent les noyaux, leur abondance relative, ou encore les paramètres géométriques les reliant ou le nombre et la nature de leurs liaisons.

Seuls les atomes dont le noyau possède un moment magnétique donnent lieu au phénomène de résonance magnétique, parmi lesquels le proton ^1H , le fluor ^{19}F , les isotopes de l'azote ^{14}N et ^{15}N . Par contre, le carbone ^{12}C , à cause de son moment magnétique nul, ne donne pas de signal de résonance. Pour cette raison, l'obtention d'un signal de résonance du carbone est limitée à son isotope ^{13}C (abondance naturelle 1,1%).

^1H est le noyau le plus sensible en RMN, la sensibilité du ^{13}C étant à peu près égale à 1/4 de celle de ^1H . En ajoutant la dilution isotopique, la perte de sensibilité entre les deux spectroscopies est vraiment importante. Pour pallier à cette perte de sensibilité, on utilise une technique d'accumulation du signal (RMN pulsée).

En matière de couplage (l'incidence d'un noyau sur son proche voisin), la situation est également assez particulière pour le ^{13}C car la présence dans la même molécule de plusieurs noyaux ^{13}C est peu probable alors que c'est une condition nécessaire pour générer des couplages homonucléaires entre ^{13}C . L'absence de couplage homonucléaire ouvre de nouvelles possibilités d'enregistrement des spectres RMN du ^{13}C , notamment il sera possible d'observer le spectre du ^{13}C totalement découplé ce qui est peu envisageable en RMN du ^1H . Grâce à la différence existante entre les fréquences de résonance des deux noyaux, compte tenu du domaine de résonance du ^1H et du ^{13}C , on peut intervenir sur le domaine d'un des noyaux sans perturber la résonance de l'autre. On peut donc envisager aussi un découplage hétéronucléaire total et obtenir un spectre dépourvu d'interaction spin-spin en ^1H et ^{13}C par irradiation de l'ensemble des fréquences spécifiques du ^1H .

Le découplage large bande ^1H permet aussi d'utiliser l'effet Overhauser nucléaire pour rendre plus sensibles les mesures de RMN du ^{13}C . Quand on irradie à la fréquence d' ^1H , l'intensité des pics du ^{13}C augmente à cause de l'amplification du signal de résonance de ce noyau due à la relation spatiale entre les spins proches mais sur des noyaux différents.

La RMN pulsée permet des accumulations rapides puisque l'impulsion d'excitation est très courte. Par contre, pour des analyses quantitatives en ^{13}C le délai séparant deux impulsions successives ne peut pas être raccourci car les noyaux les plus lents nécessitent un temps de relaxation avant de réitérer l'impulsion. Ce délai est appelé délai d'impulsion ou *Pulse Delay* (PD) et les spectres résultants "*Gate Inverse*". Avec cette méthode, les avantages des spectres pulsés et découplés sont conservés et une relaxation complète de tous les carbones est obtenue en appliquant un long PD. Nous avons utilisé cette technique pour déterminer le pourcentage de points de branchement (liaisons $\alpha(1,6)$) présents dans les fractions préparées par hydrolyse acide (DLP et DLPR) et enzymatique (MDR) (De Bruyn *et al.*, 1975 ; Heyraud *et al.*, 1979).

Matériel

Les spectres RMN en milieu liquide ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Bruker AC300 sonde dual (^1H - ^{13}C). Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm). Les échantillons DLPT, DLPR et ASA ont été analysés après échange proton $\leftrightarrow$ deutérium dans du diméthylsulfoxyde- d_6 et dans l'eau lourde (D_2O). L'échantillon MDR est analysé après échange dans l'eau lourde. Les mélanges sont introduits dans des tubes cylindriques en verre de 5 mm de diamètre.

La fréquence d'observation pour l'analyse ^1H était de 300,1362 MHz et 75,4763 MHz pour ^{13}C . Les mesures ont été effectuées à 60°C. La calibration a été effectuée en utilisant comme référence les solvants DMSO- d_6 (^{13}C 39,51 ppm, ^1H 2,5 ppm) et D_2O (^1H 4,8 ppm) selon les valeurs Euriso-top (Saint-Aubin, France). En règle générale, les fenêtres spectrales (SW) utilisées étaient de l'ordre de 10 ppm en proton et de 20 ppm en ^{13}C . Nous avons utilisé le logiciel NTNMR (Tegmag, Houston) pour acquérir et traiter des spectres.

Mode opératoire

Pour l'analyse ^1H standard, 5 mg d'échantillon ont été dilués dans 500 μL de D_2O ou de DMSO- d_6 . Pour l'analyse quantitative en ^{13}C , l'échantillon (environ 60 mg) a été solubilisé dans 500 μL de DMSO- d_6 . A la séquence d'impulsion standard a été ajoutée, pendant la durée de l'expérience, une impulsion composite de découplage (5 fois le temps de relaxation) qui permet d'éliminer les couplages ^1H - ^{13}C et de conserver l'effet Overhauser nucléaire sans interférence.

3. PROTOCOLES DE CRISTALLISATION

3.1. Cristaux d'amylose A

Principe

Le protocole de préparation de monocristaux d'amylose A est basé sur la méthode décrite par **Buléon *et al.* (1984)** et **Imberty *et al.* (1988)**. Les cristaux sont préparés par diffusion, à l'intérieur d'une enceinte fermée, de vapeurs d'acétone dans une solution très diluée (0.05 à 0.1%) de chaînes d'amylose de DP 15 obtenues par hydrolyse acide ménagée de grains d'amidon de pomme de terre. Des cristaux de type A se forment lors du refroidissement au dessous de 60°C, température de cristallisation de l'amylose.

Dans cette étude, nous avons repris ce protocole, tout en contrôlant plus précisément la cristallisation et les paramètres impliqués, tels que la température, le flux et la quantité d'acétone, l'homogénéisation de la solution, la détection de la nucléation et le refroidissement.

Matériel

- flacon de verre avec bouchon haute pression
- filtre Sartorius Minisart RC 25 (porosité 0,2 μm , haute température)
- seringue en verre de 15 mL
- bain d'huile thermostaté
- ballon fond rond tricol de 100 mL et ballon de 100 mL
- thermomètre en métal (précision $\pm 2^\circ\text{C}$)

Mode opératoire

L'amylose a d'abord été dispersée dans l'eau (0,05% p/v) dans un flacon en verre à température ambiante. L'oxygène dissout a été éliminé par bullage d'azote gazeux dans la suspension pendant 20 min. Le flacon a ensuite été scellé à l'aide d'un bouchon haute pression et chauffé à 150°C par immersion dans un bain d'huile. Après 15 min la solution obtenue a été refroidie à 80°C et filtrée à l'aide d'une seringue en verre sur un filtre à 0,2 μm préchauffé. La solution filtrée a été placée dans un second flacon en verre haute pression et réchauffée par immersion à 150°C pendant 15 min.

La solution finale a été refroidie à environ 62°C puis placée dans un ballon tricol préchauffé à la même température par immersion dans un bain d'huile thermostaté (Figure II-1). La solution a été maintenue sous légère agitation magnétique. En parallèle, l'acétone a été placée dans un ballon de 100 mL relié au ballon tricol par une tubulure en verre. Le tube par lequel arrive l'acétone a été chauffé à $T > 70^\circ\text{C}$ à l'aide d'une résistance

enroulée autour de la verrerie. Dans ces conditions, l'acétone arrivait à l'intérieur du ballon tricol en phase vapeur (température d'ébullition de l'acétone 70°C).

La cristallisation a été induite par refroidissement à vitesse contrôlée et visualisée à l'aide du faisceau laser d'un pointeur (Figure II-2). Le faisceau laser est bien visible à l'intérieur du ballon quand les cristaux commencent à se former alors que la solution semble encore claire à l'œil nu. Les cristaux ont ensuite été stockés à 4°C dans leur liqueur mère.

Dans le cas de la nucléation hétérogène, pour laquelle la nucléation a été induite par des microcristaux de cellulose, 100 à 200 μL d'une solution de whiskers de tunicine (0,18% p/p) réchauffée (environ 70°C) ont été ajoutés à l'intérieur du ballon tricol contenant la solution d'amylose à 60°C. La cristallisation s'est poursuivie de la même façon qu'en absence de cellulose.

Pour les cristallisations induites par des surfaces, la forme du réacteur a aussi permis de plonger une partie d'une lame de verre ou de mica dans la solution d'amylose (Figure II-3).

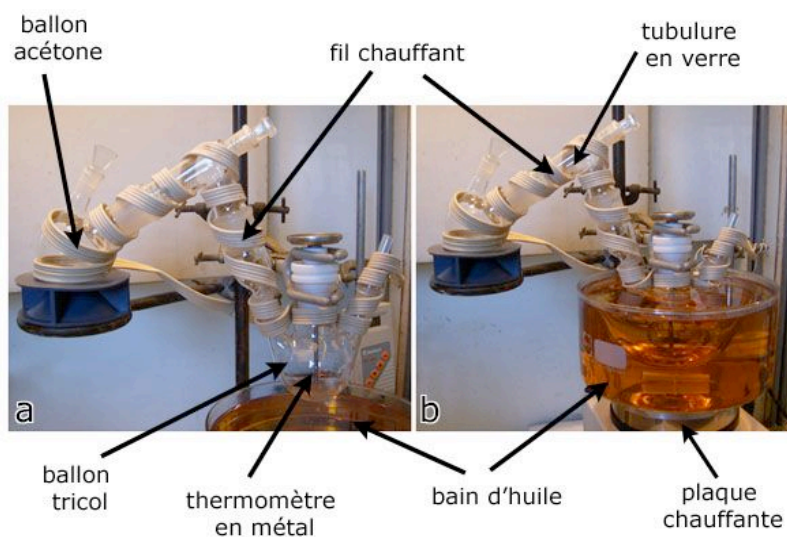


Figure II-1 : Réacteur de cristallisation (a) avant et après (b) immersion dans le bain d'huile.

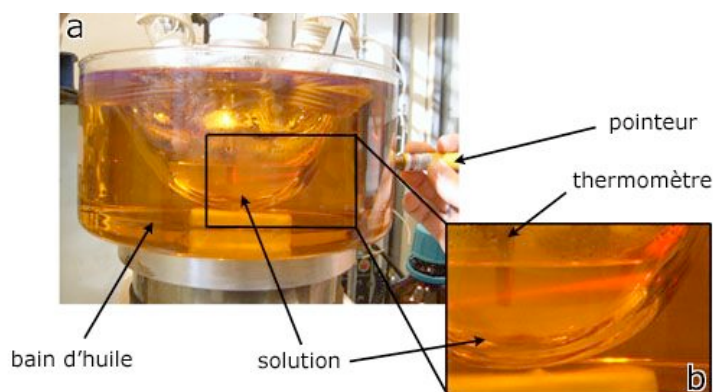


Figure II-2: a) Visualisation du faisceau laser à l'intérieur de la solution.

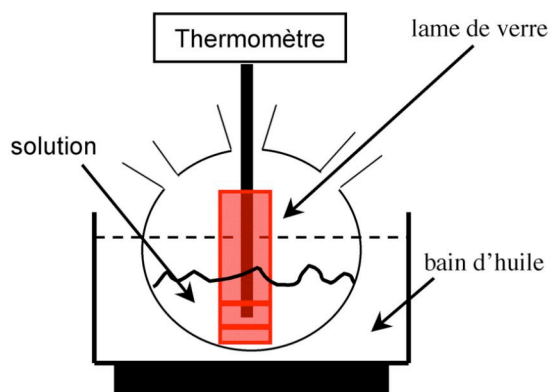


Figure II-3 : Schéma du réacteur de cristallisation contenant une lame de verre.

3.2. Sphérocristaux d'amylose de type A et B

Principe

Les sphérocristaux d'amylose de type B sont préparés par précipitation de courtes chaînes d'amylose en solution aqueuse (**Ring *et al.*, 1987 ; Nordmark et Ziegler, 2002 ; Creek *et al.*, 2006**). Les sphérocristaux de type A peuvent être obtenus par ajout d'un égal volume d'éthanol à la solution aqueuse initiale chauffée (**Ring *et al.*, 1987 ; Helbert *et al.*, 1993**).

Matériel

- flacon en verre avec bouchon haute pression.
- filtres Sartorius Minisart RC 25 (porosité 0,45 μm , haute température).
- seringue en verre de 15 mL.
- éthanol.

Mode opératoire

La suspension aqueuse de courtes chaînes d'amylose (de 5 à 10% p/v), après dégazage à l'azote pendant 20 min, a été chauffée dans un flacon en verre avec bouchon résistant à haute pression pendant 15 min à 150°C par immersion dans un bain d'huile. Elle a ensuite été filtrée à chaud sur un filtre Sartorius Minisart RC préchauffé à 80°C. Cette solution a été refroidie de 80°C à 5°C dans un flacon en verre. La cristallisation a conduit à l'allomorphe B. La cristallisation des sphérocristaux d'amylose de type A a été obtenue par l'addition à 78°C d'un volume d'éthanol égal au volume de la solution d'amylose. Après une nuit de précipitation, les sphérocristaux ont été centrifugés et conservés à 2°C dans l'eau distillée ou dans le mélange eau/éthanol pour les sphérocristaux de type A.

4. SUBSTRATS POUR LA NUCLÉATION HÉTÉROGÈNE

4.1. Microcristaux de cellulose

Principe

L'hydrolyse acide des microfibrilles de cellulose au niveau de zones plus désorganisées permet d'obtenir des nanocristaux plus courts aussi appelés "*whiskers*". Dans cette étude, les whiskers ont été obtenus par hydrolyse à l'acide sulfurique. L'acide sulfurique, contrairement à l'acide chlorhydrique, permet de greffer à la surface des nanocristaux des groupements SO_3^- . Les forces de répulsion électrostatique qui s'exercent entre ces groupements permettent la mise en suspension dans l'eau des whiskers sans l'apparition du phénomène de floculation (Marchessault *et al.*, 1959). La densité de charge peut être estimée à environ $0,2$ groupement/ nm^2 , soit 1 groupement pour 10 résidus anhydroglucose de surface.

Matériel

La cellulose utilisée dans cette étude provient du tunicier (*Halocynthia roretzi*), un animal marin qui sécrète dans son épiderme la tunicine, un tissu riche en cellulose (Figure II-4a). La préparation des microcristaux de cellulose implique successivement un lavage préliminaire et un blanchiment de la cellulose avant l'hydrolyse proprement dite. La suspension de whiskers à 0,18% (p/p) a été préparée par Grégory Chauve (CERMAV) selon le protocole suivant.

Mode opératoire

Les microcristaux de cellulose ont été préparés selon le protocole mis au point par Revol *et al.* (1992). Les tuniciers (1 kg environ) coupés et nettoyés à l'eau sont laissés 1 nuit dans une solution aqueuse de KOH à 5% à température ambiante. Après lavage à l'eau distillée, les morceaux sont blanchis trois fois sous agitation 2 h à 80°C à l'aide d'une solution constituée de 1 L de solution de chlorite de sodium à 1,7% (p/v) et 1 L d'une solution tampon acétate à pH 4,5 (27 g de soude et 75 mL d'acide acétique complétés à 1 L avec de l'eau distillée).

Les morceaux sont ensuite désintégrés en suspension dans l'eau distillée par 20 passages de 1 min dans un mixeur Waring Blender. A la suspension aqueuse floculante ainsi obtenue sont ajoutés de l'eau distillée (200 g de produit pour 150 g d'eau distillée) et de l'acide sulfurique à 95% au goutte à goutte (1 mL par g de mélange), dans un bain de glace. La suspension est ensuite chauffée sous agitation mécanique pendant 40 min au bain-marie à une température variant de 60 à 80°C. Le mélange résultant est filtré sur un fritté n°4 et lavé plusieurs fois à l'eau distillée pour éliminer l'acide jusqu'à obtention de la neutralité. Le mélange est alors soniqué (sonde plongée dans la solution) avec un Sonicator Ultrasonic

Liquid Processor XL2020 de Misonix (550 W, 20 Hz) puis filtré sur un fritté n°1. Pour éliminer les ions présents en solution, la solution est passée sur une résine mixte échangeuse d'ions (Duolite MB6113, 1 g pour 400 g de suspension) pendant 1 h sous agitation magnétique. La suspension est filtrée pour éliminer les billes de résine et centrifugée pour éliminer les agrégats. Les whiskers obtenus ont une longueur moyenne de 1 à 2 μm (Figure II-4b) et un diamètre de 15 à 20 nm (de Sousa Lima *et al.*, 2002).

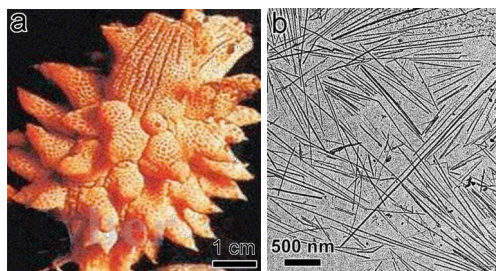


Figure II-4 : a) Tunicier du Japon (*Halocynthia roretzi*) ; b) whiskers de cellulose de tunicier observés par microscopie électronique en transmission (cliché H. Chanzy).

4.2. Muscovite

La muscovite, de formule $KAl_2(AlSi_3O_{10})(OH)_2$, est un silicate appartenant au groupe des micas. Elle cristallise dans le système monoclinique à base centrée. Elle est composée de feuillets de silicates d'une épaisseur de 10 Å environ, reliés par une couche de potassium, et qui s'empilent selon l'axe c du système monoclinique (Figure II-5a). Des tétraèdres ZO_4 ($Z=Al$ ou Si) forment des couches de composition $[AlSi_3O_{10}]_n$ en liant trois de leurs sommets respectifs. Les atomes d'oxygène impliqués dans ces liaisons forment un assemblage hexagonal (Figure II-5a). Les autres atomes d'oxygène, aux sommets des tétraèdres ne sont pas liés. Deux couches tétraédriques sont superposées, les sommets (encore libres) des tétraèdres pointant vers l'intérieur. Elles déterminent ainsi des lacunes octaédriques remplies aux deux tiers par des atomes d'aluminium. Chaque atome de potassium est logé dans une grosse cavité formée par deux hexagones d'oxygène en vis-à-vis. La liaison K-O est faible et facilement brisée. De ce fait, la muscovite peut se cliver sans efforts dans le plan (001). Dans ce plan basal, les atomes d'oxygène forment des hexagones déformés à cause de la différence de dimensions entre une couche de tétraèdres et une couche d'octaèdres, composés de deux triades d'atomes d'oxygène qui ont effectué une rotation de 13° par rapport à un axe normal au feuillet (Figure II-5a). La Figure II-5b montre 3 axes où se situent ces atomes. De plus, **Dorel (2000)** a montré qu'une nanostructuration de la couche superficielle avait lieu après un clivage de la muscovite à l'air.

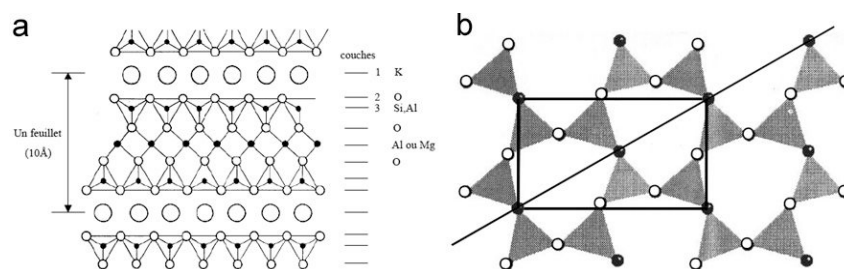


Figure II-5 : a) Structure d'un feuillet de muscovite et positionnement des atomes dans les différentes couches ; b) projection orthogonale des oxygènes basaux sur le plan (001). Les atomes d'oxygène sont représentés soit en blanc soit en noir selon le plan auquel ils appartiennent. (de Dorel, 2000).

5. TECHNIQUES DE CARACTERISATION

5.1. Microscopie optique en lumière polarisée

Principe

Un rayon lumineux est composé de trains d'ondes, c'est à dire de vibrations périodiques d'un champ électrique et d'un champ magnétique. Le rayonnement électromagnétique a comme vecteur le photon. Chaque photon vibre dans un plan déterminé, le plan de polarisation, et est donc polarisé, mais la lumière, étant constituée de plusieurs photons qui vibrent dans différent plans, est globalement non polarisée.

Un polariseur est un filtre qui convertit un faisceau contenant plusieurs polarisations en un faisceau polarisé dans un seul plan. Ce filtre ne transmet que les composantes des trains d'ondes incidents dont le vecteur E vibre parallèlement à une direction déterminée. Lorsque l'on place un second polariseur (appelé analyseur) à la suite du premier si l'amplitude du champ électrique après le polariseur est E_0 , l'amplitude à la sortie de l'analyseur sera $E_0 \cos \theta$ (avec θ l'angle entre les directions du polariseur et de l'analyseur). L'intensité sera $I_0 \cos^2 \theta$ où I_0 est l'intensité à la sortie du polariseur. L'intensité est maximum si les directions de polarisation sont parallèles. Elle est nulle si $\theta = 90^\circ$ (polariseurs croisés) (Figure II-6).

L'indice de réfraction est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et dans un objet. Dans un corps isotrope, l'indice de réfraction est unique quelle que soit la direction. Les polymères cristallins sont optiquement anisotropes. Leur indice de réfraction varie selon les directions cristallographiques. Ils sont donc biréfringents. On les caractérise par 2 indices de réfraction: $n_{//}$, indice de réfraction parallèle à l'axe de chaîne et $n_{\perp}$, perpendiculaire. L'axe de chaîne d'un polymère, en général possède l'indice de réfraction le plus élevé.

Un microscope à lumière polarisée est un microscope optique muni de deux filtres polarisants. Lorsqu'un rayon lumineux pénètre dans un cristal, il se dédouble en deux rayons (ordinaire et extraordinaire) de polarisation différente, à 90° l'un par rapport à l'autre, qui se propagent avec une vitesse différente (biréfringence) (Figure II-7a). C'est un phénomène de rotation de polarisation. L'analyseur placé après le cristal sélectionne à nouveau les rayons lumineux selon leur polarisation. Ainsi, selon la quantité dont a tourné la polarisation, le cristal apparaît plus ou moins lumineux (Figure II-7b). La biréfringence est indépendante de la longueur d'onde de la lumière polarisée incidente. Cependant, l'onde lumineuse transmise par le cristal voit sa longueur d'onde diminuer en fonction de l'orientation de son plan de polarisation avec les chaînes de polymère. Une lame de retardement λ après le polariseur peut être utilisée pour déterminer le retard relatif entre les deux rayons induit par la biréfringence de l'échantillon.

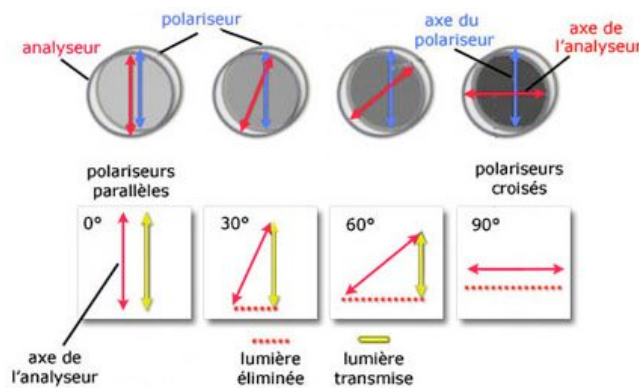


Figure II-6 : Représentation schématique de la lumière transmise (en niveaux de gris) par un analyseur en fonction de l'angle de rotation de son axe par rapport à celui du polariseur.

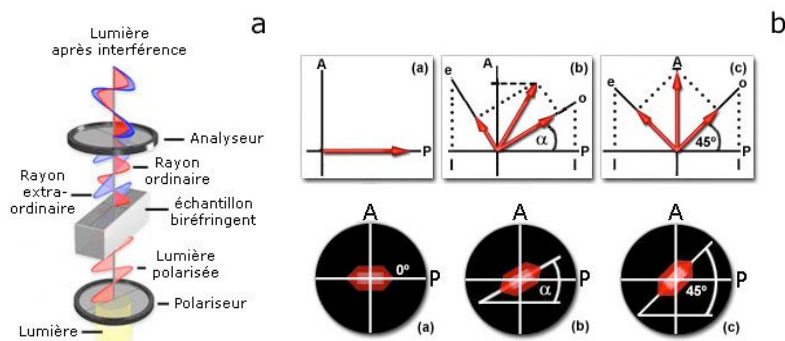


Figure II-7 : a) schéma des interactions lumière/filtres polarisants/cristal ; b) rotation (0° , $\alpha < 45^\circ$ et 45°) d'un cristal biréfringent en lumière polarisée. Schéma vectoriel des rayons ordinaire (o) et extraordinaire (e). L'axe du polariseur est indiqué par la lettre P et celui de l'analyseur par A.

Un rayon incident polarisé entre dans la lame de retardement perpendiculairement à l'axe optique et est séparé en ses composantes. A cause de la différence d'indice de réfraction introduite, un des rayons a un retard de phase. Les rayons sortants sont alors polarisés. La lame est positionnée à 45° par rapport à l'axe de transmission de la lumière du polariseur et de l'analyseur (Figure II-8). Elle introduit un retardement d'une longueur d'onde entre le rayon ordinaire et le rayon extraordinaire. La longueur d'onde du vert (550 nm) sort de la lame toujours polarisée et parallèle au polariseur. Ces rayons sont donc perpendiculaires à l'analyseur et sont ainsi bloqués (Figure II-6). Les rayons orthogonaux de toutes les autres longueurs d'onde possèdent un retard de phase et subissent une rotation de polarisation. Ces rayons possèdent un vecteur d'onde parallèle à l'analyseur. La lame λ soustrait la longueur d'onde du vert (550 nm) à la lumière blanche polarisée ce qui la transforme en magenta-rouge. C'est le résultat de la combinaison des longueurs d'onde de la lumière blanche moins la longueur d'onde du vert.

Quand un échantillon biréfringent est inséré dans le chemin optique avec un axe optique (l'axe des chaînes d'un polymère, par exemple) parallèle à la lame, le retard relatif des rayons orthogonaux augmente. La couleur rouge se décale vers des longueurs d'onde plus grandes. Les rayonnements bleu et vert traversent l'analyseur et se combinent en donnant une couleur bleu. La rotation de l'échantillon de 90° change les relations géométrique entre l'axe optique et la lame λ , qui sont maintenant perpendiculaires. Dans ce cas, le retard des rayons orthogonaux est diminué et les longueurs d'onde plus courtes (bleu) sont absorbées par l'analyseur. Le vert et le rouge passent l'analyseur et se combinent en donnant la couleur jaune (Figure II-8).

La biréfringence d'un sphérocrystal est définie par $n_r - n_t$, l'indice de réfraction radial (parallèle au rayon du sphérocrystal) – indice de réfraction tangentiel (perpendiculaire au rayon du sphérocrystal). Un sphérocrystal avec une biréfringence positive possède donc un n_r supérieur à n_t . L'axe de chaîne d'un polymère possède normalement l'indice de réfraction plus élevé. Si les chaînes de polymère à l'intérieur d'un sphérocrystal sont orientées radialement, l'indice de réfraction radial est plus élevé et le sphérocrystal sera positif. Si, au contraire, les chaînes sont normales au rayon du sphérocrystal, l'indice de réfraction tangentiel est plus élevé et la biréfringence est négative.

L'amidon est composé principalement d'amylose et d'amylopectine dont l'axe de chaînes est orienté radialement dans le grain. Il est donc comparable à un sphérocrystal positif (**French, 1972**). La biréfringence d'un grain d'amidon ou, plus généralement, des sphérolites, est caractérisée par l'observation, quand le polariseur et l'analyseur sont perpendiculaires, sans lame de retardement, d'une croix de Malte sombre (**Ring et al., 1987 ; Creek et al., 2006**).

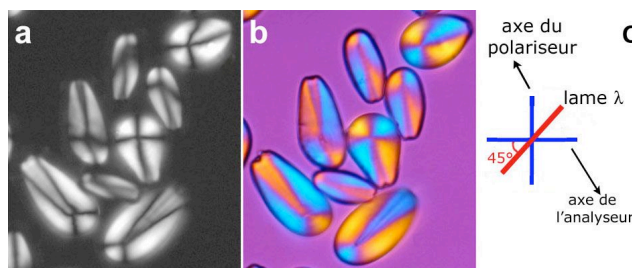


Figure II-8 : Observation par MOLP de grains d'amidon d'avocat. a) sans et b) avec lame de retardement λ . c) Représentation schématique de la position de la lame λ par rapport à l'axe de transmission du polariseur et de l'analyseur.

Matériel

- microscope optique Carl Zeiss Axiophot II (Le Pecq, France) équipé d'une caméra SIS ColorView 12 CCD pilotée par le logiciel AnalySIS.

- objectifs de grossissement 2,5×, 10×, 40×.

- compensateur (lame de retardement) λ .

Mode opératoire

Les échantillons en suspension ont été déposés entre lame et lamelle de verre. Les images ont été enregistrées, après rotation de l'échantillon par rapport au plan de polarisation, pour visualiser l'orientation moyenne des chaînes d'amylose à l'intérieur des cristaux.

5.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

5.2.1. Principe général

La microscopie électronique à balayage consiste à observer la surface d'un échantillon à l'aide d'un faisceau focalisé d'électrons accélérés à des tensions typiques de 5 à 30 kV. La surface de l'échantillon balayée par le faisceau d'électrons réémet des électrons (rétrodiffusés, secondaires), des électrons Auger (effet Auger) et des rayons X (Figure II-9). Ces différentes particules ou rayonnements apportent différents types d'informations sur la matière dont est constituée l'échantillon.

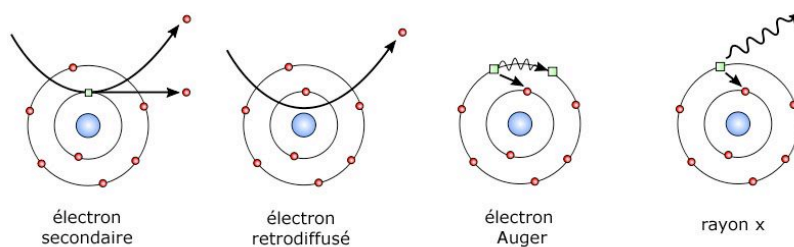


Figure II-9 : Schéma des interactions électrons-matière.

Un électron du faisceau incident peut céder une partie de son énergie à un électron de la bande de conduction des atomes de l'échantillon, provoquant une ionisation par éjection de cet électron qui est appelé "secondaire". Ces derniers possèdent une faible énergie (typiquement de 5 à 50 eV) et sont souvent émis d'une profondeur inférieure à 10 nm. Collectés par un détecteur polarisé, ils peuvent être facilement stoppés par les irrégularités de la surface. Les images obtenues sont donc un bon reflet de la topographie de l'échantillon.

Interagissant de manière quasi-élastique avec les atomes de l'échantillon, les électrons rétrodiffusés repartent dans une direction proche de la direction incidente, avec une énergie proche de leur énergie initiale. Interagissant avec des atomes situés à une plus grande profondeur dans l'échantillon, ils sont plus particulièrement sensibles au numéro atomique. Les atomes qui contiennent un nombre important de protons réémettent plus d'électrons que les atomes plus légers. L'imagerie en électrons rétrodiffusés permet donc d'évaluer l'homogénéité chimique de la surface d'un échantillon.

Quand un électron d'une couche profonde est éjecté suite à l'interaction avec des électrons primaires, l'atome entre dans un état excité. Lors de la désexcitation, un électron d'une couche supérieure vient combler la lacune créée par l'électron éjecté. Durant cette transition, l'électron périphérique perd une certaine quantité d'énergie qui peut être émise sous forme de photon X ou être transmise à un électron d'une orbite plus externe. Cet électron périphérique se retrouve à son tour éjecté et peut être collecté par un détecteur.

L'analyse des rayons X émis par l'échantillon permet d'obtenir des informations sur la nature chimique des atomes. Les électrons Auger possèdent une très faible énergie et, en étant eux aussi caractéristiques de l'atome qui les a émis, ils permettent d'obtenir des informations sur la composition de l'échantillon et de sa surface ainsi que sur le type de liaison chimique.

Un MEB est essentiellement constitué d'un canon à électrons, de lentilles électromagnétiques et de détecteurs permettant de détecter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. Une platine porte-objet permet de déplacer l'échantillon selon trois directions et en rotation. L'appareil est équipé d'un système de pompe à vide.

5.2.2. Microscopie électronique à balayage avec filament thermoïonique

Dans cette étude, nous avons utilisé un microscope équipé d'un canon à électrons à filament de tungstène et d'un détecteur d'électrons secondaires (Figure II-10). Le tungstène est utilisé en raison de son faible travail de sortie, c'est-à-dire de l'énergie nécessaire pour extraire un électron de la cathode. Cette énergie est apportée en chauffant la cathode à une

température suffisamment élevée (typiquement 2700°C) pour que des électrons acquièrent l'énergie suffisante pour franchir la barrière de potentiel qui les maintient dans le solide.

Les électrons secondaires, qui proviennent de zones proches de la surface, souvent à une profondeur inférieure à 10 nm, sont accélérés vers un détecteur polarisé. L'intensité du signal électrique résultant dépend de la nature chimique de l'échantillon, qui détermine le rendement en électrons secondaires, et de sa topographie.

Les échantillons secs et non-conducteurs sont recouverts d'une fine couche de métal (5 nm) pour donner une conductivité électrique permettant l'émission d'électrons secondaires. Cette métallisation permet aussi de prévenir le phénomène de charge induit par le faisceau primaire et de limiter les artéfacts. La métallisation est effectuée par pulvérisation cathodique, qui consiste à déposer sur l'échantillon des atomes arrachés à un filament de métal par de l'argon ionisé dans une enceinte sous vide partiel. Les métaux utilisés sont de l'or, du platine ou du palladium en raison de leur facilité à émettre des électrons secondaires.

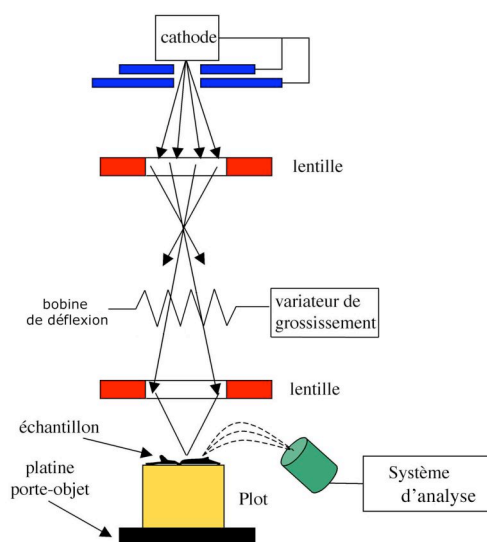


Figure II-10. Représentation schématique du microscope à balayage.

Matériel

La métallisation des cristaux a été effectuée à l'aide d'un évaporateur JEOL JFC-1100 (Au/Pd). Les observations ont été réalisées au moyen d'un microscope JEOL JMS-6100, équipé d'un détecteur à électrons secondaires. Les images ont été acquises sous forme numérique à l'aide du système ADDA II de SIS (Allemagne), piloté par le logiciel Scandium.

Mode opératoire

Une goutte de suspension de cristaux a été déposée sur un plot en cuivre. Après 12 h de séchage à l'air, l'échantillon a été métallisé sous atmosphère d'argon durant 180 s à 10 mA, ce qui a formé une couche d'Au/Pd de 5-6 nm d'épaisseur. Les observations ont été réalisées en électrons secondaires à une tension d'accélération de 8 kV. Les cristaux ayant été formés sur des lames de verre ou de mica ont été directement métallisés sur les lames.

5.2.3. Microscopie électronique à balayage avec canon à effet de champ (MEB-FEG)

Le canon à émission de champ (FEG en anglais pour *field emission gun*) utilise une cathode métallique en forme de pointe très fine. On applique une tension de 2000 à 7000 V entre la pointe et l'anode. On produit ainsi un champ électrique très intense, de l'ordre de 100 V/cm, à l'extrémité de la cathode. On peut utiliser une émission de champ à froid, où la pointe reste à température ambiante, ou une émission de champ assistée thermiquement, où la pointe est chauffée à 1800°C. Les électrons sont extraits de la pointe par effet tunnel.

Le gros avantage des canons à émission de champ est une brillance qui est de 100 à 1000 fois plus importante que celle des cathodes thermoïoniques, ce qui les rend particulièrement adaptés aux applications à basse énergie d'impact, c'est-à-dire inférieure à 6 keV.

Matériel

Les observations ont été réalisées avec un microscope JEOL JSM 7000F équipé d'un détecteur d'électrons secondaires (mode SEI) (test d'équipement organisé par la société JEOL). Dans certains cas les plots ont été métallisés (Pt-Pd) à l'aide d'un évaporateur JEOL. Des observations ont été aussi réalisées au Consortium des Moyens Technologiques Communs de Grenoble avec un microscope ZEISS Ultra 55. Dans ce cas, les plots ont été métallisés (Au-Pd) au moyen d'un évaporateur JEOL JFC-1100.

Mode opératoire

Les cristaux sont déposés sur un plot en cuivre. Après 12 h de séchage à température ambiante, l'échantillon peut être observé sans métallisation. La tension d'accélération des électrons est fixée à 1 ou 0,8 kV à une hauteur de 6 mm (WD). Pendant le test d'équipement organisé par la société JEOL, dans certains cas, pour augmenter l'émission de l'échantillon et la tension d'accélération à 1,5 kV, les plots sont métallisés au Pt-Pd.

5.3. Microscopie électronique en transmission (MET)

Principe

La microscopie électronique en transmission permet d'observer des échantillons très minces (quelques centaines de nm d'épaisseur) à une échelle nanométrique. Contrairement au cas du MEB, les électrons du MET forment une image globale de l'objet traversé. On utilise un faisceau d'électrons fortement accélérés (typiquement 80-200 keV) qui traverse l'échantillon.

La colonne du microscope est constituée d'un canon à électrons, d'un dispositif de déviation ou de focalisation des électrons (l'ensemble de lentilles électromagnétiques) et d'un dispositif d'observation (écran fluorescent situé dans la chambre de projection et recevant l'image finale). La colonne contient plusieurs étages de lentilles électromagnétiques dont les lentilles condenseurs, la lentille objectif et des lentilles intermédiaires et de projection (Figure II-11).

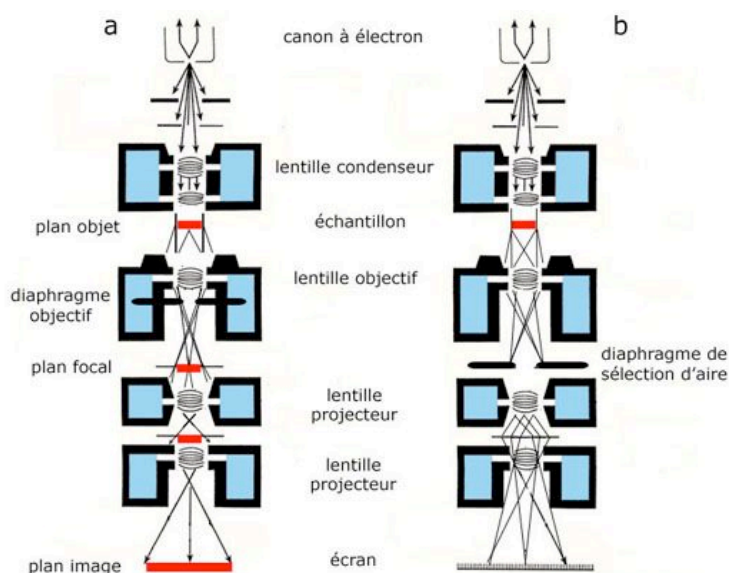


Figure II-11 : Représentation schématique de la colonne d'un microscope électronique en transmission a) en mode image et b) en mode diffraction.

Le pouvoir de diffusion des atomes est beaucoup plus important pour les électrons que pour les rayons X ou les neutrons. L'importance de ces interactions avec l'échantillon conditionne les techniques expérimentales qui doivent être menées sous vide poussé, ce qui permet d'éviter toute interaction entre les électrons et les molécules d'air. Cependant, la contrainte du vide limite l'observation à des échantillons dont l'eau a été préalablement éliminée. L'épaisseur de l'échantillon est également un paramètre très important pour cette technique. En effet, un faisceau d'électrons ne peut plus être transmis lorsque l'épaisseur de l'échantillon qu'il doit traverser dépasse quelques centaines de nanomètres.

Les interactions entre les électrons et la matière qu'ils traversent sont essentiellement de deux types : élastiques ou inélastiques. Le rayonnement diffusé élastiquement après interaction avec les atomes de la matière peut donner lieu à des interférences. Dans le cas d'un objet périodique, les électrons sont diffusés élastiquement par les familles de plans cristallins (Figure II-12) selon des angles discrets 2θ définis par la relation de Bragg :

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (\text{II-4})$$

où d est la distance réticulaire entre plans d'une même famille, n un entier positif et λ la longueur d'onde du rayonnement incident.

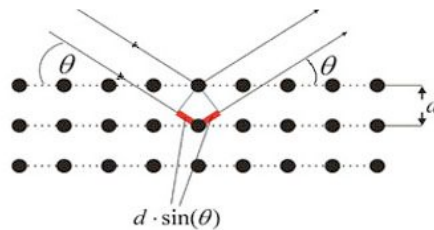


Figure II-12 : Représentation schématique de la diffraction de Bragg des électrons par les plans réticulaires d'un cristal.

Visualisé dans le plan focal de la lentille objectif, l'ensemble de ces faisceaux focalisés forme le diagramme de diffraction qui fournit des informations sur la périodicité, la structure de l'échantillon et son orientation par rapport au faisceau (Figure II-13). Ce diagramme correspond à une section plane du réseau réciproque du cristal (le réseau imaginaire de points tel que chaque point possède une relation de réciprocité avec le réseau réel des atomes du cristal). Si l'échantillon est incliné à différents angles par rapport au faisceau d'électrons incident, des figures de diffraction différentes sont obtenues. De cette façon, le réseau réciproque du cristal peut être étudié en trois dimensions.

Le terme "contraste" se réfère aux variations d'intensité qui permettent de distinguer les différentes zones de l'échantillon par rapport au fond de l'image. Le contraste de diffusion est lié à la diffusion élastique incohérente, qui est proportionnel à la charge Z , à la densité ρ et à l'épaisseur du spécimen. Les échantillons épais ou composés d'atomes lourds diffusent plus fortement que les échantillons minces et composés d'atomes légers. Lorsqu'un diaphragme d'objectif est utilisé pour ne sélectionner que les électrons non déviés par l'objet, les électrons diffusés ne participent pas à l'image et les objets diffusants apparaissent en sombre sur un fond clair.

Les interférences générées aux interfaces entre les zones de l'échantillon de différents indices de réfraction induisent le contraste de phase. L'intensité du contraste dépend de la focalisation de la lentille objectif. Enfin, le contraste de diffraction est lié à la diffusion élastique cohérente des électrons. Les échantillons légers mais cristallins sont visibles essentiellement grâce à ce contraste. Les électrons incidents sont déviés par les plans atomiques des échantillons cristallins selon les angles définis par la loi de Bragg (Eq. II-4). En champ clair, le diaphragme d'objectif ne sélectionnant que les électrons transmis, si une zone de l'échantillon se trouve en position de Bragg, cette zone est sombre et correspond à la partie de l'échantillon qui a diffracté. Si, par contre, on laisse passer un faisceau diffracté dans le diaphragme, l'image est en "champ sombre" : la partie du spécimen qui diffracte apparaît en clair.

Les cristaux de polysaccharides étant constitués d'atomes légers reliés par des liaisons covalentes, ils n'engendrent qu'un faible contraste de diffusion. De plus, les électrons incidents coupent ces liaisons, créant des radicaux libres très réactifs. L'échantillon se décristallise donc très vite sous l'effet de l'irradiation électronique. Pour limiter les dommages d'irradiation il devient donc nécessaire d'observer l'échantillon avec des doses d'électrons très faibles. De même, il est préférable de travailler à basse température pour limiter la diffusion des radicaux. Un autre problème se pose avec l'observation par MET des polymères cristallins hydratés (ou solvatés). Les cristaux se déshydratent (se désolvatent) dans le vide du microscope, ce qui engendre soit une perte de cristallinité soit un changement dans leur structure. Pour éviter ce problème l'échantillon peut être congelé avant l'introduction dans le microscope afin de fixer l'eau (ou le solvant) à l'intérieur de la maille cristalline.

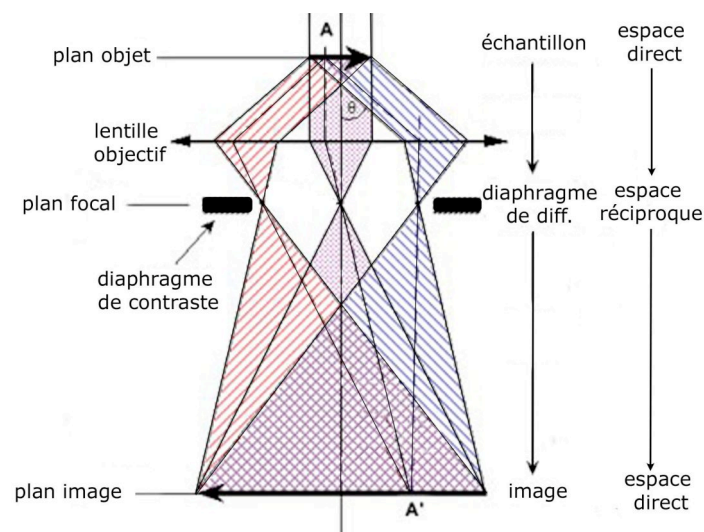


Figure II-13 : Représentation schématique de la formation de l'image en MET.

Matériel

Les observations de MET ont été réalisées au CERMAV au moyen d'un microscope Philips CM200 'Cryo' fonctionnant à une tension accélératrice de 80 kV en mode image et 200 kV pour la diffraction. Les images ont été enregistrées sur des plans-films Kodak SO163 et les clichés de diffraction sur "plaques images" (*imaging plates*) Fujifilm numérisées au moyen du laser d'un lecteur Fujifilm BAS-1800II. Ces plaques sont sensibles aux électrons et ont été utilisées comme des plaques photos traditionnelles.

Mode opératoire

Les grilles carbonées ont subi un prétraitement d'effluage plasma (ou *glow-discharge*) pour favoriser l'étalement de la goutte de suspension lors de son dépôt. Les grilles ont été placées pendant environ 40 s à l'intérieur d'une enceinte dans laquelle est appliquée une haute tension à basse pression. L'air est ionisé. La surface du film de carbone est décapée et reste momentanément chargée.

Une goutte de suspension a ensuite été déposée sur la grille effluée. Après 1 min, l'excès de liquide a été absorbé avec du papier filtre. Les échantillons ont été observés à température ambiante ou bien à -180°C dans un porte-objet Gatan 626 refroidi par de l'azote liquide.

Coloration négative

Le contraste des échantillons peut être augmenté par la technique de "coloration négative" qui consiste à ajouter sur le film de carbone et sur l'échantillon un agent contrastant à base de sels de métaux lourds (par exemple, sel d'acétate d'uranyle). Ces métaux lourds rendent le fond noir tandis que l'échantillon apparaît à l'image comme une zone claire. Une goutte de suspension de cristaux est déposée sur une grille ayant subi un traitement d'effluage. L'excès de liquide est absorbé et de suite, avant le séchage de la grille on dépose une goutte de colorant. On absorbe l'agent contrastant en excès et on laisse l'échantillon sécher.

5.4. Diffraction des rayons X

Le processus élémentaire à la base du phénomène de diffraction est la diffusion élastique du rayonnement X incident par les électrons des atomes de l'échantillon. Ce rayonnement incident, monochromatique et de longueur d'onde λ , a sa direction définie par son vecteur d'onde $\vec{s}_0$, vecteur de module $1/\lambda$. Le rayonnement arrive sur un électron de l'échantillon et est défléchi dans la direction 2θ sous forme d'un rayonnement de vecteur

d'onde $\vec{s}_1$, toujours de module $1/\lambda$. La déviation de trajectoire est définie par le vecteur $\vec{s} = \vec{s}_1 - \vec{s}_0$ (Figure II-14).

h étant la constante de Planck, E_0 l'énergie du rayonnement incident et E l'énergie du rayonnement diffusé, ΔE a pour expression:

$$\Delta E = E - E_0 = \frac{h^2}{2m} (s_1^2 - s_0^2) \quad (\text{II-5})$$

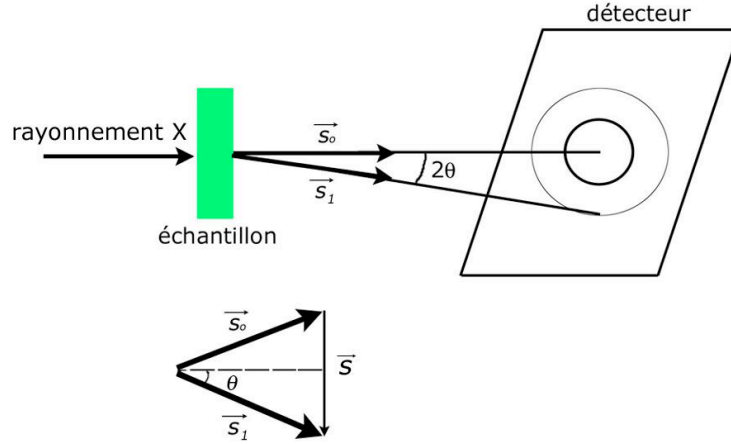


Figure II-14 : Représentation schématique du principe d'une expérience de diffusion de rayonnement.

Lorsque la diffusion est élastique, $\Delta E = 0$ et $s_1 = s_0$. Le vecteur s est donc

$$|\vec{s}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{II-6})$$

où $\lambda = 2\pi/k_0$ est la longueur d'onde du rayonnement incident et θ l'angle de diffusion.

5.4.1. Diffraction des rayons X aux grands angles (WAXS ou DRX)

5.4.1.1. Principe général

Il s'agit d'une technique utilisée pour déterminer la structure cristalline de l'échantillon et pour calculer sa cristallinité. Elle se base spécifiquement sur l'analyse des pics de Bragg enregistrés aux grands angles et générés par des structures sub-nanométriques.

Le cliché est enregistré à partir d'une poudre polycristalline composée de cristaux de petites tailles orientés statistiquement. La distribution radiale et angulaire des réflexions et leur intensité sont caractéristiques de la structure atomique de l'échantillon. Le diagramme de poudre présente alors un ensemble de pics, chaque pic correspondant à un angle de diffraction 2θ inversement proportionnel à la distance réticulaire d des plans diffractants.

Les diagrammes représentent l'intensité des rayons diffractés en fonction de l'angle de diffraction ainsi que le spectre de diffusion liée à la présence de la phase amorphe et des molécules d'eau non-structurales. Le type cristallin de l'échantillon peut être identifié par la calibration et l'indexation de ces pics. L'intensité des pics est proportionnelle au taux de cristallinité. La largeur des pics est inversement proportionnelle à la taille des cristaux.

5.4.1.2. Equipement conventionnel et conditionnement des échantillons

Les diagrammes WAXS ont été enregistrés par Bruno Pontoire à l'INRA de Nantes à l'aide d'un diffractomètre Brucker D8 Discover. La radiation $\text{CuK}\alpha_1$ ($\lambda=0,15405$ nm) est produite à une tension de 40 kV et une émission de 40 mA est sélectionnée en utilisant un système optique à miroirs Göbel collimaté pour produire un faisceau de 500 μm . Les données de diffraction sont enregistrées avec un détecteur bidimensionnel GADDS pendant 600 s de temps d'exposition. La distance de l'échantillon au détecteur était de 100 mm. Tous les spectres WAXS ont été normalisés à la même aire entre 3° et 40° (2θ).

L'eau joue un rôle capital dans l'établissement de la cristallinité des amidons natifs et de ses dérivés. L'intensité des pics de diffraction augmente avec la teneur en eau. Afin d'obtenir une meilleure résolution des diagrammes, les échantillons sous forme de poudres sont préalablement hydratés en étant placés à l'intérieur d'un dessiccateur contenant une solution saline aqueuse saturée de BaCl_2 (activité de l'eau de 0.9) à 25°C . L'hydratation de l'échantillon est maximale lorsque sa masse n'augmente plus, soit au bout de 9-10 jours.

Estimation de la cristallinité

La méthode utilisée a été publiée par **Wakelin et al.** en 1959 et utilisée initialement pour la cellulose. Elle consiste à comparer les diagrammes de diffraction de l'échantillon avec ceux d'un standard cristallin et d'un standard amorphe dans les mêmes conditions d'hydratation. Une poudre cristalline donne lieu à un spectre d'anneaux fins correspondant aux réflexions de Bragg. Une substance amorphe donne un spectre composé essentiellement d'une large bande de diffusion. Les trois diagrammes sont normalisés (masses de produit diffractant identiques) entre $2\theta=3^\circ$ et 40° en calculant l'aire totale intégrée sous la courbe de diffraction. Le taux de cristallinité est égal à la pente de la fonction :

$$(I_{\text{éch}} - I_{\text{am}})_{2\theta} = f(I_{\text{cris}} - I_{\text{am}})_{2\theta} \quad (\text{II-7})$$

où $I_{\text{éch}}$, I_{am} et I_{cris} représentent les intensités diffractés des trois échantillons. Cette pente est obtenue par régression linéaire du nuage de points expérimentaux.

Cette méthode est précise ($\pm 3\%$) pour les échantillons de taux de cristallinité supérieur à 10-15%. Dans le cas de mélange des types allomorphiques A et B de l'amidon, la composition est d'abord déterminée par une seconde méthode. Le diagramme est alors considéré comme la superposition des diagrammes des témoins A et B purs et du témoin amorphe:

$$I_{écha} = \alpha I_A + \beta I_B + \gamma I_{am} \quad (II-8)$$

Pour accéder au pourcentage des phases de type A, B et amorphe, les valeurs α , β et γ sont calculées par minimisation de la différence entre le spectre expérimental et le spectre calculé à l'aide d'une régression multilinéaire.

Les valeurs de cristallinité ($1-\gamma$) sont affinées au moyen de la méthode de Wakelin en utilisant des standards cristallins qui possèdent les mêmes proportions d'amidon de type A et B que celles déterminées par la régression multilinéaire. A partir du degré de cristallinité obtenu, les spectres reconstitués mathématiquement sont comparés aux clichés de diffraction expérimentaux afin de confirmer les valeurs de composition polymorphique et le taux de cristallinité calculés.

5.4.1.3. Rayonnement synchrotron

Principe

Par comparaison avec les sources de rayons X conventionnelles disponibles en laboratoire, les faisceaux générés par rayonnement synchrotron possèdent des caractéristiques exceptionnelles en termes de brillance et d'intensité ainsi qu'une très faible divergence angulaire.

Un synchrotron est un accélérateur circulaire de plusieurs centaines de mètres de circonférence dans lequel un champ magnétique intense permet d'accélérer un faisceau d'électrons. Les électrons atteignent une énergie de plusieurs GeV dans un *booster* circulaire de faible circonférence et sont ensuite "injectés" dans l'anneau de stockage, où la déviation due à des aimants de courbure ou des onduleurs les conduit à émettre de la lumière synchrotron. Le rayonnement synchrotron, émis tangentiellement à l'anneau, est collecté en différents points autour de l'anneau, le long des "lignes de lumière".

Matériel et mode opératoire

Les expériences ont été réalisées par D. Popov, M. Burghammer et C. Riekel sur la ligne ID13 du European Synchrotron Radiation Facility de Grenoble, à la longueur d'onde de 0,0947 nm définie par un monochromateur Si-111. Le faisceau est focalisé par des lentilles réfractives paraboliques en Be et son diamètre est réduit à 10 μm (Popov *et al.*, 2006). Un

cristal d'amylose séché à l'air a été positionné avec de la colle à prise lente (Araldite) sur la pointe d'un capillaire en verre à l'aide d'un micromanipulateur Kleindiek MM3A. Le cristal a été refroidi par un flux d'azote sec à 100 K. Les clichés de diffraction ont été enregistrés avec une caméra CCD MAR 165 munie d'un capteur d'une surface de $78,94 \times 79,94 \mu\text{m}$ soient $2\text{K} \times 2\text{K}$ pixels codés sur 16 bits. Des clichés ont été enregistrés à des inclinaisons de l'échantillon variant par pas de 2 ou 4° . Les clichés ont été analysés avec le logiciel XDS (version 10).

5.5. Microscopie à force atomique (AFM)

Principe

La microscopie à force atomique (ou AFM pour *Atomic Force Microscopy*) permet de visualiser la topologie de la surface d'un échantillon ne conduisant pas l'électricité. Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe montée sur un levier réfléchissant sur lequel est pointé un rayon laser. Le levier est fléchi à cause des interactions pointe-échantillon et le rayon laser est dévié. La mesure de la déviation de hauteur de la pointe/levier s'effectue au moyen d'un quadrant sensible de photodiodes qui enregistre les mouvements du faisceau laser (Figure II-15). Un ordinateur transcrit la hauteur du levier et peut ainsi reconstituer une image de la surface. La résolution de l'appareil correspond essentiellement à la dimension du sommet de la pointe.

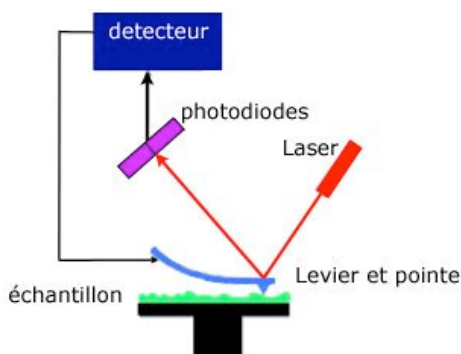


Figure II-15 : Représentation schématique du microscope à force atomique.

Plusieurs modes d'utilisation sont possibles. Le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives. La pointe appuie sur la surface. Elle est repoussée et le levier est dévié. Le mode contact intermittent consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance avec une certaine amplitude. Quand la pointe interagit avec la surface (de façon répulsive) la fréquence de résonance change et l'amplitude décroît. Cette amplitude est enregistré pour

mesurer les variation de la surface de l'échantillon (image topographique). En mode contact intermittent, il est aussi possible de mesurer la différence de phase entre l'oscillation du levier et les oscillations enregistrées par le détecteur. Le retard de phase est très sensible aux variations de propriété de l'échantillon telles que l'adhésion ou la viscosité. L'image en contact intermittent et l'image en phase sont enregistrées en même temps (Figure II-16). Le mode non-contact utilise les forces attractives. Très peu utilisé en pratique, à cause des faibles forces mises en jeu, il nécessite un environnement à faible bruit.

Matériel

Les observations par AFM ont été réalisées par Frédéric Dubreuil (CERMAV), sur le microscope AFM PicoPlus (Molecular Imaging) de la plateforme NanoBio Campus de Grenoble. Les images topographiques sont obtenues avec une pointe Mikromash NSC 36. Le traitement des données numériques est réalisé avec le logiciel Gwyddion. Des tests ont aussi été réalisés par la société Veeco sur un microscope utilisé en mode contact intermittent.

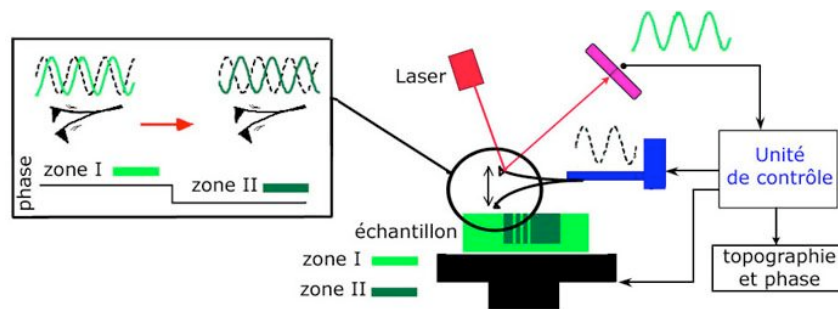


Figure II-16 : Représentation schématique du mode contact intermittent.

Mode opératoire

Quelque gouttes de suspension de cristaux sont prélevées et diluées avec de l'eau distillée. Les cristaux sont séchés puis observés à l'air à température ambiante. Les images sont enregistrées en mode contact intermittent, en topographie et en phase.

5.6. Densimétrie

Principe

La densité ou masse volumique d'un corps est donnée par la formule :

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (\text{II-9})$$

où m est la masse (g) et V le volume du corps (cm³).

La densité peut indiquer la flottabilité d'un corps. En effet, un corps coule dans l'eau si sa densité est supérieure à 1 g/cm³ (densité de l'eau). A l'inverse, si la densité d'un corps est inférieure à 1 g/cm³, celui-ci flottera sur l'eau. Le même raisonnement peut être utilisé pour calculer la densité d'un cristal d'amylose en utilisant des solvants dont les densités encadrent la densité théorique de l'amylose cristallisée.

Matériel

- dichlorométhane (CH₂Cl₂) : $\rho=1,33$ g/cm³
- chloroforme (CHCl₃) : $\rho=1,49$ g/cm³
- tétrachlorure de carbone (CCl₄) : $\rho=1,59$ g/cm³

Mode opératoire

Une suspension de cristaux est centrifugée. Le culot est ensuite séparé en plusieurs gouttelettes sur un support de Téflon. On laisse l'acétone s'évaporer à l'air durant 10 min puis le support est placé en atmosphère humide (95% r.h.) durant 3 jours. Les films de cristaux sont rapidement fragmentés au moyen d'un scalpel et les fragments sont plongés dans les trois solvants organiques. Les fragments flottent dans CCl₄ alors qu'ils coulent dans le dichlorométhane et le chloroforme. Des gouttes de CCl₄ sont donc ajoutées dans les deux autres solvants sous faible agitation jusqu'à ce que les fragments restent stables dans le liquide, sans couler ni flotter. 10 mL du mélange de solvants sont alors mesurés précisément dans une fiole graduée et pesés.

CHAPITRE III

CARACTÉRISATION DES α -GLUCANES PRÉPARÉS PAR HYDROLYSE ACIDE OU ENZYMATIQUE ET SYNTHÈSE ENZYMATIQUE

1. DEXTRINES LIMITES PRÉPARÉES PAR HYDROLYSE ACIDE D'AMIDON NATIF

Les amidons natifs ont subi un traitement de "lintnérisation", c'est à dire une hydrolyse ménagée à l'acide chlorhydrique 2,2 N pendant 40 jours en phase hétérogène (**Robin *et al.*, 1975**) (cf. Chap. II, § 1.1.2).

1.1. Dextrines limites préparées par hydrolyse acide d'amidon de pomme de terre

L'amidon utilisé provient de pomme de terre standard (Chap. II, § 1.1.1). Deux fractions ont été préparées au cours de deux hydrolyses : **DLP(1)** et **DLP(2)**. La Figure III-1 montre le spectre de masse MALDI-TOF du produit **DLP(1)** lavé à l'eau distillée et à l'éthanol selon le protocole décrit précédemment (Chap. II, § 3.2). Le signal majoritaire est attribué au DP 16. Les résultats montrent une distribution quasi-symétrique autour de ce pic, avec une gamme de DP de 8 à 27, ce qui est en accord avec les résultats de **Robin *et al.* (1974)** pour l'amidon de pomme de terre après 40 jours d'hydrolyse. Entre 538,21 m/z et 759,17 m/z apparaissent des pics correspondant à des maltooligosaccharides de DP 3 et 4.

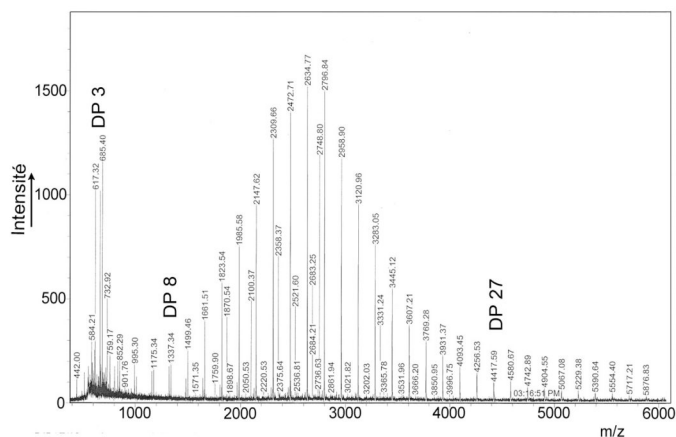


Figure III-1 : Profil MALDI-TOF de la fraction de l'amidon de pomme de terre lintnérisé **DLP(1)8-27**.

Le spectre RMN du ^{13}C de ces dextrines est présenté sur la Figure III-2. Il comprend 6 signaux majoritaires, leurs déplacements chimiques correspondant à ceux référencés par **Bock *et al.* (1989)** et **Jodelet *et al.* (1998)**, qui sont caractéristiques des résidus glucosyles liés en $\alpha(1,4)$ (Tableau III-1). Le signal à 70,15 ppm correspond au C4 en bout de chaîne appartenant aux dextrines (**Jodelet *et al.*, 1998**). Le signal caractéristique d'un C6 lié en $\alpha(1,6)$ apparaît autour de $\delta \sim 68$ ppm (**Jodelet *et al.*, 1998**).

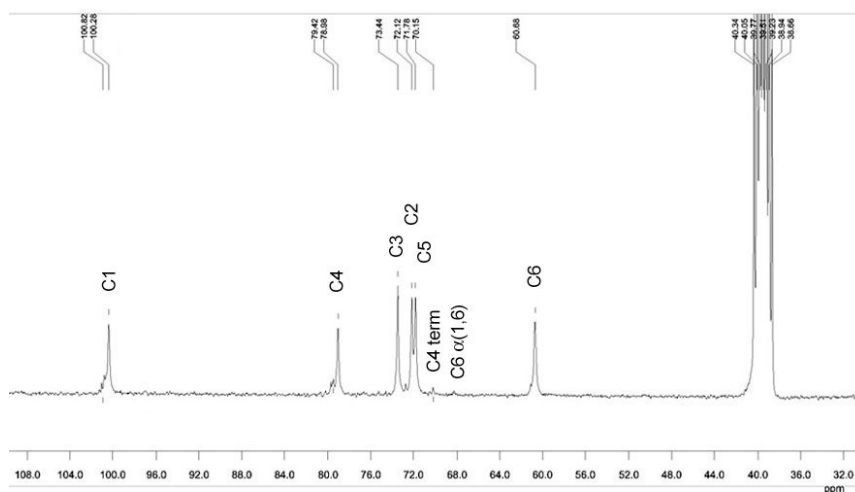


Figure III-2 : Spectre de RMN ^{13}C de lintners de pomme de terre, **DLP(1)8-27** dans $\text{DMSO}-d_6$.

Tableau III-1: Déplacements chimiques caractéristiques et numérotation des carbones dans le spectre RMN ^{13}C de la fraction **DLP(1)8-27**. Les déplacements chimiques définis par **Bock et al. (1989)** et **Jodelet et al. (1998)** sont indiqués entre parenthèses.

Numérotation des carbones	Déplacement chimique (ppm)
1	100,28 (100,6 - 100,7)
2	72,12 (72,6)
3	73,44 (74,2)
4	78,98 (78,4)
C4 terminal	70,15 (70,15)
5	71,78 (72,3)
6	60,68 (61,6 - 62)
C6 $\alpha(1,6)$	~68 (66,6 - 68)

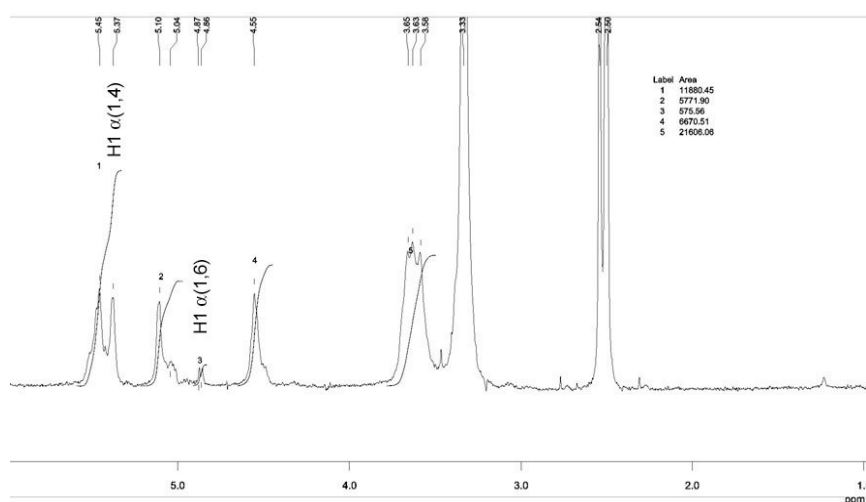


Figure III-3 : Spectre de RMN ^1H des lintners de pomme de terre **DLP(1)8-27** dans $\text{DMSO}-d_6$ solubilisés à 60°C .

Pour quantifier le pourcentage de points de branchement présents dans les dextrines d'amidon de pomme de terre, nous avons calculé le rapport entre le signal des H1 $\alpha(1,4)$, $\delta \sim 5,45-5,37$ ppm et celui des H1 $\alpha(1,6)$, $\delta \sim 4,87-4,85$ ppm (Figure III-4) dans le spectre RMN ^1H . Le pourcentage de points de branchement déduit est de 4,8 %.

Les études effectuées par **Robin et al. (1974)** sur les diagrammes d'élution de chromatographie d'exclusion stérique sur gel de l'amidon de pomme de terre lintnérisé montrent la présence de deux populations, une composée de chaînes monobranchées de $\overline{DP}$ 25 (mineure) et l'autre de chaînes essentiellement linéaires de $\overline{DP}$ 15 (majoritaire). Avec l'avancement de l'hydrolyse, la proportion des chaînes linéaires augmente et toutes les populations sont dégradées à $\overline{DP}$ 15, qui correspond à la population acido-résistante (**Robin et al., 1974**). L'utilisation de la pullulanase (enzyme déramifiante), conduit à la disparition de la première population, ce qui indique sa nature branchée. Suite à l'action d'une β -amylase, qui hydrolyse spécifiquement la liaison $\alpha(1,4)$, **Robin et al. (1974)** ont obtenu deux fractions de β -dextrines limites : des dextrines longues (2,2%, DP 10-30) et des dextrines courtes (10,3%, DP 2-10). De même, suite à l'action d'une β -amylase sur des lintners de pomme de terre hydrolysés à 74% à 35°C, **Bertoft (2004)** a obtenu deux populations de β -dextrines limites : une fraction courte et l'autre de DP 15,6. La proportion de β -dextrines limites est de 17,6% (**Bertoft, 2004**).

La valeur de 4,8% obtenue pour le taux de branchement de la fraction **DLP(1)8-27m** est inférieure à celles de la littérature, mais la limite de β -amylolyse augmente avec l'avancement de la lintnérisation (**Biliaderis et al., 1981 ; Bertoft, 2004**). Le profil MALDI-TOF centré sur DP 16 pour la fraction DLP(1) (Figure III-1) indique un avancement d'hydrolyse important. Ceci impliquerait, dans le cas d'une β -amylolyse, une limite d'hydrolyse plus élevée et donc un taux de branchement inférieur par rapport à ceux trouvés dans la littérature.

Une seconde fraction de dextrines de pomme de terre, **DLP(2)8-21**, a été préparée lors d'une nouvelle session d'hydrolyse acide. Suite à des problèmes de lavage, la masse du produit final obtenu n'était que de 10 mg. Par conséquent, après analyse spectrométrique, la fraction n'a été utilisée que pour deux cristallisations. La gamme de DP déterminée par MALDI-TOF est en accord avec la littérature (**Robin et al. 1974**). La Figure III-4 montre le spectre RMN ^1H de la fraction **DLP(2)8-21**, solubilisée dans DMSO- d_6 à 60°C. Le pourcentage de points de branchement, calculé par le rapport du signal des H1 $\alpha(1,4)$, $\delta \sim 5,45 - 5,37$ ppm et de celui des H1 $\alpha(1,6)$, $\delta \sim 4,87-4,85$ ppm, est de 6,1%.

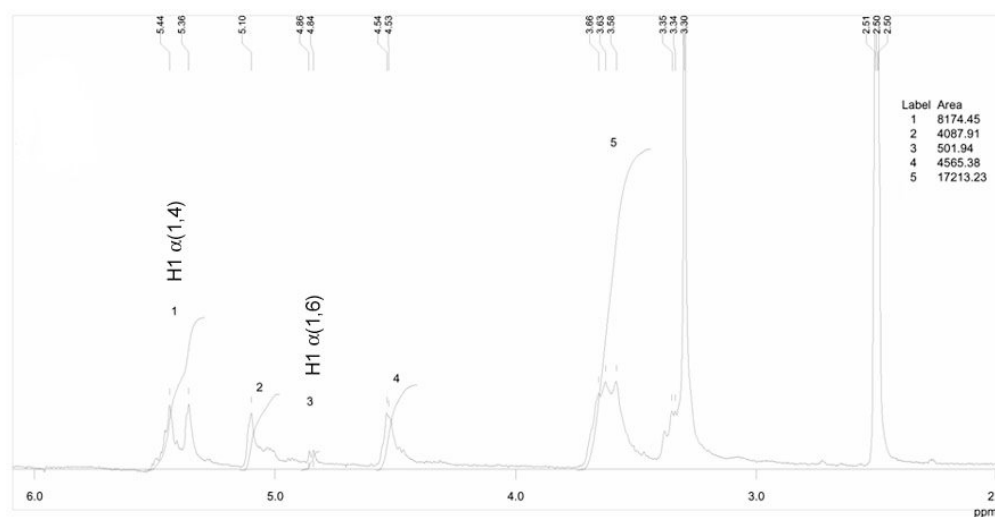


Figure III-4 : Spectre de RMN ^1H de la fraction **DLP(2)8-21** dans $\text{DMSO}-d_6$ solubilisés à 60°C .

1.2. Dextrines limites préparées par hydrolyse acide d'amidon de pois ridé

L'amidon de pois ridé (*Pisum sativum* L., variété Frogel., INRA Nantes) a aussi été utilisé pour préparer des dextrines limites (Chap. II, § 1.1.1). Comme pour l'amidon de pomme de terre, la cinétique d'hydrolyse présente deux stades distincts (**Colonna *et al.*, 1982**), le premier caractérisé par 25% d'amidon hydrolysé (8-10 jours) et le second, plus lent, avec un taux de 43% d'amidon linnérisé après 42 jours. Le DP moyen des chaînes, déterminé par **Colonna *et al.* (1982)** est de 25,1 pour 37% d'amidon linnérisé et 24,7 pour 43%. Le résidu acido-résistant est constitué d'une seule population de chaînes linéaires (**Biliaderis *et al.*, 1981b ; Colonna *et al.*, 1982**).

La Figure III-5 montre le profil chromatographique sur colonne Dionex de la fraction **DLPR**. Les signaux majoritaires se trouvent entre DP 11 et DP 16. La gamme de DP s'étend de 5 à 49 et le profil est asymétrique. Le degré de polymérisation moyen en nombre, $\overline{DP}_n$, est de 21,2, le DP moyen en masse, $\overline{DP}_w$, de 25,2, avec une polydispersité P de 1,187. La fraction présente aussi une contamination par du glucose, qui n'a pas été quantifiée.

Nous avons effectué des analyses RMN ^{13}C et ^1H pour détecter la présence de liaisons de branchements $\alpha(1,6)$ dans la fraction. Le spectre RMN du ^{13}C est présenté sur la Figure III-7. Il comprend les 6 signaux des carbones, leurs déplacements chimiques correspondant à ceux référencés par **Bock *et al.* (1989)** et **Jodelet *et al.* (1998)** (Tableau III-2).

Le signal qui apparaît à $\delta \sim 70,15$ ppm correspond au C4 en bout de chaîne (**Jodelet *et al.*, 1998**) (Figure III-6). Le signal à $\delta \sim 97,07$ ppm correspond à l'extrémité β -réductrice. Un léger signal du C6 lié $\alpha(1,6)$ apparaît autour de $\delta \sim 68$ ppm.

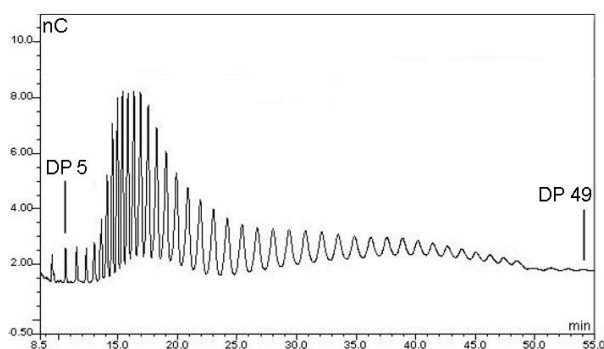


Figure III-5 : Profil chromatographique de la fraction de lintners de pois ridé (**DLPR**), déterminé par HPAEC-PAD.

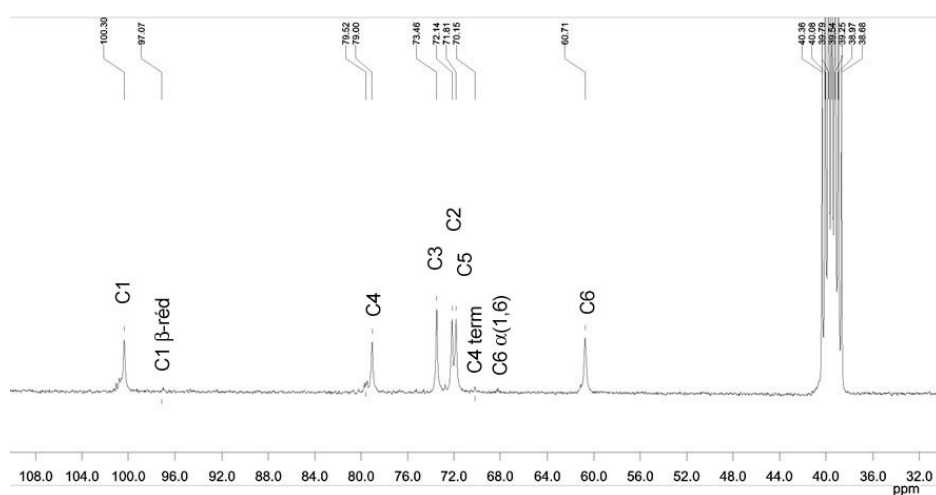


Figure III-6 : Spectre de RMN ^{13}C de lintners de pois ridé (**DLPR**) dans $\text{DMSO-}d_6$.

Tableau III-2: Déplacements chimiques caractéristiques et numérotation des carbones dans le spectre RMN ^{13}C de la fraction DLPR. Les déplacements chimiques définis par **Bock et al. (1989)** et **Jodelet et al. (1998)** sont indiqués entre parenthèses.

Numérotation des carbones	Déplacement chimique (ppm)
1	100,3 (100,6 – 100,7)
C1 β -réduct	97,07 (96,6)
2	72,14 (72,6)
3	73,46 (74,2)
4	79 (78,4)
C4 terminal	70,15 (70,15)
5	71,81 (72,3)
6	60,71 (61,6 - 62)

La Figure III-7 montre le spectre RMN ^1H de la fraction DLPR. Le rapport entre le signal H1 à $\delta \sim 5,45$ ppm dû à la liaison $\alpha(1,4)$ et celui à $\delta \sim 4,8$ ppm dû à la liaison $\alpha(1,6)$, est de 4,4 %.

Colonna *et al.* (1982) ont montré par chromatographie d'exclusion stérique, après l'action directe d'une β -amylase sur l'amidon de pois ridé lintnérisé, la présence d'une fraction de β -dextrines limites résistantes à l'enzyme (4,1% du total). La valeur de 4,4% que nous avons obtenue est donc cohérente avec celle de la littérature.

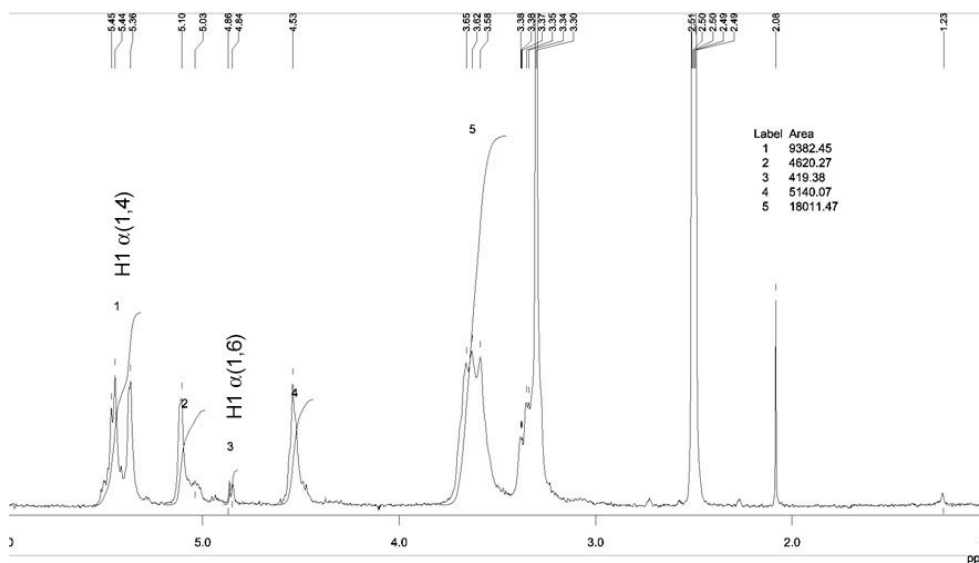


Figure III-7 : Analyse par RMN ^1H de lintners de pois ridé (DLPR) dans DMSOd₆.

2. MALTODEXTRINES PRÉPARÉES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'AMIDON DE MAÏS STANDARD

Les maltodextrines issues de l'hydrolyse enzymatique ménagée d'amidon de maïs standard par l' α -amylase ont été fournies par la société Roquette Frères. L' α -amylase est une endo-enzyme spécifique de l'hydrolyse des liaisons $\alpha(1,4)$ des amylopolysaccharides. Cette enzyme ne peut pas hydrolyser la liaison $\alpha(1,6)$. Le pourcentage d'amidon facilement hydrolysable par l'enzyme est supérieur à 95%, ce qui implique que l'attaque enzymatique n'est pas limitée par les cristallites du grain (Planchot, 1993).

Le fractionnement a été réalisé au CERMAV par Alain Heyraud, par chromatographie d'exclusion stérique. Le produit commercial a été séparé en 3 fractions (nommées A, B et C) de molécules de tailles différentes (Figure III-8). Dans ce travail, nous avons utilisé la fraction contenant les molécules de plus faible masse moléculaire (fraction C, nommée par la suite **MDR**).

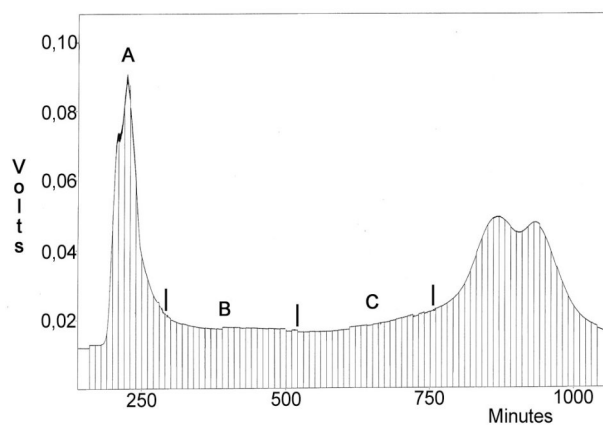


Figure III-8 : Profil chromatographique d'exclusion du produit commercial MD03 Roquette.
Le produit est séparé en trois fractions A, B et C selon la taille des molécules.

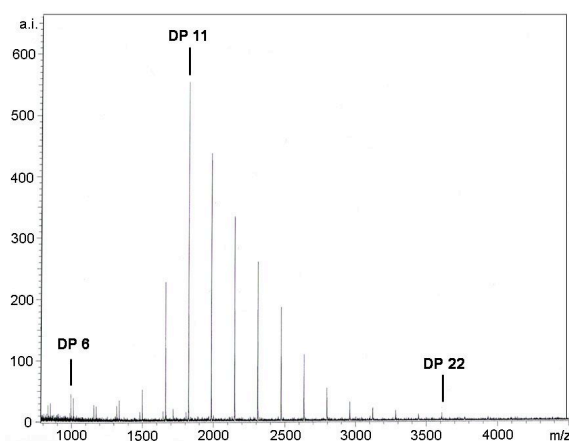


Figure III-9 : Profil MALDI-TOF de la fraction **MDR** obtenue à partir de maltodextrines Roquette.

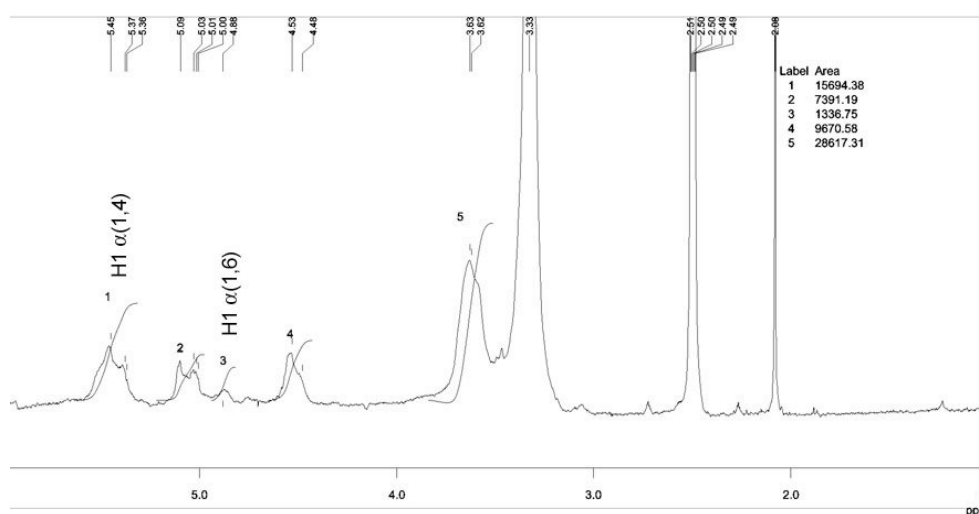


Figure III-10 : Spectre de RMN ^1H de la fraction **MDR** obtenue à partir de maltodextrines Roquette dans DMSO d_6 .

Le profil MALDI-TOF de la fraction **MDR** est présenté sur la Figure III-9. Le pic majoritaire correspond au DP 11. Le DP est compris entre DP 6 et DP 22. Le pourcentage de points de branchement de la fraction **MDR** a été estimé à 8,5% par analyse RMN ^1H (rapport entre le signal H1 dû à la liaison $\alpha(1,4)$, $\delta \sim 5,45\text{--}5,36$ ppm et celui à $\delta \sim 4,8$ ppm dû à une liaison $\alpha(1,6)$) (Figure III-10). Après le clivage des liaisons $\alpha(1,4)$ par l' α -amylase sur l'amidon de maïs pendant la dextrinisation, le rapport entre la teneur en liaisons $\alpha(1,6)$ et la teneur en liaisons $\alpha(1,4)$ du résidu d'hydrolyse augmente. Il a été estimé à 6% (**Robin et al., 1975**) (Chap. I, § 1.1.2.1.).

3. AMYLOSE SYNTHÉTIQUE

La synthèse enzymatique *in vitro* permet la production d'un polymère d'unités glucosyles liées par des liaisons osidiques de type $\alpha(1,4)$. Les fractions obtenues sont nommées **ASA** (pour "amylose synthétique / amylosaccharase"), ou **ASP** (pour "amylose synthétique/ phosphorylase").

3.1. Amylose synthétisée par l'amylosaccharase

Les chaînes d'amylose utilisées dans ce travail proviennent de deux réactions de synthèse différentes. Celles-ci ont été réalisées par réaction d'accepteur utilisant le saccharose comme donneur d'unités glucosyles, et le maltose comme accepteur. Le fractionnement des oligosaccharides a été réalisé par chromatographie d'exclusion stérique (GPC) préparative. (Chap. II, § 1.2). Les fractions récupérées ont ensuite été analysées par chromatographie haute performance d'échange d'anions à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD).

Le profil chromatographique de la fraction ASA(F1) est présenté sur la Figure III-11. DP est compris entre 8 et 33, avec $\overline{DP}_n = 17,4$, $\overline{DP}_w = 18,3$ et une polydispersité de 1,055. La préparation des fractions ASA(1), ASA(2) et ASA(3) a été décrite dans le Chapitre II.

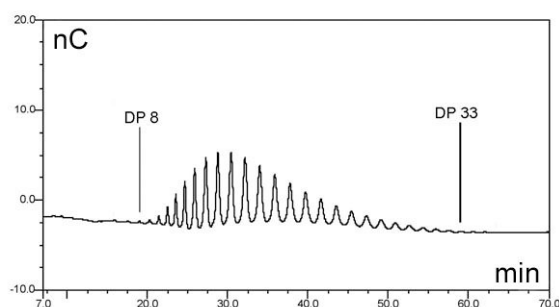


Figure III-11 : Profil chromatographique HPAEC-PAD de la fraction **ASA(F1)**.

Les Figures III-12 et III-13 présentent les profils HPAEC-PAD des fractions issues de la synthèse et du fractionnement ASA(1). Les chaînes d'amylose obtenues ont un DP de 10 à 32 selon les fractions. Dans cette étude, seulement certaines des fractions préparées ont été utilisées (Tableau III-3). Ces fractions sont moins polydisperses que ASA(F1).

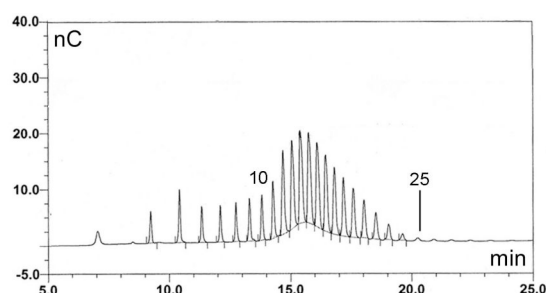


Figure III-12 : Profil HPAEC-PAD de la fraction **ASA(1)10-25** issue de la synthèse **ASA(1)**.

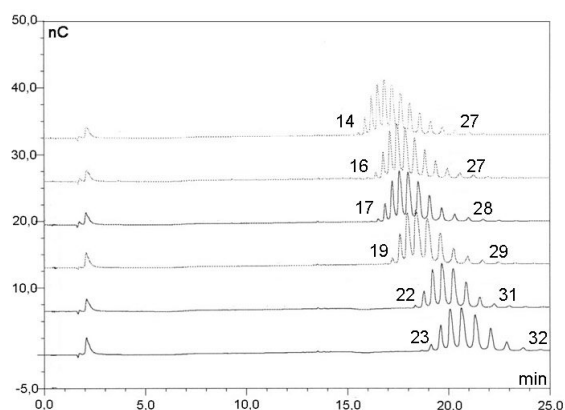


Figure III-13 : Profils HPAEC-PAD des fractions **ASA(1)14-27**, **ASA(1)16-27**, **ASA(1)17-28**, **ASA(1)19-29**, **ASA(1)22-31**, **ASA(1)23-32**.

Tableau III-3 : Caractéristiques des fractions obtenues à partir de la synthèse et du fractionnement **ASA(1)**. En gras, les fractions caractérisées et utilisées pour obtenir des cristaux.

Synthèse	DPmin	DPmax	DPn	DPw	P	Nom	Caractéristiques
ASA(1)	10	25	15,4	15,9	1,031	ASA(1)10-25	linéaire
ASA(1)	12	24				ASA(1)12-24	linéaire
ASA(1)	13	24				ASA(1)13-24	linéaire
ASA(1)	14	27	18,7	19	1,016	ASA(1)14-27	linéaire
ASA(1)	16	25				ASA(1)26-25	linéaire
ASA(1)	17	28	20,9	21	1,007	ASA(1)17-28	linéaire
ASA(1)	19	29	22,3	22,4	1,005	ASA(1)19-29	linéaire
ASA(1)	22	28				ASA(1)22-28	linéaire
ASA(1)	23	32	26,1	26	1,003	ASA(1)23-32	linéaire

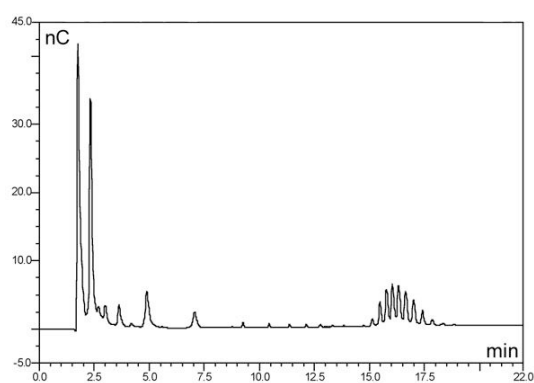


Figure III-14 : Profil HPAEC-PAD de la fraction ASA(2)12-23.

Des fractions obtenues au cours de la deuxième synthèse, seule la fraction ASA(2)12-23 a été utilisée dans ce travail. Son profil chromatographique est présenté sur la Figure III-14. Cette fraction possède un $\overline{DP}_n$ de 16,5 et un $\overline{DP}_w$ de 16, avec une polydispersité de 1,013. La fraction contient une gamme de DP de 12 à 23 mais aussi de petits maltooligosaccharides (DP 2 à 11, à hauteur de 10 % (m/m)) et du fructose à hauteur de 53% (m/m), en raison d'un problème de colmatage de la colonne de chromatographie d'exclusion de taille et de l'apparition de chemins préférentiels.

Les caractéristiques des fractions obtenues après la troisième synthèse sont présentées sur le Tableau III-4. Les fractions, très peu polydisperses, ont au total une gamme de DP de 7 à 33. Les Figures III-15 et III-16 montrent, à titre d'exemple, les profils chromatographiques de certaines fractions ASA(3).

Tableau III-4 : Caractéristiques des fractions obtenues à partir de la synthèse et du fractionnement ASA(3).

Synthèse	DPmin	DPmax	DPn	DPw	P	Nom	Caractéristiques
ASA(3)	7	13				ASA(3)7-13	linéaire
ASA(3)	9	15	12	12,1	1,01	ASA(3)9-15	linéaire
ASA(3)	9	18	13	13,8	1,008	ASA(3)9-18	linéaire
ASA(3)	11	19	14,5	14,6	1,006	ASA(3)11-19	linéaire
ASA(3)	12	18	15,3	15,4	1,005	ASA(3)12-18	linéaire
ASA(3)	14	19	16,3	16,4	1,005	ASA(3)14-19	linéaire
ASA(3)	14	21	17,5	17,6	1,005	ASA(3)14-21	linéaire
ASA(3)	16	22	19,2	19,2	1,004	ASA(3)16-22	linéaire
ASA(3)	18	24				ASA(3)18-24	linéaire
ASA(3)	20	25				ASA(3)20-25	linéaire
ASA(3)	20	29	24,5	24,6	1,004	ASA(3)20-29	linéaire
ASA(3)	23	33	27,5	27,6	1,004	ASA(3)23-33	linéaire

La linéarité des fractions a été confirmée par analyse RMN. La Figure III-16 montre le spectre ^{13}C de la fraction ASA(3)12-18. Aucun signal caractéristique d'un C6 ou d'un C1 lié en $\alpha(1,6)$, respectivement à $\delta \sim 68$ et $\delta \sim 99,4$ ppm, n'est présent sur le spectre RMN ^{13}C (Bock *et al.*, 1989 ; Jodelet *et al.*, 1998) (Tableau III-5). Les faibles signaux présents à $\delta \sim 70,15$ ppm, $\delta \sim 76-78,5$ ppm et $\delta \sim 81,5-82,5$ ppm correspondent aux signaux de résonance des carbones appartenant à des courtes chaînes linéaires.

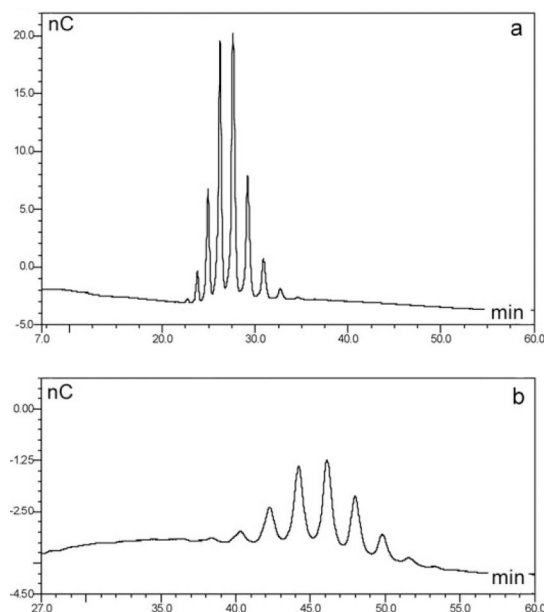


Figure III-15 : Profils chromatographiques HPAEC-PAD des fractions ASA(3)11-19 et ASA(3)20-29.

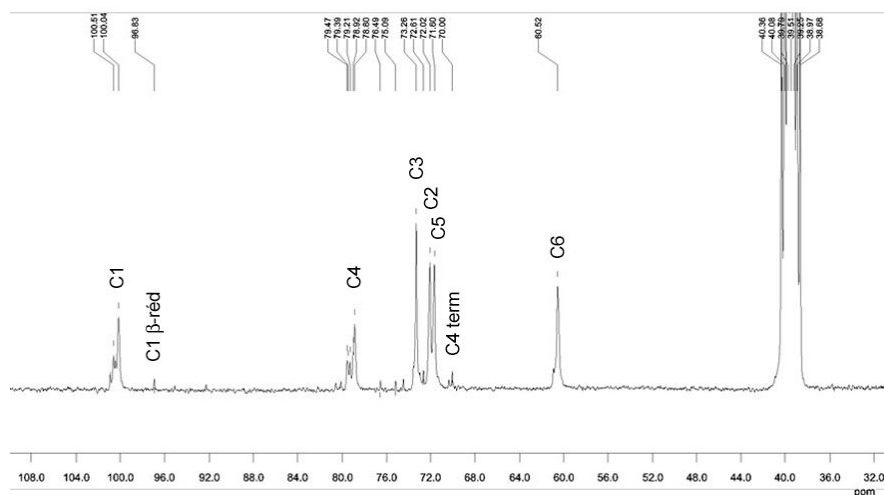


Figure III-16 : Analyse par RMN ^{13}C de la fraction ASA(3)12-18 dans $\text{DMSO}-d_6$.

Tableau III-5 : Déplacements chimiques caractéristiques et numérotation des carbones dans le spectre de RMN ^{13}C de la fraction **ASA(3)12-18**. Les déplacements chimiques définis par **Bock *et al.* (1989)** et **Jodelet *et al.* (1998)** sont indiqués entre parenthèses.

Numérotation des carbones	Déplacement chimique (ppm)
1	100,04 (100,6)
C1 β -réduct	96,83 (96,6)
2	72,02 (72,6)
3	73,26 (74,2)
4	78,8 (78,4)
C4 terminal	70,0 (70,15)
5	71,6 (72,3)
6	60,52 (61,6 - 62)

3.2. Amylose synthétisée par la phosphorylase

La longueur des chaînes d'amylose synthétisées *in vitro* par la phosphorylase dépend du rapport G1P/accepteur (Chap II, § 1.2.3.). Un rapport élevé peut conduire à une amylose de DP jusqu'à 14000 tandis qu'un faible rapport G1P/substrat conduit à un DP autour de 25 (**Pfannemüller, 1968 ; Gidley et Bulpin, 1989; Roger *et al.*, 2000; Ohdan *et al.*, 2006**). Le produit obtenu est linéaire, les glucoses étant exclusivement liés en $\alpha(1,4)$, et relativement monodisperse. Les fractions d'amylose synthétisées par la phosphorylase issue de pomme de terre ont été fournies par Shinichi Kitamura, de l'Université d'Osaka au Japon (**Kitamura *et al.*, 1982 ; Nakanishi *et al.*, 1993**).

Les Figures III-17 et III-18 montrent les profils MALDI-TOF des deux fractions ASP20-40 et ASP40-70. La première fraction est centrée sur les DP 30-32, avec une gamme de DP de 20 à 40. La deuxième, avec une série de DP de 40 à 70, est la fraction possédant les chaînes d'amylose les plus longues utilisées dans cette étude.

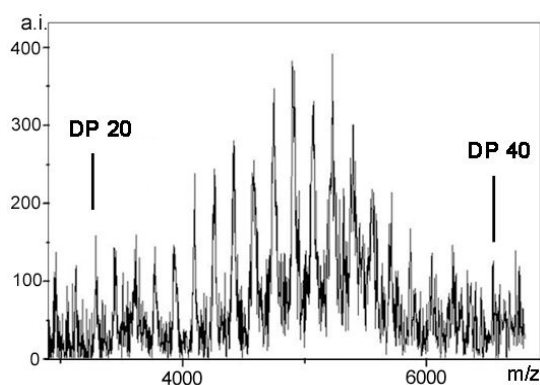


Figure III-17 : Profil MALDI-TOF de la fraction **ASP20-40** (source : S. Kitamura).

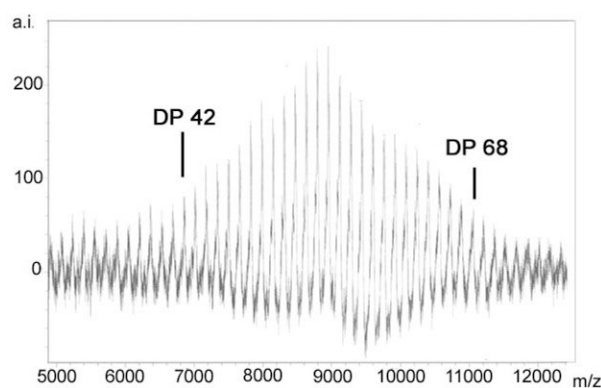


Figure III-18 : Profil MALDI-TOF de la fraction **ASP40-70**.

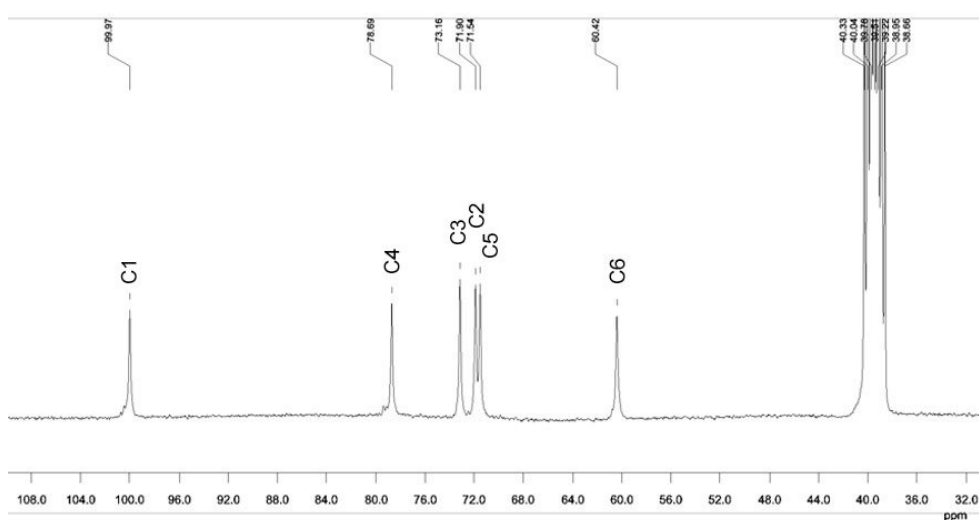


Figure III-19 : Analyse par RMN ^{13}C de la fraction **ASP40-70** dans $\text{DMSO}d_6$.

Tableau III-7 : Déplacements chimiques caractéristiques et numérotation des carbones dans le spectre de RMN ^{13}C de la fraction ASP40-70. Les déplacements chimiques définis par **Bock et al. (1989)** et **Jodelet et al. (1998)** sont indiqués entre parenthèses.

Numérotation des carbones	Déplacement chimique (ppm)
1	99,97 (100,6)
2	71,9 (72,6)
3	73,16 (74,2)
4	78,69 (78,4)
5	71,54 (72,3)
6	60,42 (61,6 - 62)

Le spectre RMN ^{13}C de la fraction ASP40-70 est présenté sur la Figure III-19. Les déplacements chimiques des 6 principaux signaux correspondent à ceux référencés par **Bock et al. (1989)** et **Jodelet et al. (1998)**. Le signal correspondant au C4 à l'extrémité non

réductrice de la chaîne, à $\delta \sim 70,15$ ppm, est absent (Tableau III-7), la longueur des chaînes analysées étant trop élevée pour observer un signal des carbones en bout de chaînes.

Aucun signal caractéristique d'un C6 ou d'un C1 liés en $\alpha(1,6)$, respectivement $\delta \sim 68$ et $\delta \sim 99,4$ ppm, n'apparaît, ce qui confirme la linéarité de la fraction ASP40-70 (**Bock et al., 1989 ; Jodelet et al., 1998**). De plus, les faibles signaux correspondant à la présence de petites molécules, $\delta \sim 76-78,5$ et $\delta \sim 81,5-82,5$ ppm sont aussi absents, ce qui indique l'absence d'une contamination par des maltooligosaccharides.

4. CONCLUSION

Nous avons préparé des fractions d' α -D-glucanes par différentes méthodes et déterminé leur gamme de DP, polydispersité et taux de branchement. Nous avons préparé trois fractions de dextrines limites, deux à partir d'amidon de pomme de terre, **DLP(1)** et **DLP(2)** et une à partir d'amidon de pois ridé (**DLPR**). Ces deux fractions sont polydisperses avec une gamme de DP de 5 à 49. Les taux de branchement différents pour **DLP(1)** (4,8%), **DLP(2)** (6,1%) et **DLPR** (4,4%) sont dus aux différences de structure moléculaire de l'amylopectine dans les grains d'amidon de pomme de terre et ceux de pois ridé (**Robin et al., 1974 ; Colonna et al., 1982**).

La troisième fraction, **MDR**, a été obtenue par fractionnement de maltodextrines commerciales après hydrolyse enzymatique de grains d'amidon de maïs standard par une α -amylase. La fraction est polydisperse et présente un taux de branchement de 8,5%. La structure de l'amylopectine de l'amidon de maïs standard se caractérise par un nombre de liaisons $\alpha(1,6)$ plus important que dans le cas de l'amylopectine de pomme de terre. De plus, l'action d'une α -amylase ne coupant que les liaisons $\alpha(1,4)$ augmente le pourcentage de points de branchement du produit dextrinisé par rapport à l'amidon natif.

Les fractions obtenues par synthèse enzymatique par l'amylosaccharase et fractionnées par chromatographie d'exclusion stérique sont très peu polydisperses ($P < 1,05$) et l'analyse par RMN ^{13}C a démontré leur linéarité. Les trois synthèses ASA présentent des polydispersités différentes à cause des modifications opératoires en lien avec le type de matrice utilisé pour la chromatographie. La synthèse par la phosphorylase a aussi permis de préparer des fractions linéaires. Ces fractions sont donc différentes des dextrines préparées à partir d'amidon natif et nous ont permis d'étudier l'influence de la longueur des chaînes, de la polydispersité et du taux de branchement sur la cristallisation *in vitro*.

La dénomination des différentes fractions préparées (utilisées ou non pour la cristallisation) ainsi que leurs caractéristiques moléculaires sont récapitulées dans le Tableau III-8.

Tableau III-8 : Récapitulatif de la dénomination et des caractéristiques des fractions de courtes chaînes d'amylose. En gras, les fractions utilisées pour la cristallisation.

Synthèse ou hydrolyse	DP _{min}	DP _{max}	DP _n	DP _w	P	Nom	Caractéristiques	Technique de mesure du DP
DLP(1)	8	27	n.d.	n.d.	n.d.	DLP(1)8-27	4,8% de points de branchement - présence de maltooligosaccharides	MALDI-TOF
DLP(2)	8	21	n.d.	n.d.	n.d.	DLP(2)8-21	6,1% de points de branchement -	MALDI-TOF
DLPR	5	49	21,27	25,24	1,187	DLPR5-49	4,4% de points de branchement - présence de glucose	HPAEC-PAD
MDR	6	22	n.d.	n.d.	n.d.	MDR6-22	8,5% points de branchement	MALDI-TOF
ASAF1	8	33	17,37	18,32	1,055	ASA(F1)	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	10	25	15,39	15,87	1,031	ASA(1)10-25	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	12	24	n.d.	n.d.	n.d.	ASA(1)12-24	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	13	24	n.d.	n.d.	n.d.	ASA(1)13-24	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	14	27	18,74	19,03	1,016	ASA(1)14-27	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	16	25	n.d.	n.d.	n.d.	ASA(1)26-25	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	17	28	20,9	21,05	1,007	ASA(1)17-28	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	19	29	22,3	22,42	1,005	ASA(1)19-29	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	22	28	n.d.	n.d.	n.d.	ASA(1)22-28	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(1)	23	32	26,04	26,12	1,003	ASA(1)23-32	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(2)	12	23	16,45	16,66	1,013	ASA(2)12-23	linéaire - contamination par maltooligosaccharides et fructose	HPAEC-PAD
ASA(3)	7	13	n.d	n.d	n.d	ASA(3)7-13	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	9	15	11,97	12,09	1,01	ASA(3)9-15	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	9	18	13,97	13,78	1,008	ASA(3)9-18	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	11	19	14,54	14,63	1,006	ASA(3)11-19	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	12	18	15,31	15,39	1,005	ASA(3)12-18	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	14	19	16,31	16,39	1,005	ASA(3)14-19	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	14	21	17,55	17,64	1,005	ASA(3)14-21	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	16	22	19,16	19,23	1,004	ASA(3)16-22	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	18	24	n.d	n.d	n.d	ASA(3)18-24	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	20	25	n.d	n.d	n.d	ASA(3)20-25	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	20	29	24,49	24,58	1,004	ASA(3)20-29	linéaire	HPAEC-PAD
ASA(3)	23	33	27,51	27,63	1,004	ASA(3)23-33	linéaire	HPAEC-PAD
ASP	20	40	n.d	n.d	n.d	ASP20-40	linéaire	MALDI-TOF
ASP	40	70	n.d	n.d	n.d	ASP40-70	linéaire	MALDI-TOF

n.d. : non-déterminé

CHAPITRE IV

CRISTALLISATION EN SOLUTION

Dans ce chapitre, nous présentons les cristaux préparés par ajout d'un précipitant à une solution aqueuse diluée de courtes chaînes d'amylose d'origine et de caractéristiques moléculaires différentes. Pour chaque échantillon, nous avons déterminé la morphologie et les dimensions des cristaux (mesurées sur de populations d'environ 200 objets à partir d'images de MEB, au moyen du logiciel ImageJ). Si le type allomorphique a été déterminé par diffraction des rayons X, les taux de cristallinité n'ont pu être déterminés de façon fiable en raison d'orientations spécifiques propres à chaque échantillon, se traduisant dans les spectres par d'importantes variations d'intensité relative. De plus, certains spectres présentent une bosse de diffusion inhabituelle et inexpiquée à des angles de diffraction 2θ compris entre 5 et 10° , ce qui rend la normalisation des intensités difficile. Par ailleurs, nous avons étudié l'impact de certains paramètres opératoires (temps de cristallisation, température et concentration en amylose) sur la morphologie et l'organisation des cristaux. Tous ces résultats seront confrontés et discutés dans le Chapitre VII consacré à la compréhension des mécanismes de cristallisation de l'amylose A.

1. DEXTRINES LIMITES

Les images de MEB de cristaux préparés à partir des fractions **DLP(1)8-27** et **DLPR** montrent des cristaux oblongs, polydisperses et souvent organisés sous forme de "rosettes" (Figures IV-1a et IV-2). Cette organisation suggère le développement de cristaux individuels à partir d'un même germe. Ceux-ci ont une extrémité apicale en forme de pointe arrondie. La Figure IV-1b montre un cliché de diffraction électronique d'un monocristal hydraté-congelé de l'échantillon **DLP(1)8-27**. Par comparaison avec les clichés présentés par **Imberty *et al.* (1988)**, nous reconnaissons un diagramme enregistré selon l'axe $[140]$ de la maille monoclinique de l'allomorphe A. Le cliché indique que les chaînes sont parallèles au grand axe des cristaux.

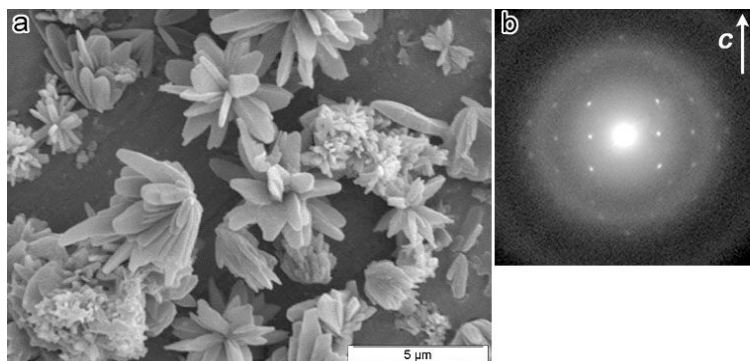


Figure IV-1 : a) Image de MEB des cristaux d'amylose obtenus à partir de dextrines limites de pomme de terre **DLP(1)8-27** ; b) cliché de diffraction électronique de type A d'un monocristal préparé à partir de cette fraction et orienté verticalement.

Les cristaux préparés à partir des fractions **DLP(1)8-27** et **DLPR** se répartissent en deux familles selon leur longueur. La première est constituée de pétales de 1 à 2 μm de long et la seconde de cristaux plus petits, de longueur inférieure à 1 μm (Figures IV-1 et IV-2). Une image de MO en lumière polarisée de cristaux **DLPR** est présentée sur la Figure IV-3. Les cristaux y ont une couleur de polarisation uniforme. En faisant l'hypothèse que les cristaux peuvent avoir des orientations différentes autour de leur grand axe, nous avons conclu que les doubles hélices d'amylose sont parallèles au grand axe des cristaux. Le spectre de DRX des cristaux **DLP(1)8-27** est de type A (Figure IV-4a), tandis que celui des cristaux **DLPR** est de type C (Figure IV-4b), traduisant un mélange des allomorphes A et B, avec une composition allomorphique estimée à 80% de type A et 20% de type B.

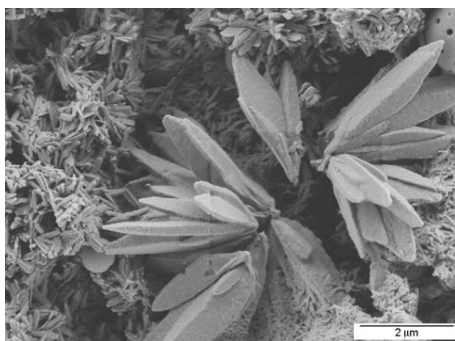


Figure IV-2 : Image de MEB-FEG des cristaux obtenus à partir de la fraction **DLPR**.

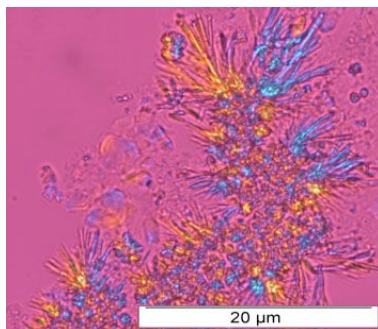


Figure IV-3 : Images de MO en lumière polarisée (avec compensateur λ) des cristaux préparés à partir de la fraction **DLPR**.

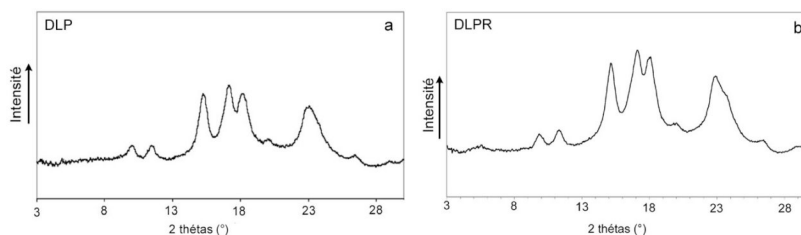


Figure IV-4 : Spectres de diffraction des rayons X des cristaux préparés à partir des fractions **DLP(1)8-27** (a) et **DLPR** (b).

2. MALTODEXTRINES FRACTIONNÉES

Le rendement de cristallisation des dextrines préparées par fractionnement des maltodextrines Roquette est très faible par rapport à la quantité de produit obtenu par cristallisation des autres fractions en conditions standard. Les temps de nucléation sont beaucoup plus longs que pour la cristallisation homogène des dextrines issues de l'hydrolyse acide des grains natifs. A l'intérieur du réacteur, en présence d'acétone, à une température de 58°C, la solution eau/amylose est stable et le faisceau laser ne révèle aucun objet diffusant pendant plus de 8 h. En augmentant le sous-refroidissement ($T=50^{\circ}\text{C}$), une faible précipitation est détectée au bout de 5 h.

La faible quantité de produit obtenu rend difficile la caractérisation par microscopie électronique. Les Figures IV-5a et 5b montrent des images de MET et de MEB du produit. Le précipité contient des objets ovoïdes, de 550-600 nm de longueur moyenne pour le grand axe et 350 ± 60 nm pour le petit. A plus fort grossissement (Figure IV-5a), les objets ont une forme irrégulière qui pourrait correspondre à un empilement de lamelles vues sur la tranche. La Figure IV-6 montre le cliché de DRX de type A des cristaux préparés à partir de la fraction **MDR**.

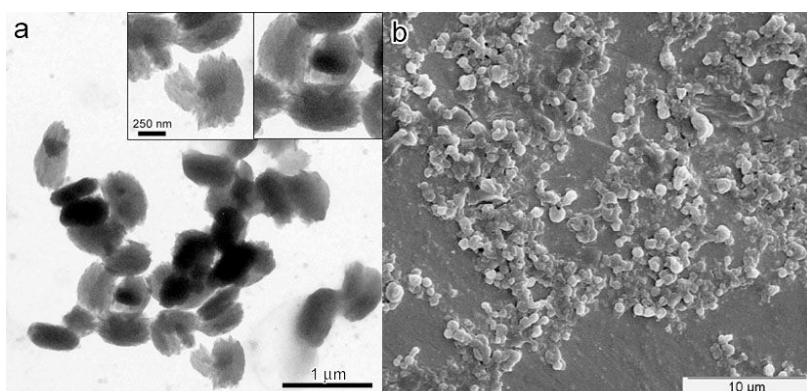


Figure IV-5 : Images de MET (a) et de MEB (b) du précipité préparé à partir de la fraction **MDR**.

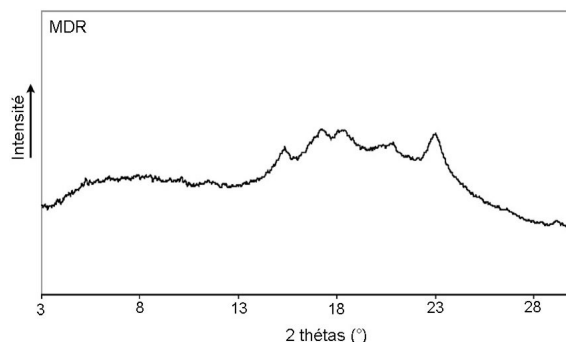


Figure IV-6 : Spectre de DRX des cristaux préparés à partir de la fraction **MDR**.

3. AMYLOSE SYNTHÉTIQUE

3.1. ASA(F1)

Les images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(F1)**, de DP 8-33, montrent des "rosettes" et "d'éventails" composés de monocristaux (Figure IV-7a). Ceux-ci sont des plaquettes d'une longueur moyenne de $3,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$. L'extrémité apicale est plate (Figure IV-7b). Le spectre de DRX des cristaux est de type A (Figure IV-8a) et de qualité bien supérieure à ceux préparés avec les maltodextrines MDR. Un cliché de diffraction électronique enregistré sur un cristal hydraté-congelé permet aussi d'identifier l'allomorphe A (Figure IV-8b). Le cliché indique que l'axe de chaîne *c* est parallèle au grand axe des cristaux.

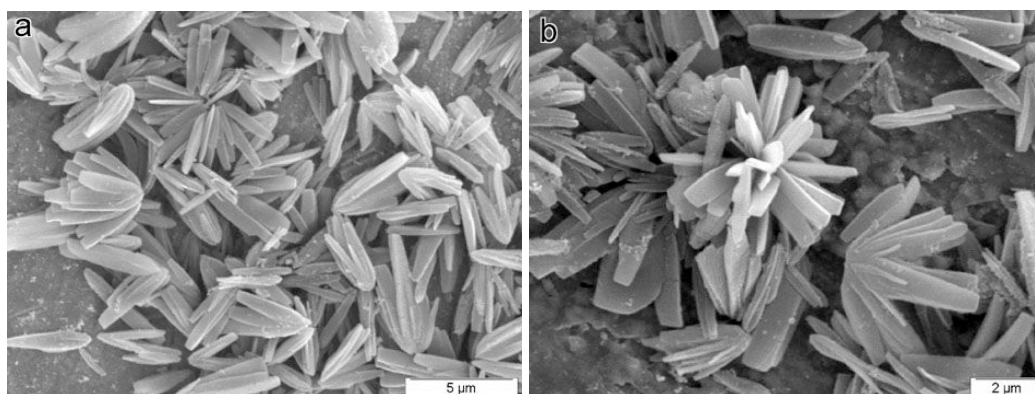


Figure IV-7 : a,b) Images de MEB des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(F1)**.

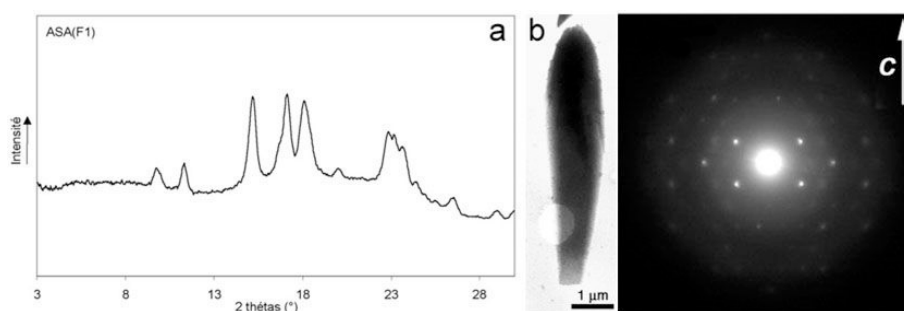


Figure IV-8 : a) Spectre de diffraction des rayons X des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(F1)** ; b) image de MET et cliché de diffraction électronique d'un cristal hydraté-congelé enregistrées à basse température.

3.2. ASA(1)

Les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)10-25** possèdent une forme en ogive avec les deux extrémités pointues minces et une partie centrale plus large et épaisse (Figure IV-9a). L'extrémité qui correspond au point de nucléation est pointue. L'autre

extrémité du cristal est plate ou pointue (Figure IV-9b). Des cristaux individuels cristallisent à partir du même germe et forment des éventails. La longueur moyenne des cristaux est de $4,8 \pm 1,6 \mu\text{m}$. L'épaisseur est variable et celle de la partie centrale des cristaux les plus longs peut atteindre $0,5 \mu\text{m}$.

Les fissures visibles sur les images de MEB sont très probablement provoquées par le séchage des suspensions sur les plots. Le faisceau d'électrons incident peut provoquer la courbure des cristaux les plus fins par chauffage pendant l'observation.

Les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)14-27** sont individuels ou organisés en éventails (Figure IV-10). Ce sont des plaquettes allongées d'une longueur de $4,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$. L'extrémité du côté du site de nucléation est pointue tandis que l'apex est plat. Le spectre de DRX est de type A (Figure IV-11) et très bien résolu.

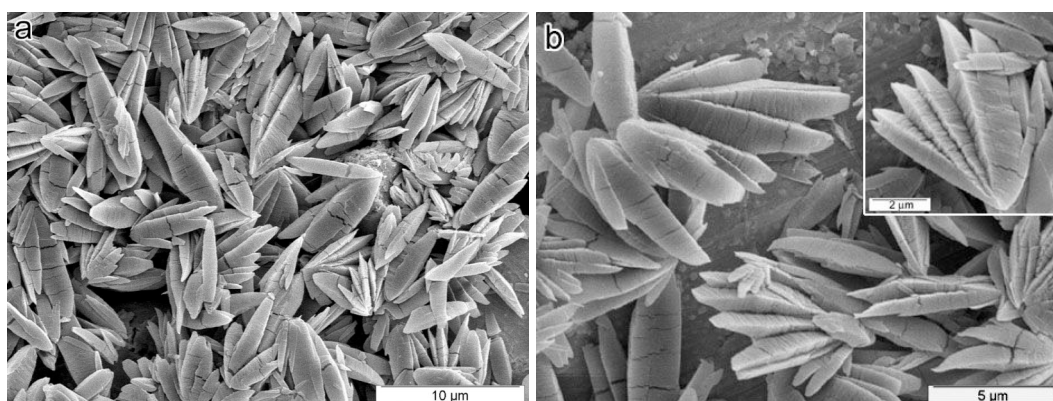


Figure IV-9 : Images de MEB des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)10-25** : a) forme en ogive avec les deux extrémités pointues et la partie centrale plus large ; b) épaisseur variable des cristaux, extrémités minces et partie centrale plus épaisse. En encart : point de nucléation commun à plusieurs cristaux.

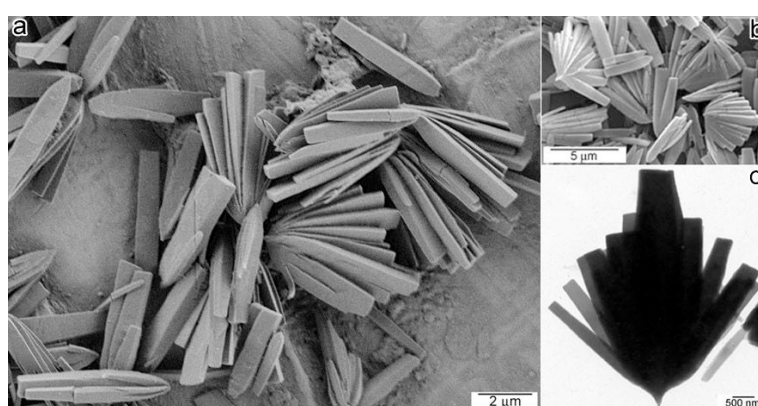


Figure IV-10 : Images de MEB-FEG (a), MEB (b) et MET (c) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)14-27**.

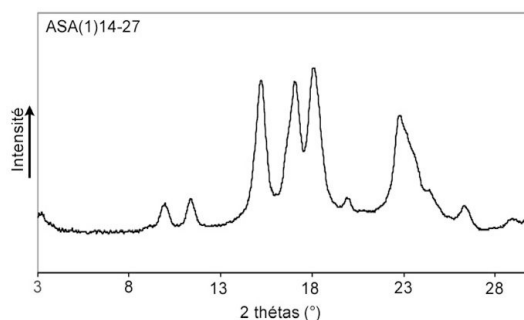


Figure IV-11: Spectre de DRX (type A) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)14-27**.

Les fractions **ASA(1)17-28** et **ASA(1)19-29** forment des cristaux similaires, individuels ou organisés en rosettes (Figures IV-12a, 12b et IV-13). Les monocristaux sont des plaquettes avec l'extrémité apicale plate. La longueur moyenne des cristaux obtenus à partir de la fraction **ASA(1)17-28** est de $4,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$. Ceux obtenus à partir de la fraction **ASA(1)19-29** dans les mêmes conditions de cristallisation sont plus petits avec $3,7 \pm 1,0 \mu\text{m}$ de longueur.

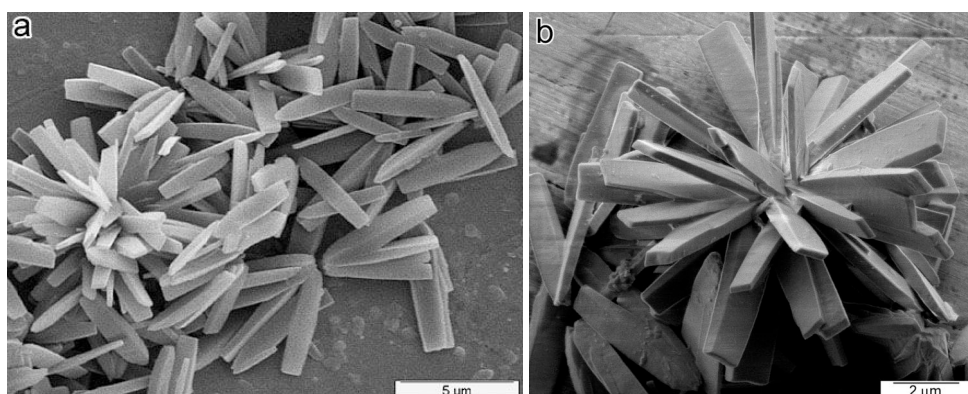


Figure IV-12 : Cristaux obtenus à partir de la fraction **ASA(1)17-28** : a) cristaux individuels (image de MEB), b) rosette (image de MEB-FEG).

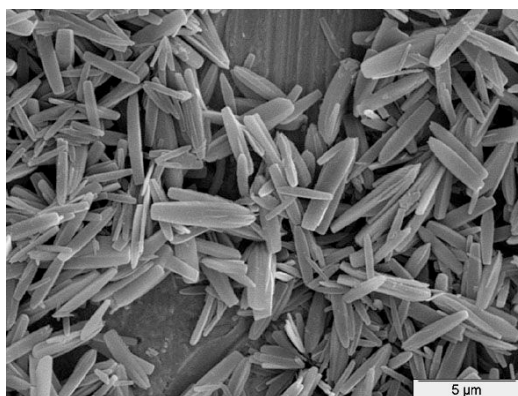


Figure IV-13 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)19-29**.

Les spectres de DRX des cristaux préparés à partir des fractions **ASA(1)17-28** et **ASA(1)19-29** sont de type A (Figures IV-14a et IV-14c). Les clichés de diffraction électronique de cristaux hydratés-congelés préparés à partir de la fraction **ASA(1)17-28**, confirment l'allomorphe A (Figure IV-14b) et indiquent que l'axe de chaîne *c* est parallèle au grand axe des cristaux.

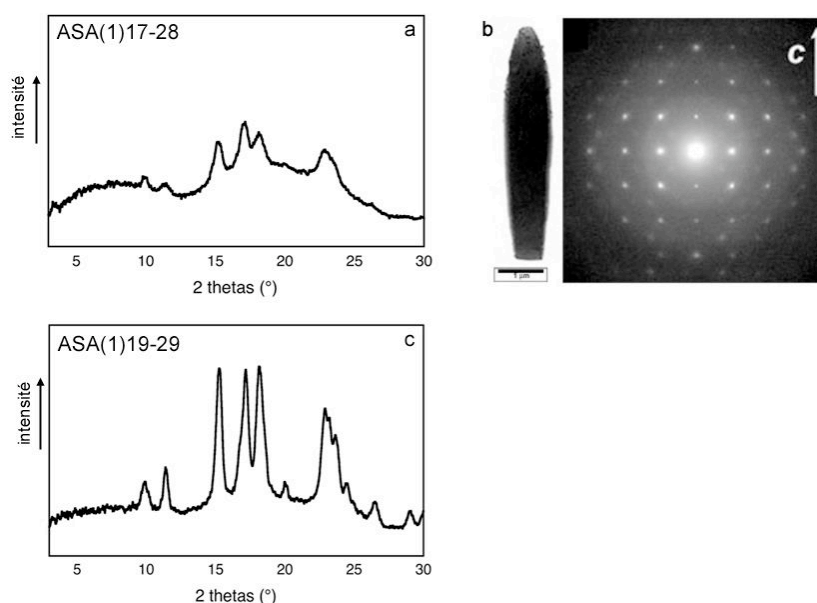


Figure IV-14 : a,c) Spectres de DRX des cristaux de type A préparés à partir des fractions **ASA(1)17-28** et **ASA(1)19-29** ; b) image de MET et cliché de diffraction électronique d'un cristal hydraté-congelé préparé à partir de la fraction **ASA(1)17-28**.

Les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)23-32** sont organisés en rosettes (Figures IV-15a et 15b). Les cristaux individuels, formant les pétales, possèdent une morphologie en ogive et présentent vers l'extérieur une pointe arrondie. Une section transverse en forme de parallélogramme est visible sur certains (Figures IV-15c et 15d). La longueur moyenne est de $2,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$. Le spectre de DRX des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)23-32** est de type A (Figure IV-16).

3.3. ASA(2)

Les cristaux obtenus avec la deuxième synthèse sont globalement les mêmes que ceux préparés à partir des fractions issues de la synthèse **ASA(1)**, avec une gamme de DP similaire. Les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(2)12-23** se différencient surtout par une forme triangulaire. Ils sont souvent individuels mais aussi parfois organisés en rosettes

(Figures IV-17a à 17c). La longueur moyenne est de $4,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$). Les cristaux ne sont pas parfaitement plats mais ont souvent une légère courbure (Figure IV-17d). La section transverse des cristaux est un parallélogramme avec des angles obtus d'environ $\gamma = 120,0 \pm 3,2^\circ$, bien corrélés avec l'angle γ du plan de base de la maille monoclinique de l'allomorphe A (123° dans la structure proposée par **Imberty *et al.* (1988)**) (Figures IV-17e et 17f). Le spectre de DRX des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)12-23** est de type A (Figure IV-18).

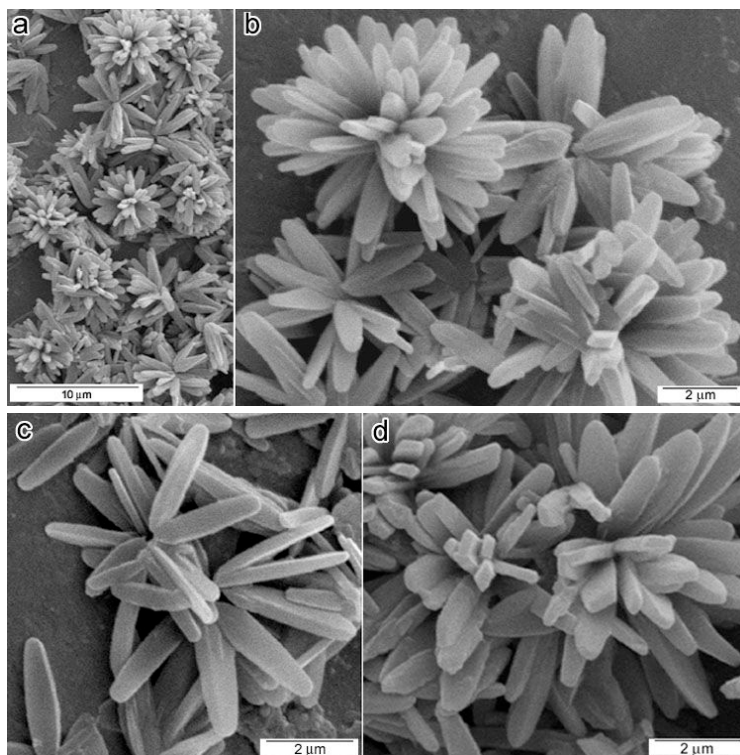


Figure IV-15 : Images de MEB des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)23-32** : a,b) organisation en rosette ; c) morphologie en ogive, d) pointe arrondie et section transverse.

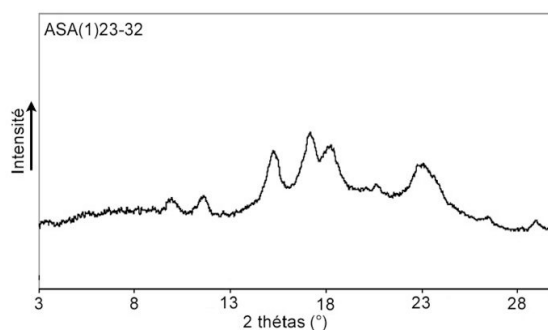


Figure IV-16: Spectre de DRX (type A) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(1)23-32**.

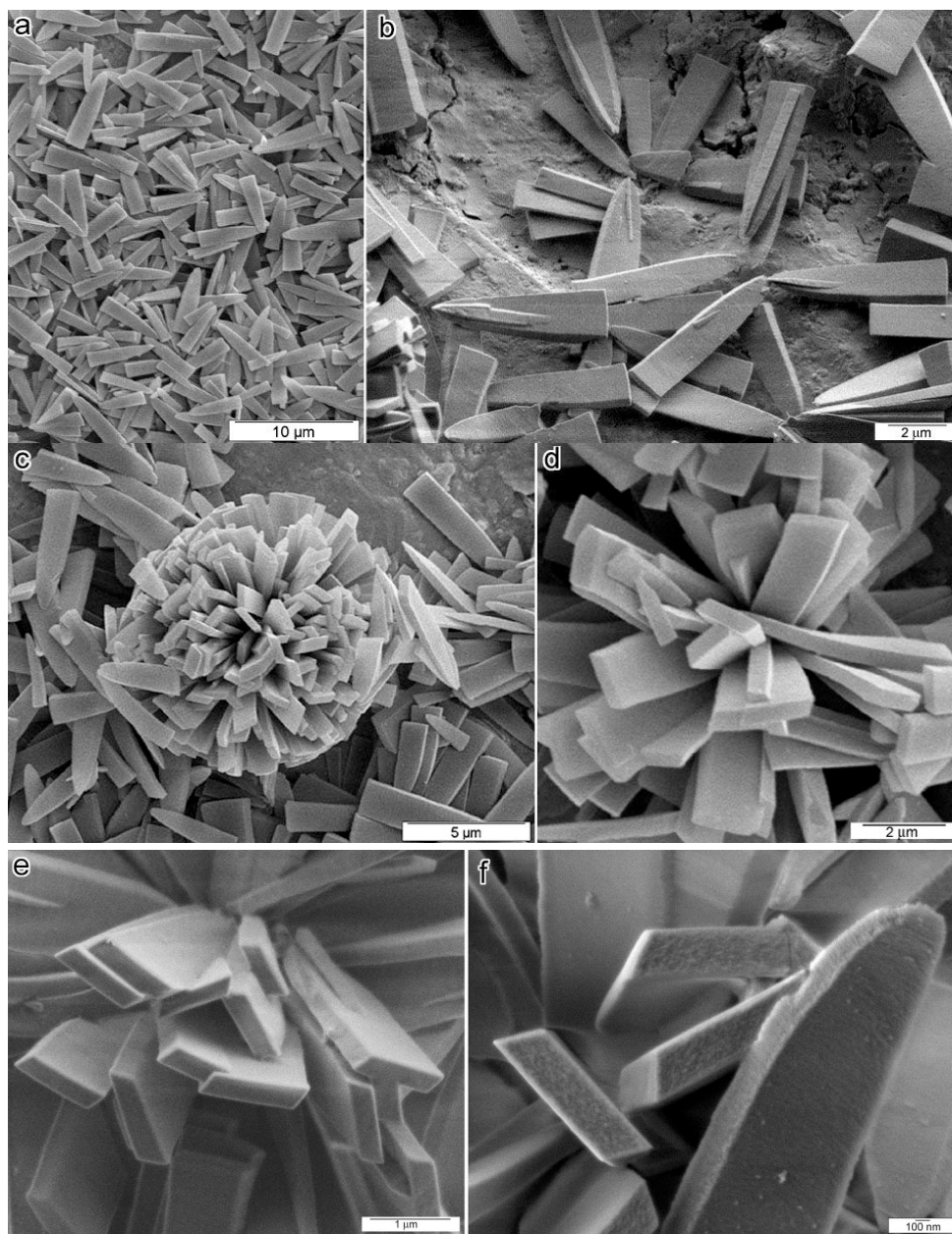


Figure IV-17 : Cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(2)12-23** : a,b) cristaux individuels (images de MEB et MEB-FEG, respectivement); c) organisation en rosette (MEB) ; d) courbure des plaquettes (MEB) ; e,f) section transverse parallélogramme (MEB-FEG).

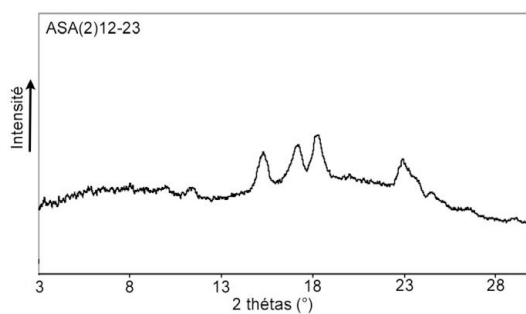


Figure IV-18: Spectre de DRX (type A) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(2)12-23**.

3.4. ASA(3)

Du point de vue de la morphologie, les cristaux préparés à partir des fractions issues de la troisième synthèse sont essentiellement les mêmes que ceux préparés à partir des fractions ASA(1) et ASA(2).

Les images de MEB de microcristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)9-15** montrent des cristaux oblongs en forme d'ogive, souvent organisés en éventail (Figure IV-19a). Les cristaux sont très fins et souvent fissurés ou cassés perpendiculairement au grand axe du cristal. L'extrémité du cristal qui correspond au point de nucléation est pointue, l'apex étant plat ou pointu. La longueur moyenne des cristaux est de $4,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$.

Les cristaux obtenus à partir de la fraction **ASA(3)11-19** présentent aussi une morphologie en ogive (Figure IV-19b). L'épaisseur des cristaux n'est pas homogène. L'extrémité qui correspond au point de nucléation est pointue, l'autre extrémité étant très mince et pouvant être pointue ou plate. Les cristaux sont plus individualisés par rapport aux précédents et ne présentent pas de fissures. La longueur moyenne est de $6,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$.

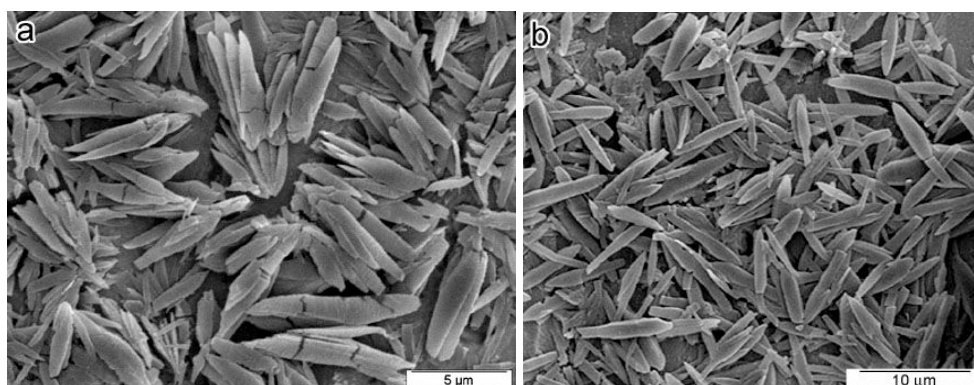


Figure IV-19 : Images de MEB des cristaux préparés à partir des fractions **ASA(3)9-15** (a) et **ASA(3)11-19** (b).

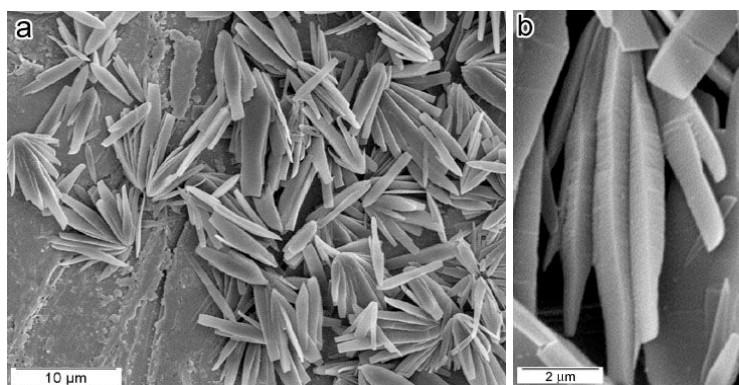


Figure IV-20 : Images de MEB des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)12-18**. a) morphologie en ogive et agrégation en éventail, b) extrémité plate du cristal.

Les cristaux provenant de la fraction **ASA(3)12-18** possèdent une morphologie en ogive et une organisation en éventail avec un cristal central plus grand et, de part et d'autre, des cristaux de plus en plus courts (Figure IV-20a). L'extrémité apicale est, dans la majorité des cas, plate, et plus mince par rapport à la partie centrale du cristal (Figure IV-20b). La longueur moyenne est de $6,7 \pm 1,8 \mu\text{m}$.

Les plaquettes préparées à partir de la fraction **ASA(3)14-21** ont une extrémité pointue et l'apex plat (Figures IV-21a et 21b). La longueur moyenne est de $7 \mu\text{m}$ (écart-type $2,1 \mu\text{m}$). La polydispersité en longueur est donc élevée. Le point de nucléation les cristaux organisés en éventail semble être le cristal central (Figures IV-21b et 21c). La section transverse est un parallélogramme (Figure IV-21d). Le spectre de DRX est caractéristique du type A (Figure IV-22) avec des intensités relatives différentes de celles observées pour les fractions précédentes.

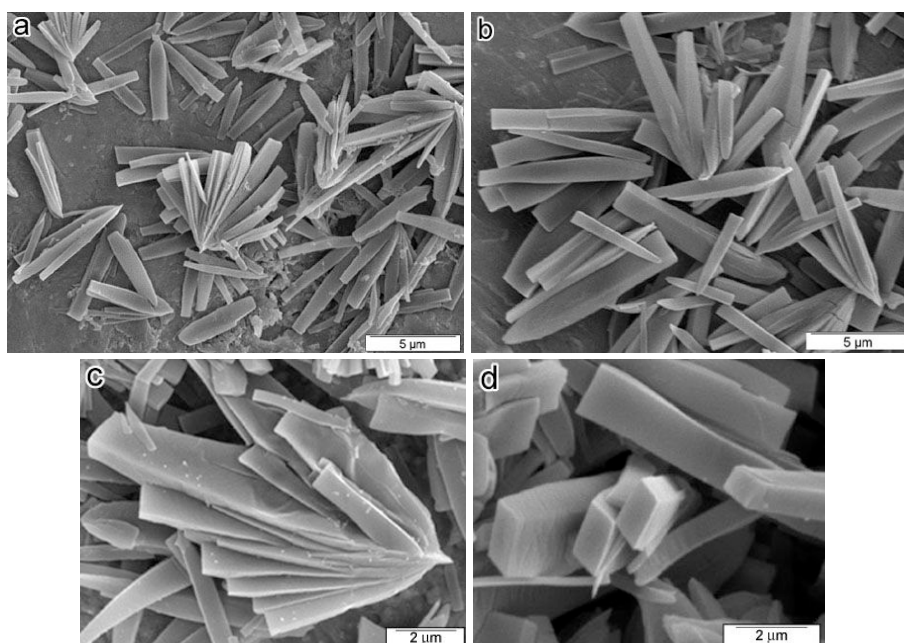


Figure IV-21 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** :
a) vue générale ; b) cristaux individuels ; c) éventails ; d) section transverse.

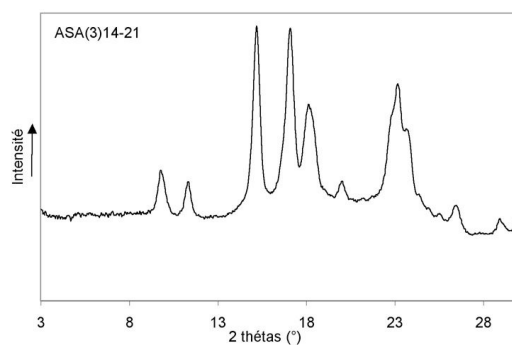


Figure IV-22: Spectre de DRX (type A) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21**.

Les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)16-22** possèdent la même morphologie que les cristaux précédents. On reconnaît les plaquettes individuelles avec une extrémité apicale plate et des cristaux organisés en éventail avec un cristal central plus long, servant de support à la nucléation des cristaux latéraux (Figure IV-23). La longueur moyenne est de $8,5\ \mu\text{m}$ avec un écart-type important de $2,4\ \mu\text{m}$. Le spectre de DRX des cristaux est de type A (Figure IV-24) avec une cristallinité et une résolution très élevées.

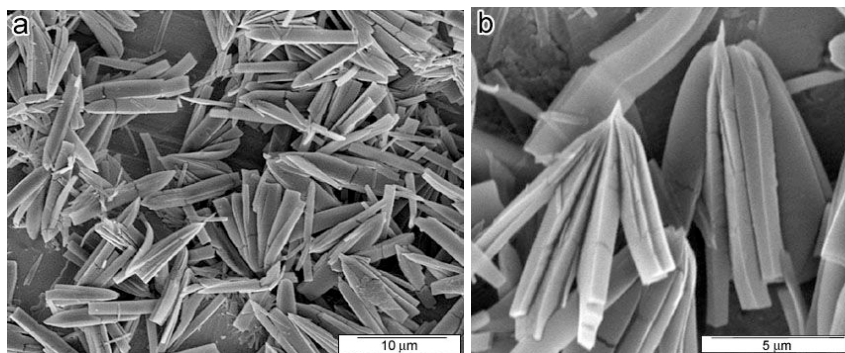


Figure IV-23: Images de MEB des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)16-22** :
a) cristaux individuels et agrégés en éventail, b) morphologie en éventail.

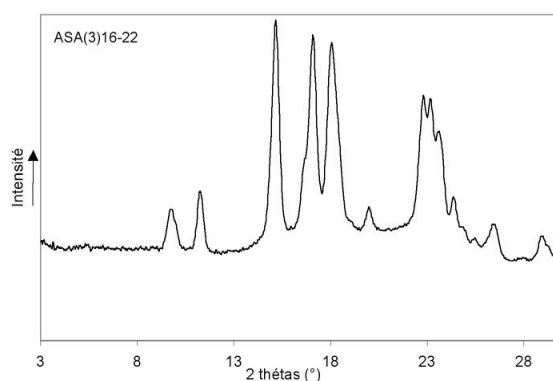


Figure IV-24: Spectre de DRX (type A) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)16-22**.

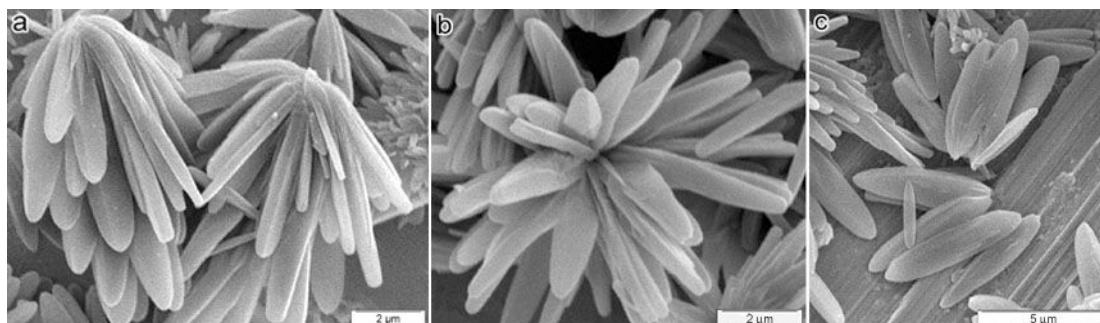


Figure IV-25 : Images de MEB des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)20-29** :
a,b) organisation en rosette ; c) cristaux individuels.

Les images de MEB de cristaux obtenus à partir de la fraction **ASA(3)20-29** montrent des rosettes composées de cristaux très polydisperses (Figures IV-25a et 25b). L'apex des cristaux est arrondi. (Figure IV-25c). La longueur moyenne est de $5 \pm 2 \mu\text{m}$. Le spectre de DRX des cristaux est de type A (Figure IV-26).

Les cristaux formés à partir de fraction **ASA(3)23-33** se présentent sous la forme de rosettes complexes (Figure IV-27a) formées de groupes de cristaux associés dont l'apex est très pointu (Figure IV-27b). On distingue aussi des organisations en forme de "moustache", la croissance cristalline s'étant faite dans deux directions opposées à partir d'un même germe (Figure IV-27b). La longueur moyenne des cristaux est de $2,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$.

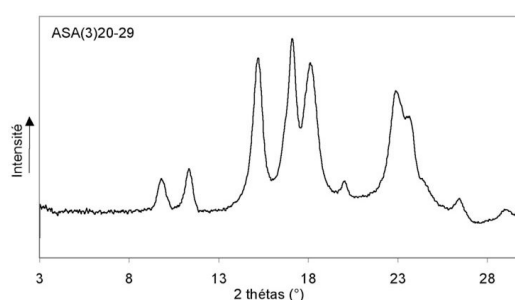


Figure IV-26: Spectre de DRX (type A) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)20-29**.

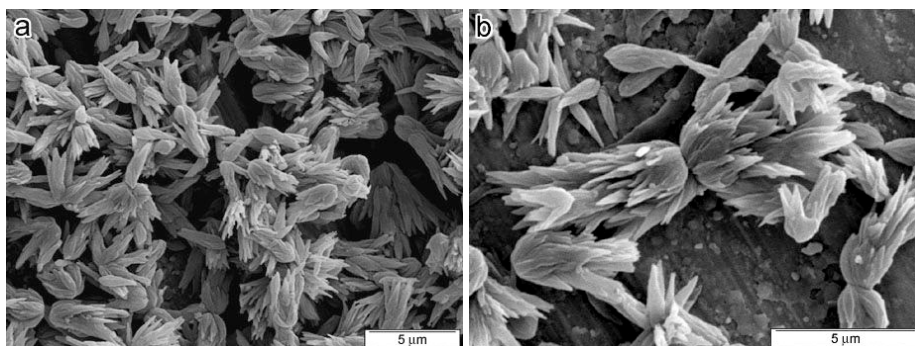


Figure IV-27: Images de MEB des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)23-33** :
a) organisation en rosette, b) agrégation en moustache et cristaux individuels.

3.5. ASP

La fraction **ASP20-40**, synthétisée *in vitro* par la phosphorylase, forme principalement des cristaux en forme d'ogive avec une base arrondie et l'apex pointu (Figure IV-28a). Les images de MET montrent aussi des monocristaux associés symétriquement et partageant le point de nucléation (Figure IV-28b). La longueur moyenne est de $1,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Le spectre de DRX est de type A (Figure IV-29) mais la cristallinité et la résolution sont inférieures à celles des cristaux préparés à partir des fractions ASA.

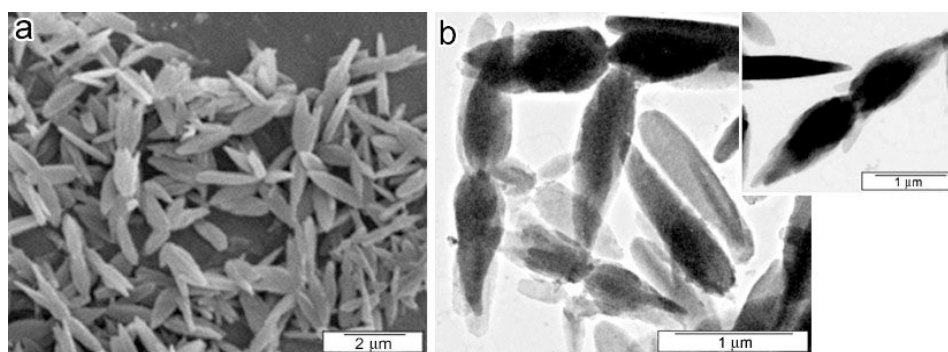


Figure IV-28 : Cristaux préparés à partir de la fraction **ASP20-40** : a) image de MEB ; b et encart) images de MET.

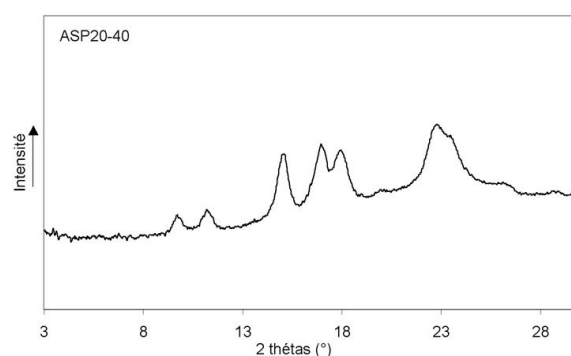


Figure IV-29 : Spectre de DRX (type A) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASP20-40**.

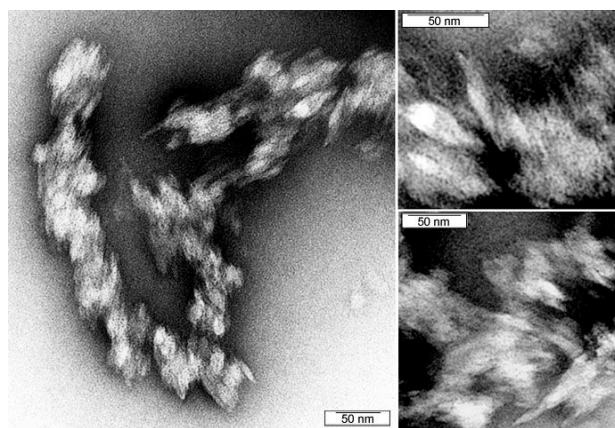


Figure IV-30 : Images de MET en coloration négative du précipité obtenu à partir de la fraction **ASP40-70**.

La fraction **ASP40-70** forme un précipité constitué d'un empilement d'unités élémentaires (Figure IV-30). La taille du précipité rend la caractérisation par MET ou MEB difficile. Le diagramme de DRX de type C est présenté sur la Figure IV-31. La composition allomorphique a été estimée à 75% de type A et 25% de type B.

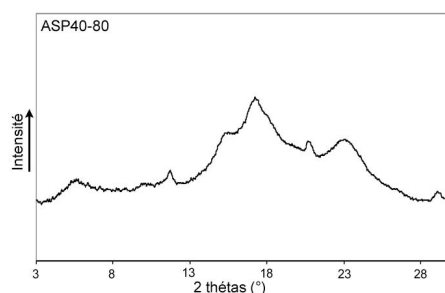


Figure IV-31 : Spectre de DRX (type C) des cristaux préparés à partir de la fraction **ASP40-70**.

Tableau IV-1 : Récapitulatif des caractéristiques morphologiques et structurales des cristaux préparés au cours de ce travail. Les signes + permettent d'évaluer la cristallinité.

Fraction	DP _{min} -DP _{max}	Morphologie	Longueur (μm) [écart-type (μm)]	Cristallinité	Allomorphe
DLP(1)	8-27	fusiforme, extrémité apicale pointue	1,0-2,0	+++	A
DLPR	5-49	fusiforme, extrémité apicale pointue	1,0-2,0	++	C
MDR	6-22	ovoïde	grand axe 550-600 nm petit axe 300-400 nm	+	A
ASA(F1)	8-33	extrémité apicale plate	3,3 [0,8]	+++	A
ASA(1)	10-15	fusiforme, extrémité apicale pointue	4,8 [1,6]	n.d.	n.d.
ASA(1)	14-27	extrémité apicale plate	4,5 [0,7]	+++	A
ASA(1)	17-28	extrémité apicale plate	4,8 [0,6]	++	A
ASA(1)	19-29	extrémité apicale plate	3,7 [1,0]	++++	A
ASA(1)	23-32	pointes arrondies	2,5 [0,7]	++	A
ASA(2)	12-23	triangulaire, extrémité apicale plate	4,2 [1,0]	++	A
ASA(3)	9-15	fusiforme, extrémité apicale plate ou pointue	4,2 [1,4]	n.d.	n.d.
ASA(3)	11-19	fusiforme, extrémité plate ou pointue	6,5 [1,5]	n.d.	n.d.
ASA(3)	12-18	extrémité apicale plate	6,7 [1,8]	n.d.	n.d.
ASA(3)	14-21	extrémité apicale plate	7,0 [2,1]	+++	A
ASA(3)	16-22	extrémité apicale plate	8,5 [2,4]	+++	A
ASA(3)	20-29	pointes arrondies	5,0 [2,0]	+++	A
ASA(3)	23-33	extrémité apicale pointue	2,5 [0,8]	n.d.	n.d.
ASP	20-40	extrémité apicale pointue	1,6 [0,3]	+	A
ASP	40-70	empilements de cristallites	n.d.	+	C

n.d. : non-déterminé

4. ÉVOLUTION MORPHOLOGIQUE PENDANT LA CRISTALLISATION

Nous avons suivi au cours du temps une expérience de cristallisation de la fraction **ASA(3)14-21** en conditions standard (diffusion d'acétone, nucléation à 58°C), à partir du moment où une turbidité est détectée dans la solution au moyen d'un faisceau laser. Nous avons alors procédé à des prélèvements toutes les 6 min, pendant une durée d'environ 90 min. Les prélèvements ont été immédiatement déposés sur des plots métalliques, séchés et métallisés pour être observés par MEB. La température de la solution a diminué de 3°C pendant ce temps (Tableau IV-2). Au bout de 90 min, la solution a été laissée à refroidir à 6°C/h jusqu'à la température ambiante et un échantillon final a été prélevé après 24 h. Quelques images correspondant aux prélèvements à $t=0$, $t=24$ min, $t=60$ min et $t=24$ h sont présentées sur la Figure IV-32. L'apparition de la turbidité détectée par le laser correspond bien à la formation d'entités cristallines déjà parfaitement identifiables mais en petit nombre, incluant notamment des éventails avec une organisation symétrique de cristaux (Figure IV-32a). Ces éventails restent la forme la plus fréquente pendant les 30 premières minutes et leur nombre augmente au cours du temps (Figure IV-32b). Par la suite, un nombre croissant de cristaux plus ou moins individuels et plus longs est observé (Figures IV-32c et IV-32d). Sur certaines images, la disposition "étoilée" de cristaux de longueur similaire suggère que ceux-ci appartenaient à des organisations de type rosette qui ont pu être endommagées durant la manipulation et le séchage.

Même si la Figure IV-32 illustre qualitativement l'augmentation de la longueur moyenne des cristaux, nous avons quantifié plus précisément cette variation en mesurant, pour chaque prélèvement, la longueur et la largeur moyennes ($\bar{L}$ et $\bar{l}$) à partir des images de MEB. $\bar{L}$ a tout d'abord été calculé à partir des mesures effectuées sur environ 100 cristaux par prélèvement. $\bar{l}$ a été calculé à partir de 50 cristaux car il était plus rare de trouver des cristaux bien à plat. Par ailleurs, considérant que les éventails constituaient des distributions de cristaux en croissance, nous avons vérifié la longueur et la largeur étaient corrélés. Pour cela, nous avons déterminé le couple (L, l) pour N cristaux et calculé un facteur de forme moyen défini par:

$$\bar{F} = \frac{1}{N} \sum_i \bar{L}_i / \bar{l}_i \quad (\text{IV-1})$$

La principale difficulté de cette seconde approche a été de trouver sur les images de 30 à 50 cristaux permettant de mesurer simultanément L et l . La statistique est de ce fait un peu moins bonne mais nous avons vérifié que les valeurs moyennes restaient proches de celles calculées à partir de 100 cristaux.

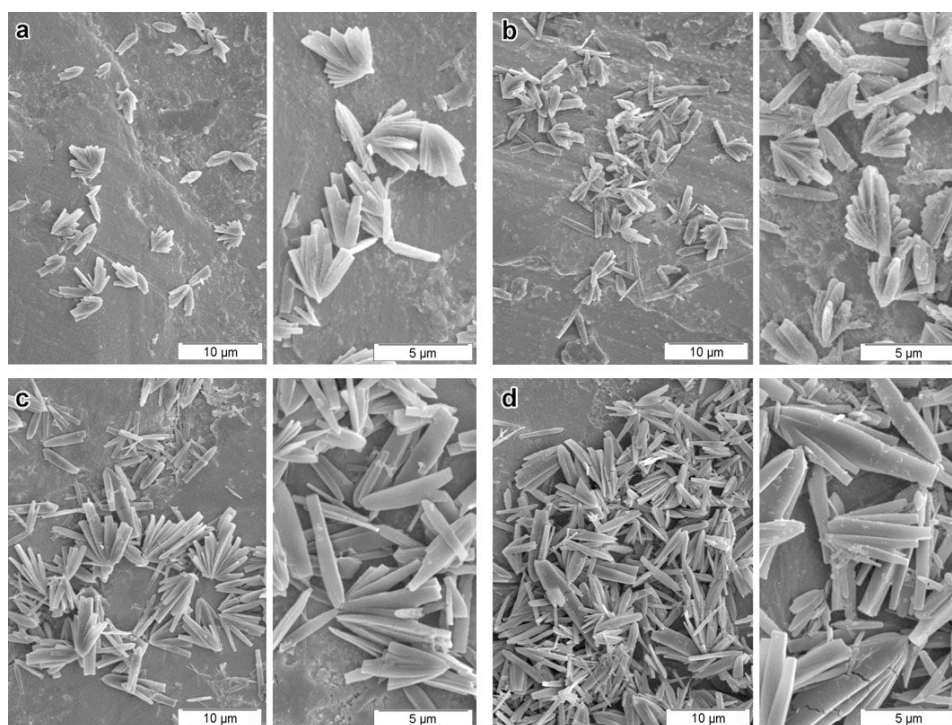


Figure IV-32 : Images de MEB d'échantillons prélevés pendant la cristallisation de la fraction **ASA(3)14-21** : a) $t=0$; b) $t=24$ min ; c) $t=60$ min ; d) $t=24$ h. Pour chaque prélèvement, une image en champ large (à gauche) et une autre plus grossie (à droite) sont présentées.

Tableau IV-2 : Longueur moyenne, largeur moyenne et facteur de forme (défini par l'expression IV-1) et pente (p) de la régression linéaire des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** et prélevés au cours de la cristallisation. Les mesures ont été effectuées à partir d'images de MEB.

Temps (min)	Température (°C)	$\bar{L}$ (µm) [écart-type (µm)]	$\bar{l}$ (µm) [écart-type (µm)]	$\bar{F}$ [écart-type]	p
0	58	3,7 [0,7]	0,8 [0,1]	4,5 [0,7]	4,4
6	58	3,6 [0,6]	0,7 [0,2]	4,9 [1,0]	4,6
12	58	4,0 [0,7]	0,8 [0,1]	5,2 [0,7]	5,1
18	57	4,2 [0,9]	0,8 [0,2]	5,3 [0,9]	5,0
24	57	4,9 [0,6]	0,9 [0,2]	5,7 [1,0]	5,4
30	57	5,7 [1,0]	0,9 [0,2]	6,2 [0,8]	6,1
36	56	5,4 [1,2]	0,9 [0,2]	6,2 [1,0]	6,0
42	56	6,1 [1,2]	1,0 [0,2]	6,4 [1,2]	6,1
54	56	6,5 [1,6]	1,0 [0,3]	6,6 [1,3]	6,2
60	55	6,5 [1,0]	0,9 [0,2]	7,3 [0,9]	7,1
66	55	7,0 [0,9]	1,0 [0,2]	7,1 [1,3]	6,7
78	55	7,1 [0,8]	1,0 [0,2]	7,2 [1,2]	6,6
1400	25	7,0 [0,8]	1,0 [0,2]	7,2 [1,1]	6,8

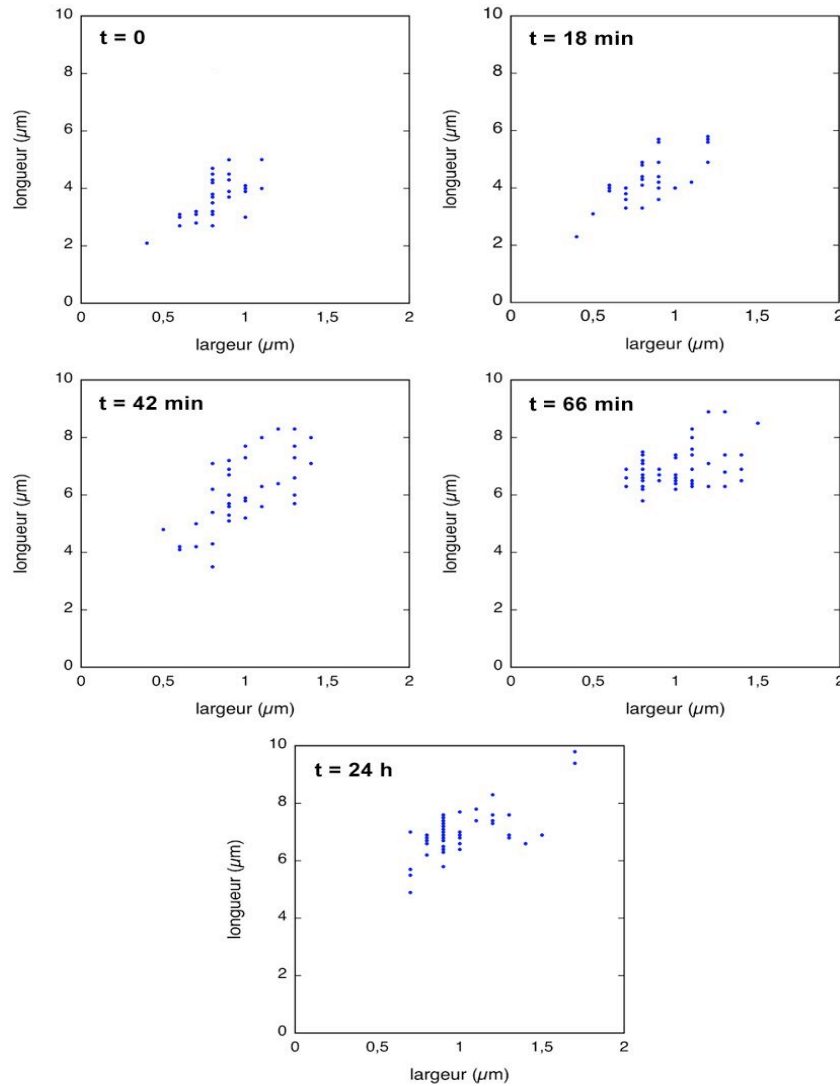


Figure IV-33 : Corrélation entre la longueur et la largeur de cristaux prélevés pendant une expérience de cristallisation (fraction **ASA(3)14-21**) et évolution en fonction du temps. Les dimensions ont été mesurées à partir d'images de MEB. Le prélèvement à $t=0$ correspond au moment où le faisceau laser est diffusé par la solution. Le prélèvement à 24 h a été fait après refroidissement de la solution jusqu'à la température ambiante.

Comme le montrent les Figures IV-33 et IV-34, nous pouvons néanmoins dégager quelques tendances. Sur la Figure IV-33, nous avons représenté, pour chaque prélèvement, un nuage de points (L, l) décrivant la population de cristaux. Ce nuage est généralement ellipsoïdal. Une régression linéaire passant par l'origine a permis d'évaluer et de comparer la corrélation $L=p \times l$ pour chaque prélèvement, où p est la pente de la droite de régression, homogène à un facteur de forme. Les graphiques étant à la même échelle, ils démontrent qu'au cours du temps, le nuage de points "glisse" vers le haut ($\bar{L}$ augmente) mais peu vers la droite ($\bar{l}$ augmente peu). Ceci est illustré différemment par les graphiques de la Figure IV-34. Sur le

premier (Figure IV-34a), nous avons représenté la variation de $\bar{L}$ et $\bar{l}$ en fonction du temps de cristallisation. La longueur des cristaux augmente plus rapidement que la largeur (de près de 50% pour $\bar{L}$ contre moins de 20% pour $\bar{l}$) pour se stabiliser après 60 min. L'effet est aussi visible sur le second graphique (Figure IV-34b) qui montre l'accroissement régulier de $\bar{F}$ (près de 40%) en fonction du temps avec une stabilisation après 60 min.

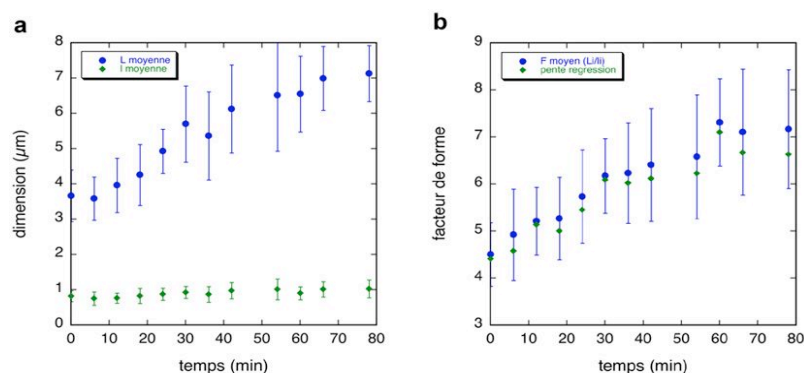


Figure IV-34 : a) Evolution de la longueur et de la largeur moyennes de populations de cristaux pendant la cristallisation (fraction **ASA(3)14-21**) ; b) Evolution du facteur de forme moyen de ces cristaux au cours du temps et comparaison avec l'évolution de la pente de la régression linéaire déterminée à partir des nuages de points $L=p \times l$ de la Figure IV-33.

5. VARIATION DES CONDITIONS DE CRISTALLISATION

5.1. Température du réacteur

La formation des cristaux d'amylose A est induite par refroidissement à vitesse contrôlée en présence d'acétone. Pour étudier l'effet de la température sur la morphologie et sur le mode de croissance des cristaux, ceux-ci ont été préparés en faisant varier la température du réacteur et la vitesse de refroidissement. Nous avons utilisé la fraction **ASA(3)14-21** dont la quantité était suffisante pour réaliser plusieurs essais de cristallisation. Les conditions de cristallisation sont détaillées dans le Tableau IV-3.

En conditions standard, la solution eau/amylose a été refroidie à une vitesse de $6^\circ\text{C}/\text{h}$ à partir de 60°C . La cristallisation a lieu vers 55°C . Les cristaux correspondants ont été présentés au § 3.4 de ce chapitre (Figure IV-21). Ils ont une longueur moyenne de $7,0 \pm 2,1 \mu\text{m}$ avec une largeur variant de 0,6 à 1,0 μm . Dans les conditions de nucléation à plus basse température, le réacteur a tout d'abord été refroidi à 50°C , température de la solution lorsque l'acétone arrive à son contact en phase vapeur. La solution est ensuite refroidie à une vitesse de $6^\circ\text{C}/\text{h}$ jusqu'à température ambiante. Dans ces conditions, la condensation de l'acétone sur

les parois du réacteur est importante et, par conséquent, la quantité finale d'acétone dans la solution est supérieure à celle condensée en conditions standard. Les images de MEB de la Figure IV-35 montrent des cristaux préparés à 50°C. Leur morphologie est globalement la même que celle obtenue en conditions standard. L'extrémité apicale est plate. La longueur moyenne est de $5,7 \pm 1,5 \mu\text{m}$, légèrement inférieure à celle mesurée en conditions standard.

Le type morphologique des cristaux préparés à plus haute température (58°C) est le même que celui des cristaux obtenus en conditions standard (Figure IV-36). Leur longueur moyenne est de $9,6 \pm 1,5 \mu\text{m}$ et leur largeur de $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Nous avons parfois observé quelques cristaux de longueur supérieure à $20 \mu\text{m}$ (Figures IV-36b et 36c).

Cependant, si l'on maintient le réacteur à 60°C, l'acétone tend à rester en phase vapeur et la quantité passant en solution peut être trop faible pour déclencher la cristallisation. Pour augmenter encore la température de cristallisation, nous avons donc changé de précipitant et utilisé l'éthanol, dont la température d'ébullition est de 78°C. Ainsi, nous avons pu maintenir le réacteur plus longtemps à 60°C tout en solubilisant suffisamment de précipitant. Les cristaux formés à 60°C sont présentés sur la Figure IV-37. Ce sont des plaquettes très allongées dont l'extrémité apicale est plate. La longueur moyenne est de $10,1 \pm 1,3 \mu\text{m}$.

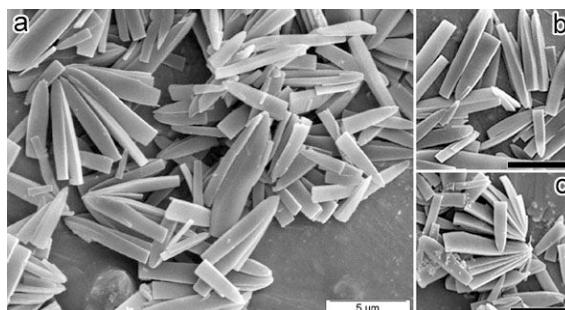


Figure IV-35 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** à 50°C par diffusion d'acétone. Barres d'échelle dans b et c : $5 \mu\text{m}$.

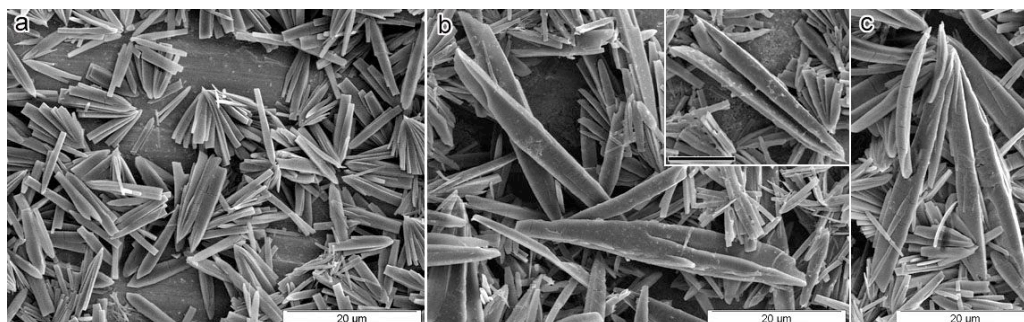


Figure IV-36 : Images de MEB de cristaux préparées à partir de la fraction **ASA(3)14-21** à 58°C par diffusion d'acétone. Barre d'échelle dans l'insert : $10 \mu\text{m}$.

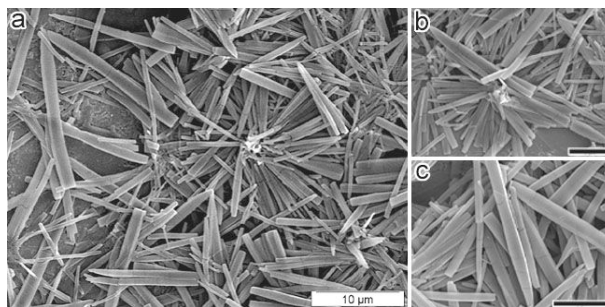


Figure IV-37 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** à 60°C par diffusion d'éthanol. Barres d'échelle dans b et c : 5 µm.

Tableau IV-3 : Récapitulatif des conditions de cristallisation de la fraction **ASA(3)14-21** à différentes températures. Dimensions et facteur de forme des cristaux obtenus.

précipitant	T nucléat. (°C)	cinétique de refroidissement	$\bar{L}$ (µm) [écart-type (µm)]	$\bar{l}$ (µm) [écart-type (µm)]	$\bar{F}$ [écart-type]	p
acétone	50	6°C/h	5,8 [1,6]	1,2 [0,3]	4,9 [0,8]	4,8
acétone	55	6°C/h	7,0 [1,4]	1,0 [0,2]	7,2 [0,8]	7,0
acétone	58	30 min à 60°C + 3 h à 1,6°C/h à 6°C/h	9,7 [1,0]	1,1 [0,2]	9,0 [1,1]	8,7
éthanol	60	30 min 60°C + 3 h à 1,6°C/h à 6°C/h	10,1 [3,1]	0,7 [0,2]	14,4 [2,2]	14,3

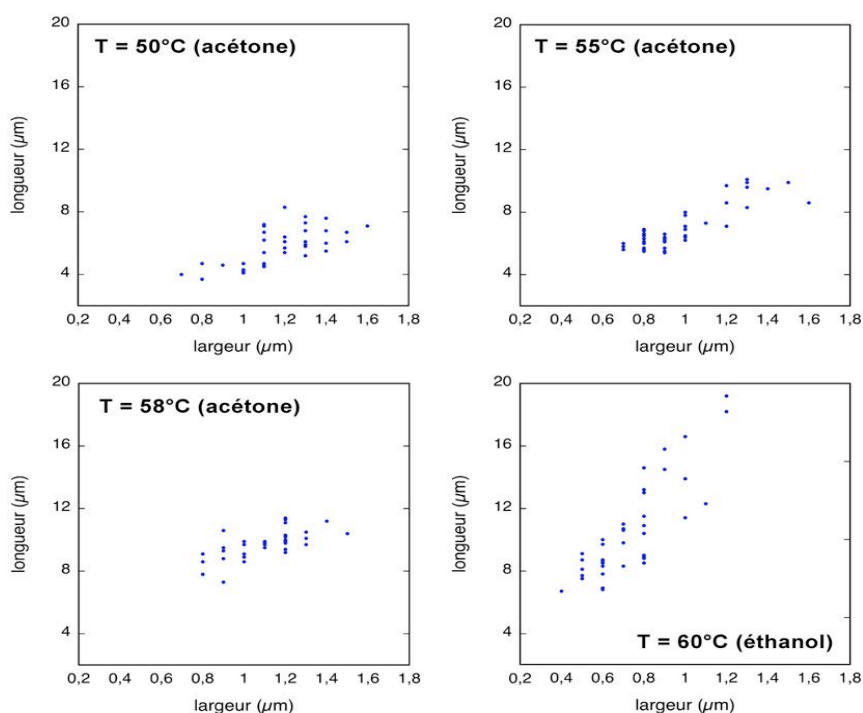


Figure IV-38 : Corrélation entre la longueur et la largeur de cristaux préparés à différentes températures et avec différents précipitants (fraction **ASA(3)14-21**). Les dimensions ont été mesurées à partir d'images de MEB.

Sur la Figure IV-38, nous avons représenté, pour chaque prélèvement, le nuage de points (L, l) décrivant la population de cristaux. Ce nuage peut être assimilé à un ellipsoïde très écrasé. La pente de la droite de régression linéaire passant par l'origine a été calculée à partir des nuages de points (Tableau IV-3). Pour les expériences menées avec l'acétone, le nuage de points "glisse" vers le haut ($\bar{L}$ augmente) mais peu vers la droite ($\bar{l}$ augmente peu). Les caractéristiques des cristaux préparés en présence d'éthanol, à plus haute température, sont différentes : $\bar{L}$ est supérieur mais $\bar{l}$ est inférieur. Ceci est illustré différemment sur la Figure IV-39. Sur le premier graphique (Figure IV-39a), nous avons représenté la variation de $\bar{L}$ et $\bar{l}$ en fonction de la température de cristallisation. On voit que la longueur des cristaux augmente plus rapidement que la largeur. L'effet est aussi visible sur le second graphique (Figure IV-39b) qui montre l'accroissement de $\bar{F}$ en fonction de la température de cristallisation. $\bar{F}$ est sensiblement plus élevé dans le cas de l'éthanol car $\bar{L}$ a continué de croître tandis que $\bar{l}$ diminuait, ce qui est parfaitement illustré par la forme d'aiguille des cristaux (Figure IV-37).

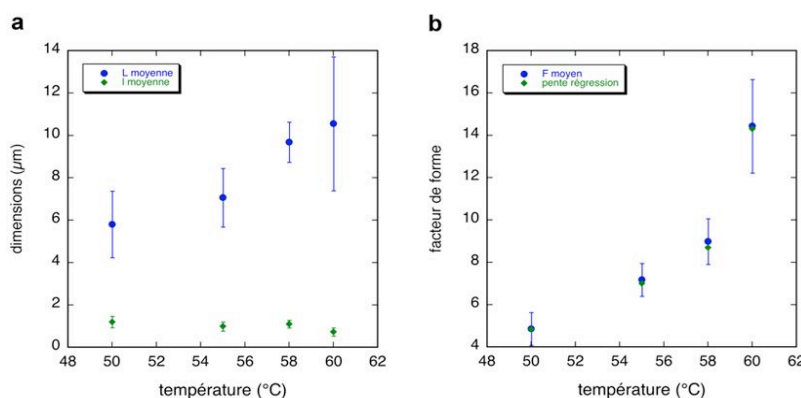


Figure IV-39 : a) Evolution de la longueur et de la largeur moyenne de cristaux en fonction de la température de cristallisation et du précipitant (fraction **ASA(3)14-21**) ; b) Evolution du facteur de forme moyen de ces cristaux en fonction de la température de cristallisation et de la pente de la régression linéaire déterminée à partir de la Figure IV-38.

5.2. Concentration en amylose

Nous avons préparé une série de solutions contenant des concentrations croissantes en amylose, de 0,1 à 5,0% (p/v), que nous avons cristallisées en conditions standard (diffusion de vapeurs d'acétone dans une solution à 55°C). Nous espérons en particulier identifier la concentration à partir de laquelle des sphérocristaux tels que ceux décrits par **Helbert et al. (1993)** se formaient, et mieux comprendre le passage de l'organisation en rosette à la forme sphérulitique dense. Les cristaux ont été préparés à partir des deux fractions disponibles en

quantité suffisante pour effectuer ces différents essais. **ASA(3)14-21** et **ASA(3)16-22** possèdent des gammes de DP et des $\overline{DP}_n$ similaires et forment, en conditions standard, des cristaux de même morphologie (Figures IV-21 et IV-23). La fraction **ASA(3)14-19** a par ailleurs été cristallisée à une concentration de 5% en ajoutant de l'acétone liquide chaud.

Les cristaux obtenus à partir de la fraction **ASA(3)14-21** à une concentration initiale de 0,1% (p/v) sont présentés Figure IV-40. Ils sont organisés en éventails. Ce sont des plaquettes dont l'extrémité apicale est plate. La longueur moyenne est de $6,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$. Les cristaux préparés à partir de la même fraction à une concentration de 0,5% sont présentés sur la Figure IV-41. Ils ont une morphologie similaire mais des rosettes contenant un nombre plus élevé de cristaux sont plus fréquemment observées. La section transverse est parallélogramme et la longueur moyenne des cristaux est de $6,9 \pm 1,3 \mu\text{m}$. La figure de biréfringence optique des rosettes évoque la croix de Malte observée avec les sphérulites (Figure IV-42).

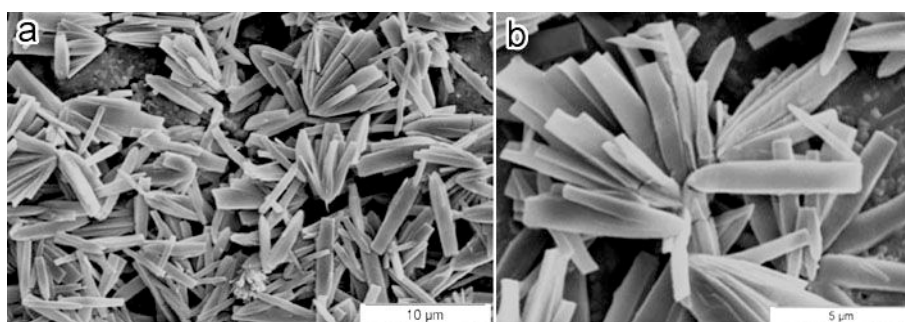


Figure IV-40 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** à une concentration de 0,1% : a) vue générale, les cristaux sont individuels ou associés en éventail ; b) forme en plaquette et extrémité apicale plate.

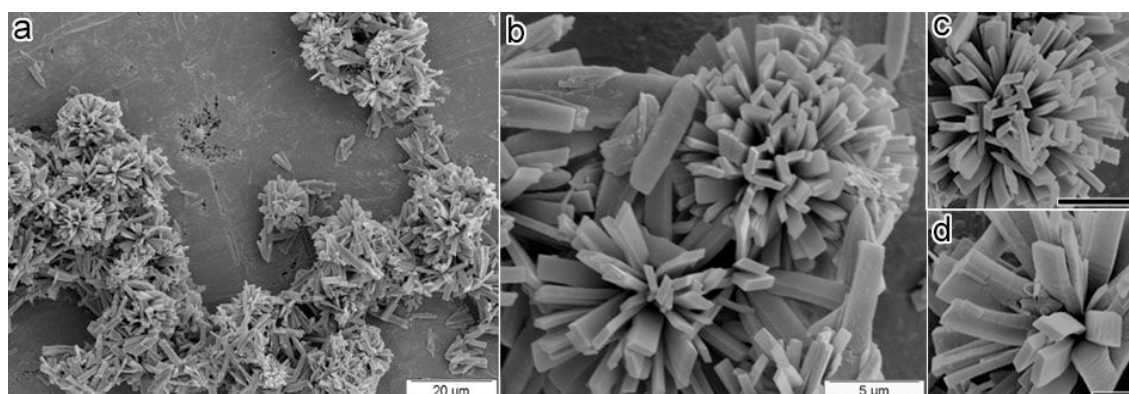


Figure IV-41 : Images de MEB de cristaux obtenus à partir de la fraction **ASA(3)14-21** à une concentration de 0,5% (p/v) : a) vue générale des cristaux associés en rosette ; b-d) extrémité apicale plate des cristaux et section transverse parallélogramme.

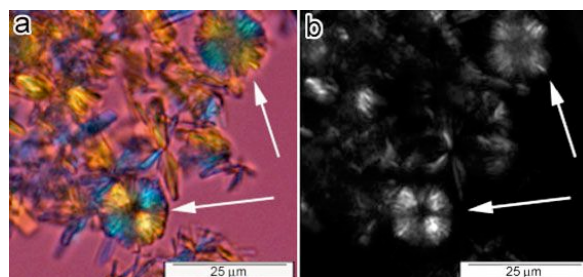


Figure IV-42 : Images de microscopie optique en lumière polarisée de cristaux associés en rosette préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** à une concentration de 0,5%. Les images ont été enregistrées entre polariseurs croisés avec (a) et sans (b) lame de retardement λ . Les flèches blanches indiquent les rosettes.

Les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)16-22** à 1% (p/v) sont organisés en rosettes et en éventails (Figure IV-43a). Leur longueur moyenne est de $7,0 \pm 1,3 \mu\text{m}$. Dans certaines zones de l'échantillon, nous avons observé des grands éventails de cristaux enchâssés les uns dans les autres et dont l'apex évoque une queue d'hirondelle asymétrique (Figures IV-43b à 43d). De plus, ces cristaux semblent creux (Figure IV-43c) et peuvent atteindre $25 \mu\text{m}$ de long. Néanmoins, cette nouvelle morphologie cristalline n'ayant pas été obtenue de manière reproductible, nous ne savons pas quelles sont les conditions locales de cristallisation ayant conduit à son développement.

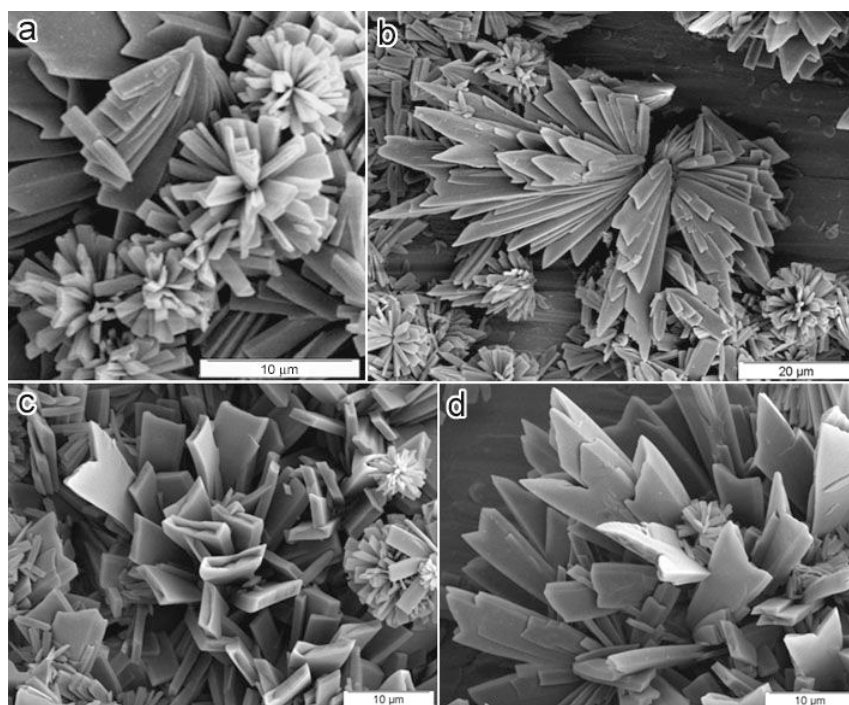


Figure IV-43 : Images de MEB des cristaux obtenus à partir de la fraction **ASA(3)16-22** à une concentration de 1% (p/v) : a) cristaux associés en rosette ; b) en éventail ; c) extrémité apicale creuse avec une section transverse en parallélogramme ou en "queue d'hirondelle" (d).

Les cristaux préparés à une concentration de 2 et 4% (p/v) à partir de la fraction **ASA(3)16-22** sont présentés sur la Figure IV-44. Les rosettes semblent être la forme de cristallisation dominante mais on ne distingue pas de changement morphologique dans les cristaux qui les composent. La longueur moyenne des cristaux préparés à 2 et 4% (p/v) est respectivement de $7,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$ et $7,6 \pm 1,8 \mu\text{m}$.

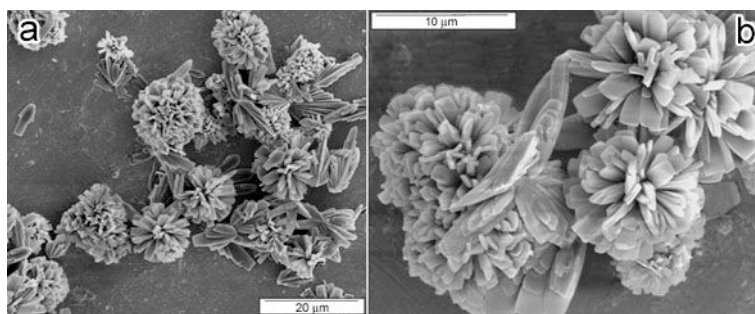


Figure IV-44 : Images de MEB des cristaux obtenus à partir de la fraction **ASA(3)16-22** à une concentration de 2% (p/v) (a) et 4% (p/v). Vue générale des cristaux associé en rosette possédants une extrémité apicale plate et une section transverse parallélogramme.

Ne constatant pas d'évolution significative des formes de cristallisation, nous avons conclu que la diffusion lente d'acétone dans les solutions d'amylose, même à concentration plus élevée, n'entraînait pas la formation de sphérocristaux mais que les rosettes restaient la forme majoritaire. Nous avons donc effectué une nouvelle expérience en ajoutant en une seule fois de l'acétone liquide préchauffée à une suspension d'amylose **ASA(3)16-22** à 5% (p/v). Comme on peut le constater sur les images de la Figure IV-45a, les rosettes sont majoritaires, avec un diamètre variant de 20 à 40 μm , mais n'ont toujours une structure continue. La figure de biréfringence optique de rosettes entière est une croix de Malte (Figure IV-46d).

Les rosettes sont maintenant constituées d'un très grand nombre de cristaux et ceci pose à l'évidence un problème topologique intéressant : comment remplir un espace sphérique au moyen de plaquettes qui se développent à partir d'un site unique ? Par nature, les plaquettes forment plus facilement des empilements dont on peut voir des exemples dans les Figures IV-45b et 45c. C'est la composante hélicoïdale qui était déjà visible sur les éventails (Figure IV-21) qui permet de former des organisations inscrites dans une sphère. Un exemple typique est présenté sur la Figure IV-45d. Cependant, cette hélicité n'est pas suffisante pour former des sphères uniformes à partir des plaquettes. Les rosettes sont alors composées de plusieurs "secteurs" dans lesquels les cristaux sont plutôt parallèles.

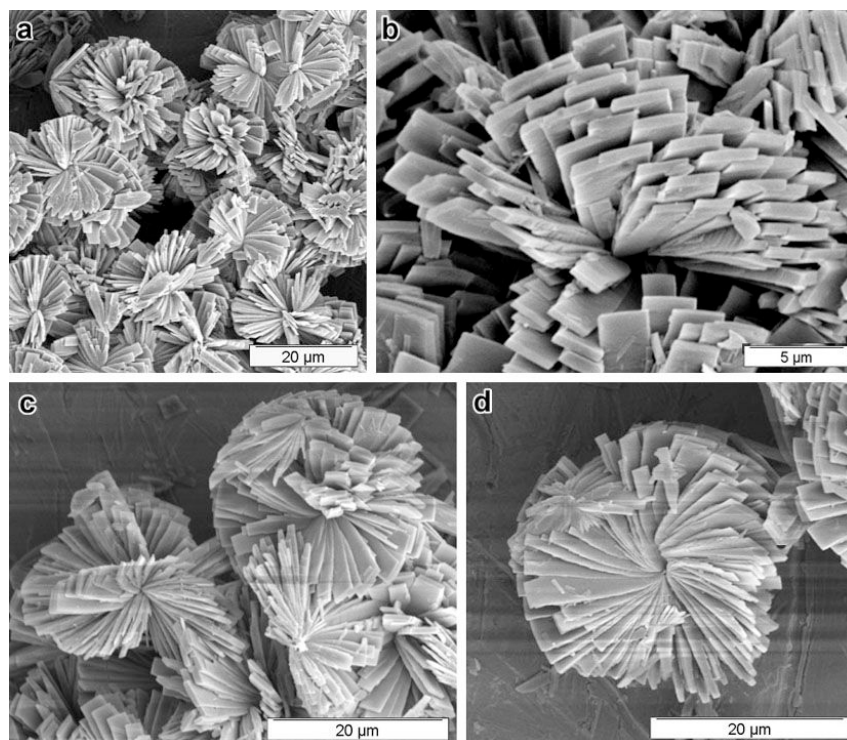


Figure IV-45 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-19** à une concentration de 5% (p/v) par ajout d'acétone chaud.

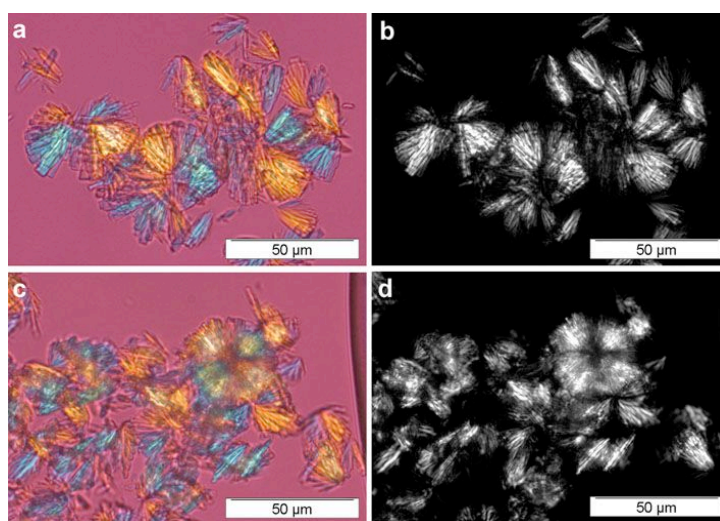


Figure IV-46 : Images de microscopie optique en lumière polarisée de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-19** à une concentration de 5% (p/v) par ajout d'acétone chaud. Les micrographies ont été enregistrées avec (a,c) et sans (b,d) compensateur λ .

A titre de comparaison, nous avons cristallisé la fraction **ASA(3)10-15** en remplaçant l'acétone par de l'éthanol liquide préchauffé. Des objets sphéroïdaux d'un diamètre pouvant atteindre 50 μm constitués d'assemblages très denses de cristaux élémentaires coniques d'une longueur de 10-15 μm sont observés (Figure IV-47). Les objets les plus gros présentent

parfois une cavité centrale. L'organisation radiale évoque celle des rosettes mais la densité de l'empilement des cristaux la rapproche plus de celle des sphérolites tels que ceux décrits par **Helbert *et al.* (1993)** et préparés à partir de solutions à 10% de dextrines limites de pomme de terre (Chap. I, Figures I-34a et 34b). Les figures de biréfringence optique correspondantes (Figures IV-48) évoquent aussi celles de sphérolites de polymères synthétiques (Chap. I, Figure I-23).

Même s'il est difficile d'identifier précisément la géométrie de la section des cristaux élémentaires, celle-ci varie selon les régions observées. La section peut être plate ou bien aussi large qu'épaisse. Il est probable que cette distribution hétérogène de taille et de forme des "briques" élémentaires permette de combler plus facilement l'espace pour atteindre une forme sphérique.

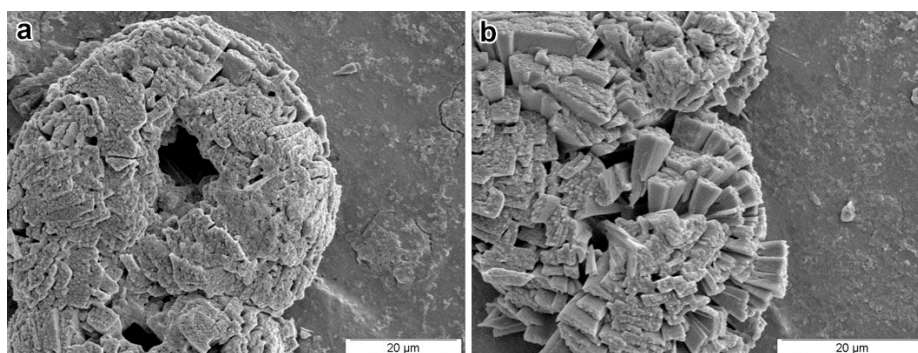


Figure IV-47 : Images de MEB d'organisation sphérocristallines préparées à partir de la fraction **ASA(3)10-15** à une concentration de 5% (p/v) par ajout d'éthanol chaud.

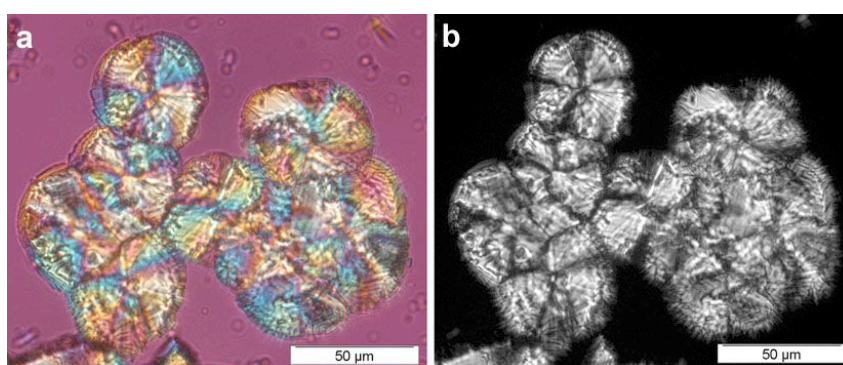


Figure IV-48 : Images de microscopie optique en lumière polarisée de sphérocristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)10-15** à une concentration de 5% (p/v) par ajout d'éthanol chaud. Les micrographies ont été enregistrées avec (a) et sans (b) compensateur λ .

La comparaison qualitative les images recueillies à partir des différents échantillons montre que, dans la gamme de concentration considérée, les rosettes deviennent la forme de

cristallisation dominante au fur et à mesure que la concentration initiale en amylose augmente. Par contre, comme le montre le Tableau IV-4, tant que l'acétone diffuse dans la solution sous forme vapeur, $\bar{L}$ est pratiquement indépendant de la concentration en amylose. La longueur des cristaux et donc le rayon des rosettes augmentent de manière significative lorsque le précipitant (acétone ou éthanol) est ajouté d'un coup sous forme liquide.

Tableau IV-4 : Variation de la longueur moyenne de cristaux organisés en rosettes en fonction de la concentration initiale en amylose, du précipitant et de son mode de mélange. Les mesures ont été faites sur des images de MEB.

Fraction	Concentration % (p/v)	Complexant	$\bar{L}$ (μm) [écart-type (μm)]
ASA(3)14-21	0,05	acétone (vapeur)	7,0 [2,1]
ASA(3)14-21	0,1	acétone (vapeur)	6,0 [1,0]
ASA(3)14-21	0,5	acétone (vapeur)	6,9 [1,3]
ASA(3)16-22	1,0	acétone (vapeur)	7,0 [1,3]
ASA(3)16-22	2,0	acétone (vapeur)	7,5 [1,6]
ASA(3)16-22	4,0	acétone (vapeur)	7,2 [1,3]
ASA(3)14-19	5,0	acétone (liquide)	12,8 [1,8]
ASA(3)10-15	5,0	éthanol (liquide)	11,2 [2,3]

Bien que la quantité très limitée de nos fractions n'ait pas permis de faire d'essais additionnels, il serait intéressant de continuer à étudier l'influence de la concentration en amylose (10% ou plus) sur les organisations formées en présence d'acétone. Il est aussi possible que l'éthanol soit un précipitant plus "efficace" que l'acétone et qu'il favorise une cristallisation plus rapide et une organisation plus compacte de cristaux. On constate néanmoins que les solutions d'amylose synthétique de concentration croissante, qu'elles soient cristallisées avec l'acétone ou l'éthanol, conduisent au développement d'objets de forme plus ou moins sphérique dont les briques élémentaires restent identifiables comme des plaquettes monocristallines allongées.

CHAPITRE V

CRISTALLISATION EN SOLUTION EN PRÉSENCE D'UN SUBSTRAT

La majorité des cristaux d'amylose présentés dans le Chapitre IV et préparés en milieu homogène sont des objets oblongs. Les observations par microscopie optique en lumière polarisée ainsi que les résultats préliminaires de diffraction électronique ont confirmé, comme l'avaient proposé **Imberty *et al.* (1988)**, que l'axe des doubles hélices est parallèle au grand axe des cristaux. Cette géométrie particulière (dont l'analyse sera développée dans le Chapitre VI) ne permet pas d'enregistrer de clichés de diffraction le long de l'axe *c* comme c'est le cas à partir des cristaux lamellaires de polymères. Il est donc difficile d'accéder à des données sur l'arrangement des doubles hélices dans un plan perpendiculaire à *c*. Selon le protocole décrit dans le Chapitre II (§ 3.1), nous avons donc introduit dans le réacteur un agent nucléant (des whiskers de cellulose) ou des surfaces (lames de verre ou de mica) susceptibles de modifier les conditions de nucléation et de croissance des cristaux d'amylose A, et donc leur morphologie.

1. SHISH-KEBABS

En utilisant les whiskers de cellulose comme agent nucléant dans des solutions d'amylose, les cristaux se sont développés à partir ou autour des nanocristaux. Cet ensemencement s'est notamment révélé indispensable pour déclencher la cristallisation de chaînes de bas DP, typiquement celles des fractions **ASA(3)9-15** et **ASA(3)9-18**. Dans les deux cas, les cristaux formés sont oblongs. En général, on constate que la base pointue des cristaux est bien "attachée" aux whiskers mais il est très difficile, compte tenu de la grande taille des cristaux et de leur fort contraste de diffraction, de savoir s'ils se sont développé autour de la cellulose. Il semble donc bien que la nucléation se fasse sur la cellulose mais la croissance pourrait être indépendante du substrat (Figures V-1a et 1b). La longueur moyenne des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)9-15** est de $3.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ (Figure V-1a), inférieure à celle obtenue par nucléation homogène ($4,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$). Les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)9-18** et "attachés" à la cellulose ont une longueur moyenne de $1,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$ (Figure V-1b). On trouve aussi des cristaux isolés de plus de $5 \mu\text{m}$ (Figure V-1c).

La Figure V-2a présente les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(F1)** en présence de whiskers de tunicine. Les cristaux possèdent une morphologie en ogive. Les deux extrémités sont pointues. La longueur moyenne est de $1,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$, inférieure à celle des cristaux préparés par nucléation homogène ($3,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$). Les cristaux colorés négativement apparaissent comme des empilements de lamelles perpendiculaires au grand axe du cristal et d'une épaisseur moyenne d'environ 7 nm (Figures V-2b à 2d). Ce point précis sera approfondi dans le Chapitre VI.

Les Figures V-3a et V-3b montrent le résultat de la nucléation hétérogène de la fraction **DLPR** en présence de cellulose de tunicier. La présence d'agrégats de cristaux d'amylose sur les whiskers rend difficile la caractérisation mais on peut observer que la cristallisation se développe autour de la cellulose. Quelques cristaux isolés sont aussi observés (Figure V-3c). Les cristaux conservent une forme oblongue avec les deux extrémités arrondies. La longueur des cristaux individuels varie de 250 à 500 nm.

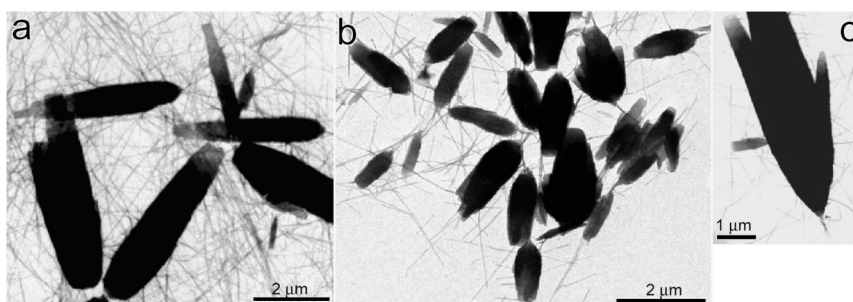


Figure V-1 : Images de MET de cristaux préparés à partir des fractions **ASA(3)9-15** (a) et **ASA(3)9-18** (b,c) en présence de whiskers de cellulose de tunicier.

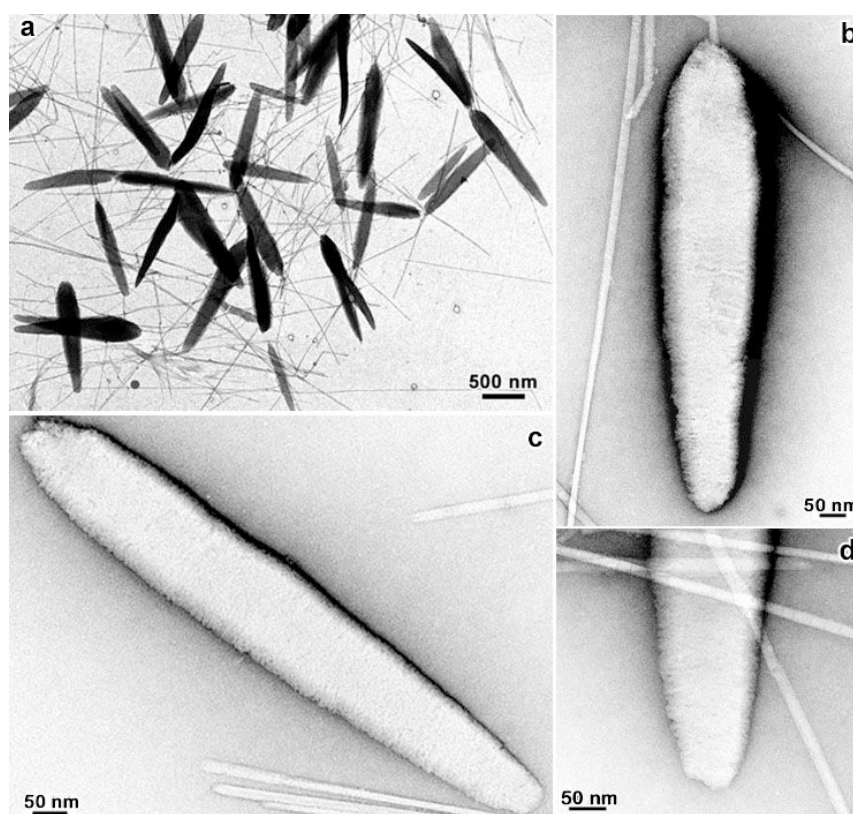


Figure V-2 : Images de MET des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(F1)** en présence de whiskers de cellulose de tunicier : a) cristaux non-colorés ; b-d) cristaux colorés négativement.

Les cristaux préparés à partir de la fraction **DLP(2)8-21** en présence de whiskers de tunicine sont totalement différents. On observe des agrégats ovoïdes et des cristaux plus petits organisés en "shish-kebabs" (Figure V-4a). La cristallisation se développe autour de la cellulose et les cristaux présentent une organisation lamellaire perpendiculaire au substrat (Figures V-4b à 4e). Les lamelles ont une épaisseur comprise entre 7 et 9 nm. La largeur de chaque objet varie de 200 et 500 nm. On observe aussi des objets isolés qui présentent la même organisation lamellaire mais qui se sont peut-être décroché de la cellulose (Figure V-4f).

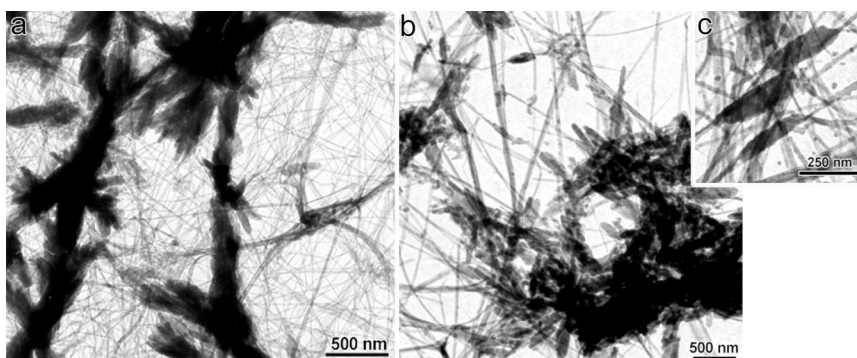


Figure V-3 : Images de MET de cristaux préparés par nucléation de la fraction **DLPR** en présence de whiskers de cellulose de tunicier.

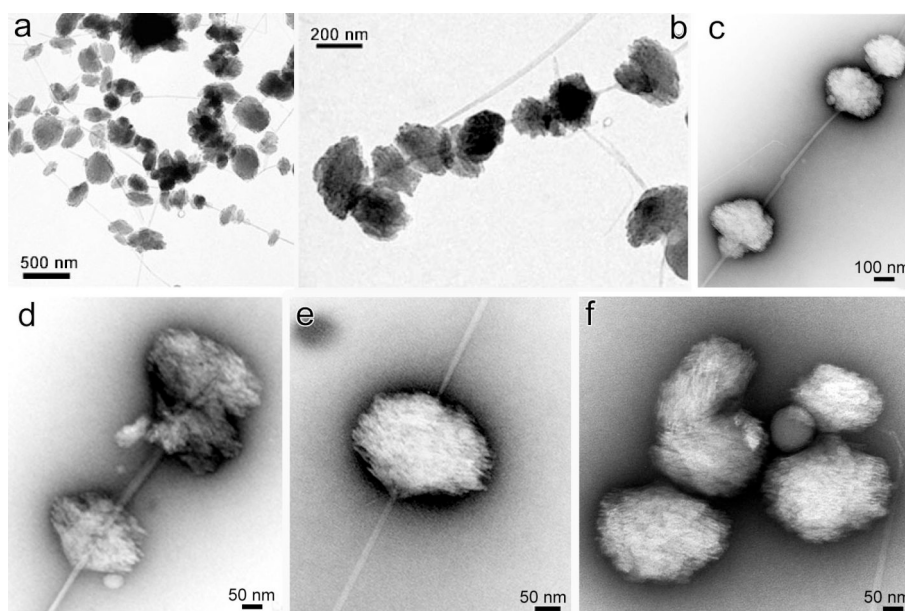


Figure V-4 : Images de MET de shish-kebabs préparés par nucléation de la fraction **DLP(2)8-21** en présence de whiskers de tunicine : a,b) échantillon non coloré ; c,d,e) organisation lamellaire perpendiculaire à la cellulose (coloration négative), f) cristaux indépendants du substrat (c-f : coloration négative).

Les cristaux formés à partir des chaînes issues du fractionnement de maltodextrines (fraction **MDR**) présentent une organisation lamellaire irrégulière, qui entoure la cellulose, similaire à celle observée avec les cristaux préparés à partir de la fraction **DLP(2)8-21** (Figures V-5a et 5b). Les lamelles ont une épaisseur de 6 à 10 nm. Chaque empilement a une largeur d'environ 200 nm (Figures V-5b à 5d). Nous avons essayé de fragmenter ces cristaux dans le but de séparer des lamelles pour les observer à plat sur le film de carbone. Pour cela, nous avons centrifugé une suspension et cisailé manuellement le culot hydraté dans un cône Eppendorf à l'aide d'un petit pilon en plastique. La Figure V-5e montre quelques lamelles empilées vues à plat, dont la forme évoque celle des lamelles cristallines élémentaires observées après 36 jours d'hydrolyse de grains d'amidon de maïs cireux (Chap. I, § 1.1.2.2 - **Putaux *et al.*, 2003**) (Figure V-5f). Les lamelles polygonales ont une longueur de 100-120 nm et une largeur de 50-90 nm, avec des angles aigus de 60-70°.

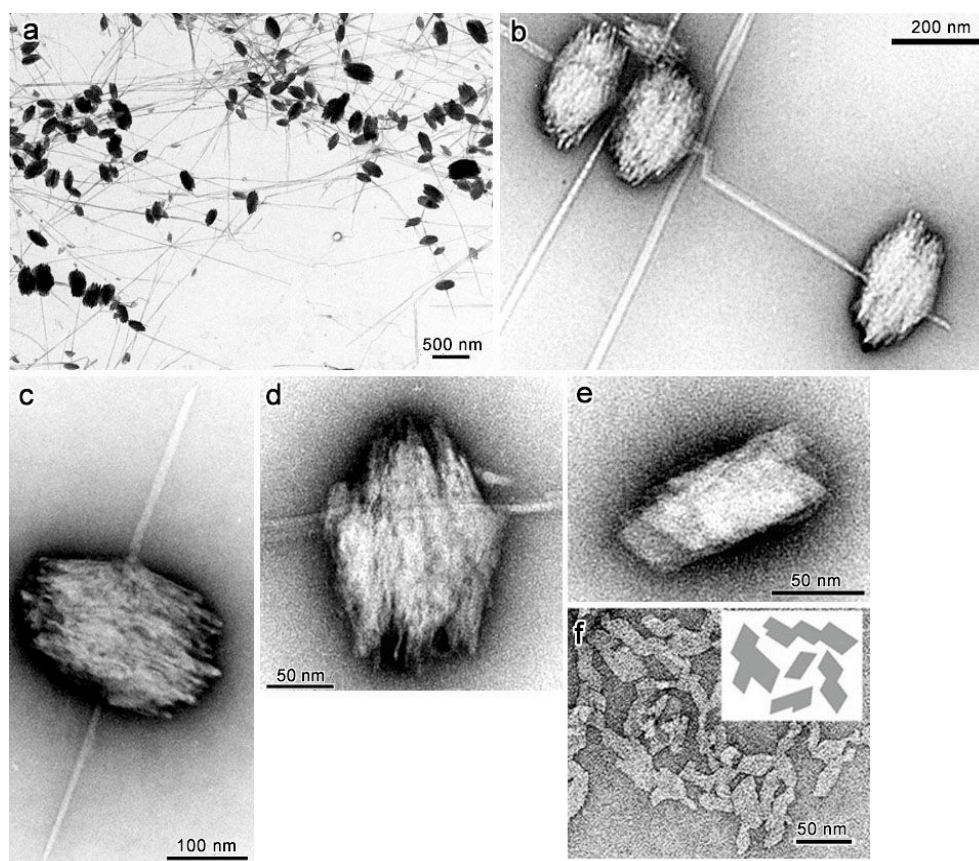


Figure V-5 : Images de MET de cristaux préparés à partir de la fraction **MDR** en présence de cellulose de tunicier : a) morphologie en "shish-kebab" ; b-d) organisation lamellaire ; e) lamelles cristallines vues à plat après fragmentation des cristaux par broyage ; f) nanocristaux obtenus après 36 jours d'hydrolyse acide de grains d'amidon de maïs cireux (de **Putaux *et al.*, 2003**). b-f : coloration négative.

2. SURFACES DE VERRE ET DE MICA

La cristallisation d'amylose synthétique induite par des surfaces de verre ou de mica conduit à la formation de d'organisations cristallines différentes. Une certaine proportion d'amylose nucléée néanmoins en conditions homogènes dans la solution dans laquelle baignent les substrats et conduit à la formation de cristaux individuels en ogive que l'on retrouve simplement posés sur les surfaces lors de l'observation par microscopie.

2.1. Surfaces de verre

Les images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** par nucléation hétérogène montrent des "tapis" très denses de plaquettes oblongues dont la croissance a progressé à peu près perpendiculairement au substrat (Figures V-6a et 6b). On observe aussi des éventails très denses et quelques "rosettes" (Figures V-6c et 6d). Tous les cristaux possèdent une extrémité apicale plate et une section transverse parallélogramme.

La section transverse parallélogramme des cristaux formant les tapis possède un angle obtus de $119\pm 3^\circ$, du même ordre de grandeur que l'angle γ de la maille monoclinique de l'allomorphe A ($\gamma=123,5^\circ$) (Figure V-6). L'épaisseur moyenne des cristaux est de 470 ± 120 nm. La section des cristaux associés en éventail possède globalement les mêmes angles obtus ($\gamma=118\pm 4^\circ$). Leur épaisseur varie de 0,7 à 1,4 μm .

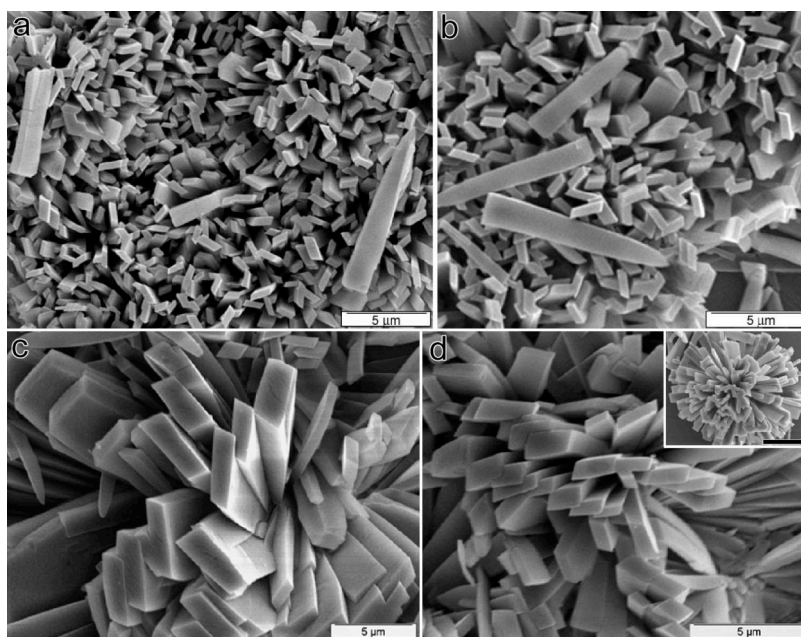


Figure V-6 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** par nucléation hétérogène sur lame de verre : a,b) "tapis" de cristaux oblongs à section transverse parallélogramme ; c,d) éventails très denses ; en encart: rosette de cristaux (barre : 10 μm).

Les cristaux préparés par nucléation hétérogène sur lame de verre à partir de la fraction **ASA(3)16-22** présentent globalement deux morphologies : la première, en "tapis" très denses, formés par des plaquettes oblongues, à section transverse parallélogramme (Figures V-7a et 7b), et la seconde, constituée d'éventails de cristaux fins et plats (Figure V-7c) ou longs et en allumettes (Figure V-7d).

L'extrémité apicale des cristaux composant le tapis est plate. La section transverse est un parallélogramme avec des angles obtus de $118 \pm 4,2^\circ$ (Figure V-7b). Les cristaux constituant le premier type d'éventail sont très polydisperses en taille, la gamme est comprise entre 3,4 et 7,5 μm . Les cristaux faisant partie du deuxième type peuvent dépasser les 10 μm de longueur.

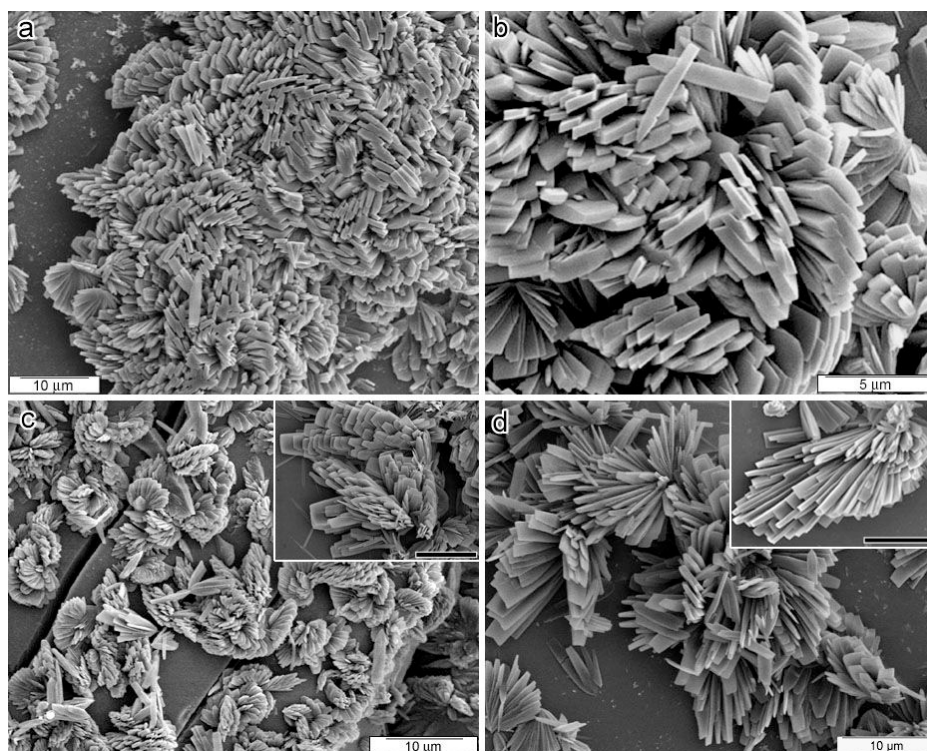


Figure V-7 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)16-22** par nucléation hétérogène sur lame de verre : a,b) "tapis" ; c,d) éventails (barres d'échelle dans les encarts : 10 μm).

2.2. Surfaces de mica

La Figure V-8 présente les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-19** par cristallisation hétérogène sur une lame de mica (muscovite) clivée à l'air. Ceux-ci sont généralement fusiformes (Figures V-8a). La longueur moyenne est de 3,4 μm (écart-type 0,3 μm). De manière générale, les cristaux sont parallèles à deux axes principaux (axes 1 et 2

sur la Figure V-8b). Quelques cristaux sont plus rarement orientés selon une troisième direction (axe 3 sur Figure V-8b). Dans les deux principales familles, les cristaux pointent en majorité dans la même direction. En tenant compte de cette orientation privilégiées, les axes 1 et 2 et bleu se déduisent l'un de l'autre par une rotation d'environ 120° . Par ailleurs, l'examen de plusieurs images a révélé que localement, les sites de nucléation des cristaux pouvaient être alignés selon une quatrième direction (axe 4 sur la Figure V-8c). Il faut noter que les axes 3 et 4 semblent perpendiculaires.

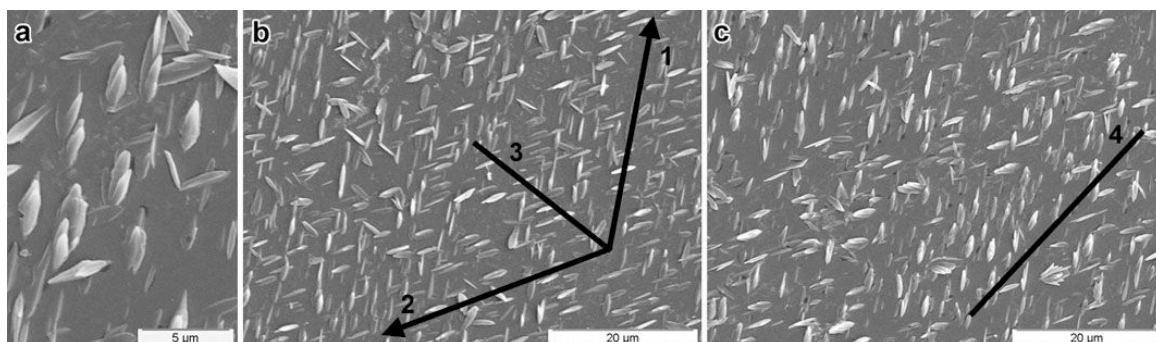


Figure V-8 : Images de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-19** par nucléation hétérogène sur une lame de mica. Les cristaux pointent dans trois directions indiquées par les axes en noir 1 à 3 (b). Par ailleurs, les points de nucléation sont parfois alignés selon un 4^{ème} axe (c).

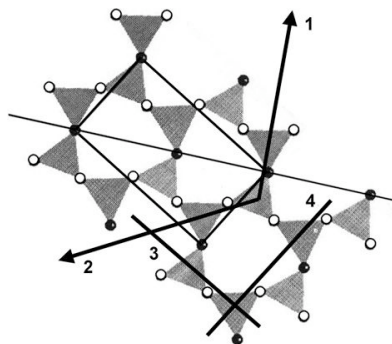


Figure V-9 : Orientation possible du modèle structural de la surface (001) de muscovite (**Dorel, 2000**) par rapport aux images des Figures V-8b et 8c. Les tétraèdres d'oxygène sont en gris tandis que les atomes d'oxygène sont représentés soit en blanc soit en noir selon le plan auquel ils appartiennent. Les 4 axes d'orientation des cristaux sur le mica sont reportés.

Nous avons tenté de relier ces directions privilégiées aux données de la littérature sur la structure d'une surface (001) de muscovite. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de **Dorel (2000)** et avons positionné les quatre axes considérés sur le réseau hexagonal de tétraèdres d'atomes d'oxygène (Figure V-9). Une solution est proposée sur schéma de la Figure V-9. Les

axes 1 et 2 se superposent en projection aux vecteurs reliant deux familles de tétraèdres. L'axe 3 est aligné selon la troisième famille de tétraèdres. L'axe 4 relie deux tétraèdres qui ne sont pas proches voisins mais il faut noter que les axes 3 et 4 sont parallèles aux directions principales de la maille orthorhombique (pseudo-hexagonale) définie à partir des atomes d'oxygène appartenant à un même plan (001).

Notre hypothèse de la structure de la surface de muscovite est certainement simpliste puisque nous n'avons pas tenu compte des réorganisations structurales intervenant à la surface après clivage (**Dorel, 2000**). D'autre part, après clivage, notre lame est maintenue dans la solution aqueuse en présence d'acétone, à une température d'environ 60°C. Ces conditions peuvent aussi entraîner des modifications de la surface. Cependant, notre description permet tout de même de proposer une explication préliminaire des orientations privilégiées suivies par les cristaux d'amylose A sur le mica. D'autre part, **Gunning *et al.* (2003)** ont publié des images d'AFM en mode non-contact d'amylose synthétique déposée sur du mica clivé. Bien que la possibilité d'une orientation préférentielle des molécules sur la surface ne soit pas discutée en détail, on voit que l'amylose a un aspect segmenté, avec des angles proches de 120° entre segments rectilignes.

Pour progresser, il serait nécessaire de connaître plus en détail la nature des défauts pouvant servir de site de nucléation : marches, îlots, impuretés, etc. Des études anciennes (**Suito *et al.*, 1966**) ou plus récentes (**Ostendorf *et al.*, 2008**) se sont attachées à caractériser ces défauts. Nous pouvons néanmoins faire deux remarques. La première est que les sites de nucléation sont en forte densité à la surface et que ceci pourrait traduire une certaine rugosité. D'autre part, si les cristaux d'une famille pointent en majorité dans la même direction, c'est que la géométrie du défaut de surface induisant la nucléation est chirale et impose une polarité au germe formé par les chaînes d'amylose (elles-mêmes polaires chimiquement). Ce phénomène est en soi suffisamment intéressant pour envisager une étude plus approfondie.

3. CONCLUSION

Si l'objectif de modifier la morphologie des cristaux d'amylose A en utilisant un agent nucléant ou des surfaces inductives n'a pas été atteint, plusieurs effets intéressants sont à noter. En premier lieu, les microcristaux de cellulose aident les fractions d'amylose les plus courtes, et donc les plus solubles, à cristalliser. De manière générale, les cristaux préparés à partir des fractions d'amylose synthétique conservent les caractéristiques morphologiques de ceux préparés en conditions homogènes. Cependant, la cristallisation est plus rapide et les

cristaux sont en moyenne plus courts (d'un facteur 3 pour la fraction ASA(F1), par exemple), en raison de la forte augmentation du nombre de sites de nucléation et donc de cristaux formés.

L'organisation en shish-kebab initialement envisagée n'a été atteinte qu'avec les fractions issues d'hydrolyse d'amidon natif, donc polydisperses et possédant des points de branchement résiduels. Dans ce cas, les assemblages cristallins se sont développés sous formes de lamelles perpendiculaires aux whiskers de cellulose et l'irrégularité des structures est probablement reliée à la présence des défauts et à la dispersité des fractions. Bien que nous n'ayons pas réussi à caractériser précisément l'orientation des chaînes dans ces objets par diffraction électronique, nous pouvons faire l'hypothèse que les doubles hélices d'amylose sont perpendiculaires au plan des lamelles et donc parallèles à l'axe de fibre de la cellulose, comme c'est le cas pour les cristaux d'amylose V ayant nucléé sur des microfibrilles de cellulose (**Helbert et Chanzy, 1994**). Étonnamment, les empilements limités à quelques lamelles ne semblent pas se développer le long de la cellulose et ne prennent pas la forme d'ogives. D'autre part, cette structure feuilletée irrégulière évoque tout à fait celle des fragments de grains d'amidon natifs obtenus après quelques jours d'hydrolyse acide (**Oostergetel et al., 1989 ; Putaux et al., 2003**).

Enfin, nous n'avons pas réussi à favoriser la croissance de grandes lamelles cristallines avec l'axe des doubles hélices normal au plan des lamelles en utilisant des surfaces inductives. Dans le cas du mica, les cristaux ont gardé leur forme caractéristique d'ogive. Dans le cas du verre, et avec l'aide de rayures faites au préalable sur les lames, d'impressionnantes efflorescences de cristaux ont été observées. Les cristaux y sont très denses et souvent orientés perpendiculairement au substrat. Si la géométrie est donc celle souhaitée initialement (axe *c* parallèle à la direction d'observation), ces échantillons paraissent difficilement utilisables pour des expériences de diffraction. On pourrait imaginer décoller ces assemblages des lames de verres, les inclure dans une résine et utiliser la microtomie pour obtenir des coupes minces observables par MET. Si nos tests ont été effectués à partir de surfaces de verre et de mica, il est aussi certainement nécessaire de rechercher d'autres substrats comme, par exemple les films de poly(tétrafluoroéthylène) étirés à chaud, connus pour leur exceptionnelle capacité à orienter la cristallisation de nombreux types de molécules (**Wittmann et Smith, 1991**).

CHAPITRE VI

FACIES ET STRUCTURE DES CRISTAUX D'AMYLOSE A

1. ANALYSE CRISTALLOGRAPHIQUE ET FACIÈS DES CRISTAUX

1.1. Position du problème

L'analyse cristallographique des monocristaux d'amylose de type A a été réalisée par **Imberty *et al.* (1987, 1988)**. Les auteurs ont décrit la forme générale des cristaux à partir des images de MET. En analysant les clichés de diffraction électronique enregistrés à différentes inclinaisons des cristaux, ils ont corrigé la structure proposée auparavant par **Wu et Sarko (1978b)** et déterminé une nouvelle maille monoclinique. Les auteurs ont aussi déduit l'orientation longitudinale de l'axe cristallographique *c* et, par conséquent, des doubles hélices. Plus récemment, **Popov *et al.* (2006)** ont confirmé la maille cristalline monoclinique à partir de données de microdiffraction des rayons X enregistrées sur des cristaux uniques à l'ESRF.

Cependant, à ce jour, la détermination de l'orientation précise de la maille cristalline par rapport au cristal, en particulier l'orientation des axes *a* et *b*, reste incomplète. Comme nous l'avons montré dans le chapitre III, les fractions d'amylose synthétique nous ont permis de préparer des cristaux à la morphologie bien définie dont les paramètres géométriques ont été déterminés à partir d'images de MEB. Nous avons donc repris et complété l'étude cristallographique des monocristaux en enregistrant des clichés de diffraction électronique et en interprétant ces données en relation avec la morphologie cristalline.

Le choix des échantillons a été fait en fonction de la possibilité de trouver des cristaux individuels dont l'épaisseur restait compatible avec cette technique. Pour constituer un jeu de données de diffraction, quatre échantillons ont été examinés, préparés à partir d'amylose synthétique (**ASA(2)12-23**, **ASA(1)14-27**, **ASA(1)17-28** et **ASA(1)19-29**).

1.2. Exploration du réseau réciproque par diffraction électronique

1.2.1. Mode opératoire et indexation des clichés de diffraction

Les échantillons hydratés ont été observés dans un porte-objet refroidi à l'azote liquide. Une première série de clichés de diffraction a été enregistrée sans incliner le porte-objet, en choisissant des cristaux reposant sur leur face la plus large. Les deux types de figures de diffraction qui ont été obtenus de manière équiprobable sont présentés sur la Figure VI-1. Le cliché le plus fréquemment enregistré par Imberty *et al.* (1988) est identique à celui de la Figure VI-1a. Dans leur article, ils ont identifié les deux clichés comme correspondant aux axes de zone **[130]** (Figure VI-1a) et **[140]** (Figure VI-1b) de la maille monoclinique. Ces deux clichés nous ont donc ensuite servi de référence pour sélectionner rapidement les cristaux à incliner.

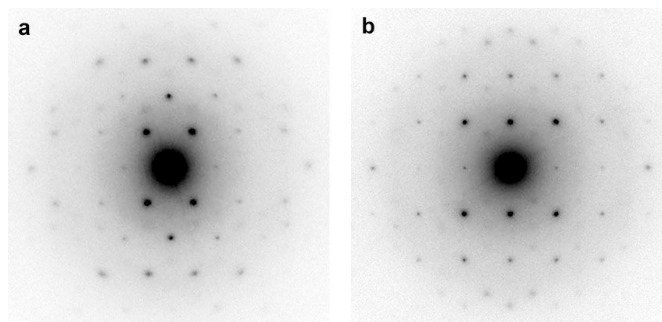


Figure VI-1 : Clichés de diffraction des électrons de monocristaux d'amylose A les plus fréquemment enregistrés à partir de cristaux posés à plat sur le carbone, sans inclinaison du porte-objet. Dans l'espace réel, le grand axe des cristaux est horizontal par rapport à ces clichés. L'indexation proposée par **Imberty *et al.* (1988)** est **[130]** pour (a) et **[140]** pour (b).

Par ailleurs, il ressort clairement des images de MEB que la section parallélogramme des cristaux est toujours orientée dans le même sens par rapport à leur grand axe (Figures IV-17, par exemple). L'angle aigu entre la face la plus large et la face la moins large est de l'ordre de 60° (chap. IV, § 3.3). En constatant que cet angle était très proche de celui formé par les axes *a* et *b* dans la maille monoclinique (environ $56,5^\circ$), nous avons donc émis deux hypothèses : i) la section parallélogramme représente le plan de base (*a,b*) ; ii) la face la plus large des cristaux contient l'axe *a* (le paramètre *a* de la maille monoclinique étant supérieur au paramètre *b* - chap. I, § 1.1.2.3). Cela nous a permis d'orienter les trois axes *a*, *b* et *c* par rapport aux cristaux tel que nous l'avons schématisé sur la Figure VI-2b. Selon nos hypothèses, l'axe *c* pointe donc dans une direction opposée à la direction de croissance des cristaux.

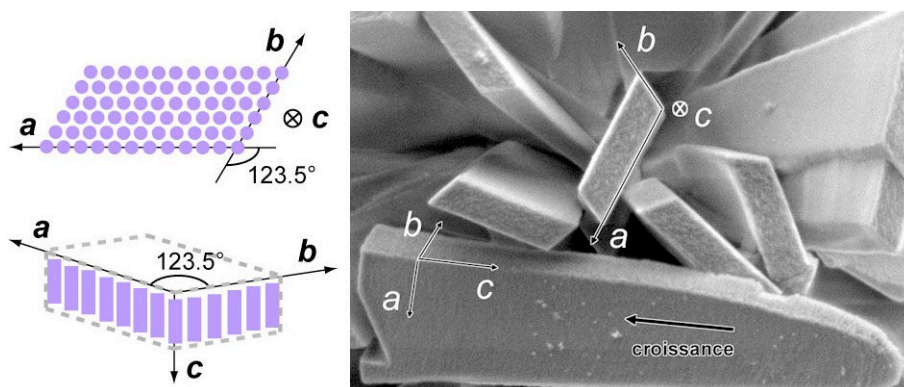


Figure VI-2 : A gauche : description schématique de la maille monoclinique de l'amylose A (**Imberty *et al.*, 1988**). Les disques et bâtonnets représentent les doubles hélices. A droite : superposition des axes principaux de la maille sur une micrographie de MEB de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(2)12-23**.

En utilisant les hypothèses précédentes, nous avons déterminé les angles d'inclinaison des cristaux autour de l'axe c permettant *a priori* d'atteindre un certain nombre d'axes de zone de la maille monoclinique de type $[hk0]$. Le schéma correspondant est présenté sur la Figure VI-3. A partir de ce schéma, on voit que lorsqu'un cristal est parfaitement à plat (angle d'inclinaison de 0°), l'axe perpendiculaire à la surface ne correspond pas à un axe de zone de bas indices et se situe entre les axes $[130]$ et $[140]$. Cela explique donc pourquoi les deux diagrammes de diffraction présentés sur la Figure VI-1 ont été enregistrés de manière équiprobable : au gré de petites inclinaisons du film de carbone (environ $\pm 5^\circ$), le cristal a pu être orienté tel que chacun des axes $[130]$ ou $[140]$ devenait parallèle au faisceau d'électrons.

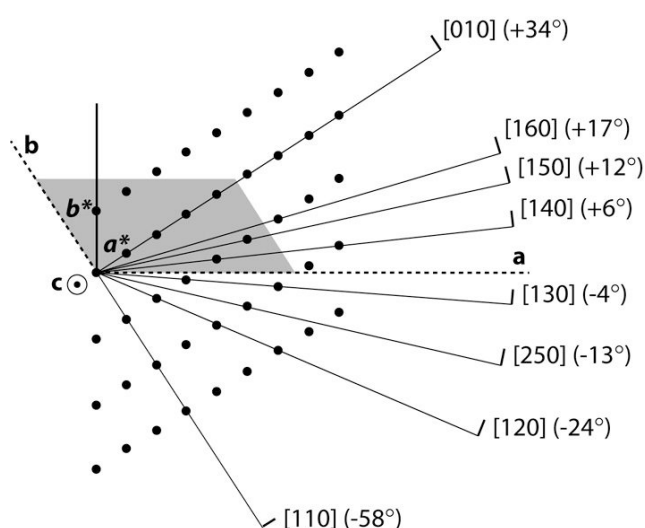


Figure VI-2 : Projection du réseau réciproque (points noirs) de la maille monoclinique de l'amylose A le long des axes c/c^* . Les axes a et b du réseau réel sont indiqués par les droites pointillées. Les plans denses du réseau réciproque sont indiqués par des droites continues. Les indices de Miller correspondent à la normale aux plans du réseau réciproque dessinés. Les angles d'inclinaison nécessaires pour amener l'axe de zone parallèle au faisceau d'électrons sont indiqués entre parenthèses. La section d'un cristal dans l'espace réel (en gris) est superposée au réseau réciproque.

Pour enregistrer des clichés de diffraction d'échantillons inclinés, nous avons utilisé le porte-objet refroidi "simple tilt" car notre porte-objet "tilt-rotation" ne permettait pas de travailler à basse température. Nous avons donc sélectionné des cristaux déjà orientés parallèlement (ou, le cas échéant, perpendiculairement) à l'axe d'inclinaison du porte-objet. La grande sensibilité des *imaging plates* permettant de diminuer la dose d'électrons incidents, il a parfois été possible d'enregistrer jusqu'à 5 clichés de diffraction à partir d'un même cristal, dans une gamme d'angle d'environ $\pm 35^\circ$. Cependant, l'irradiation entraînant une diminution

sensible de cristallinité, la résolution des diagrammes diminuait généralement à partir du troisième cliché. Ces expériences nous ont permis de reconnaître les principales figures de diffraction et d'établir leur ordre d'apparition en fonction du sens et de l'angle d'inclinaison. Deux exemples de séries collectées en inclinant les cristaux autour de leur grand axe sont présentés sur la Figure VI-3. Les diagrammes enregistrés sans inclinaison du porte-objet sont différents car ils dépendent de l'orientation initiale du cristal qui peut varier s'il chevauche un autre cristal ou en fonction de l'inclinaison du film de carbone.

Les angles indiqués correspondant à l'inclinaison du porte-objet, ce sont les variations angulaires relatives qui ont été utiles pour replacer les clichés sur le schéma de la Figure VI-3 et identifier les axes de zone. Les deux axes principaux dans les clichés d'une même série sont perpendiculaires. Les angles α et β sont donc égaux à 90° , ce qui permet d'écarter une structure triclinique. Par ailleurs, Imberty *et al.* avaient montré que les clichés enregistrés à des angles de θ et $-\theta$ autour de c et par rapport à l'axe de zone $[010]$ étaient différents. Nous n'avons pu vérifier ceci en raison d'une gamme d'inclinaison du porte-objet trop limitée. Ces deux résultats ont permis de déduire que la maille était monoclinique et non orthorhombique.

D'autre part, on voit clairement que l'ordre d'apparition des clichés est inversé selon que le cristal est orienté parallèlement ou antiparallèlement à l'axe du porte-objet. Ayant déjà reconnu les figures de diffraction des axes $[130]$ et $[140]$ et en utilisant le schéma de la Figure VI-2, nous avons pu orienter sans ambiguïté l'axe c de la maille monoclinique.

La Figure VI-4a montre une série d'images de MET d'un monocristal à différentes inclinaisons autour de son grand axe. Lorsque l'inclinaison dépasse les 20° , on voit clairement que les cristaux sont courbes. Cette courbure avait déjà été mise en évidence à partir des images de MEB (Figures IV-12a et IV-17d). Puisque les cristaux ont été préalablement hydratés-congelés lors de la préparation pour la MET, la courbure semble donc être une caractéristique morphologique plutôt qu'une déformation due à un séchage (tel que nous avons pu l'envisager dans la préparation des échantillons pour la MEB). La variation du contraste des bords du cristal en fonction de l'inclinaison peut aussi être interprétée à partir de la forme parallélogramme de la section du cristal et l'orientation de son axe c . En dessinant la projection du réseau réciproque associé au cristal pour chaque inclinaison, nous avons identifié l'axe de zone correspondant à chaque image. La combinaison des informations apportées par les Figures VI-3 et VI-4 nous a alors permis d'attribuer sans ambiguïté un axe de zone à une figure de diffraction.

Plusieurs clichés de diffraction enregistrés pour différents axes de zone appartenant à la famille $[hk0]$, ainsi que l'indexation des réflexions sont rassemblées sur la Figure VI-5.

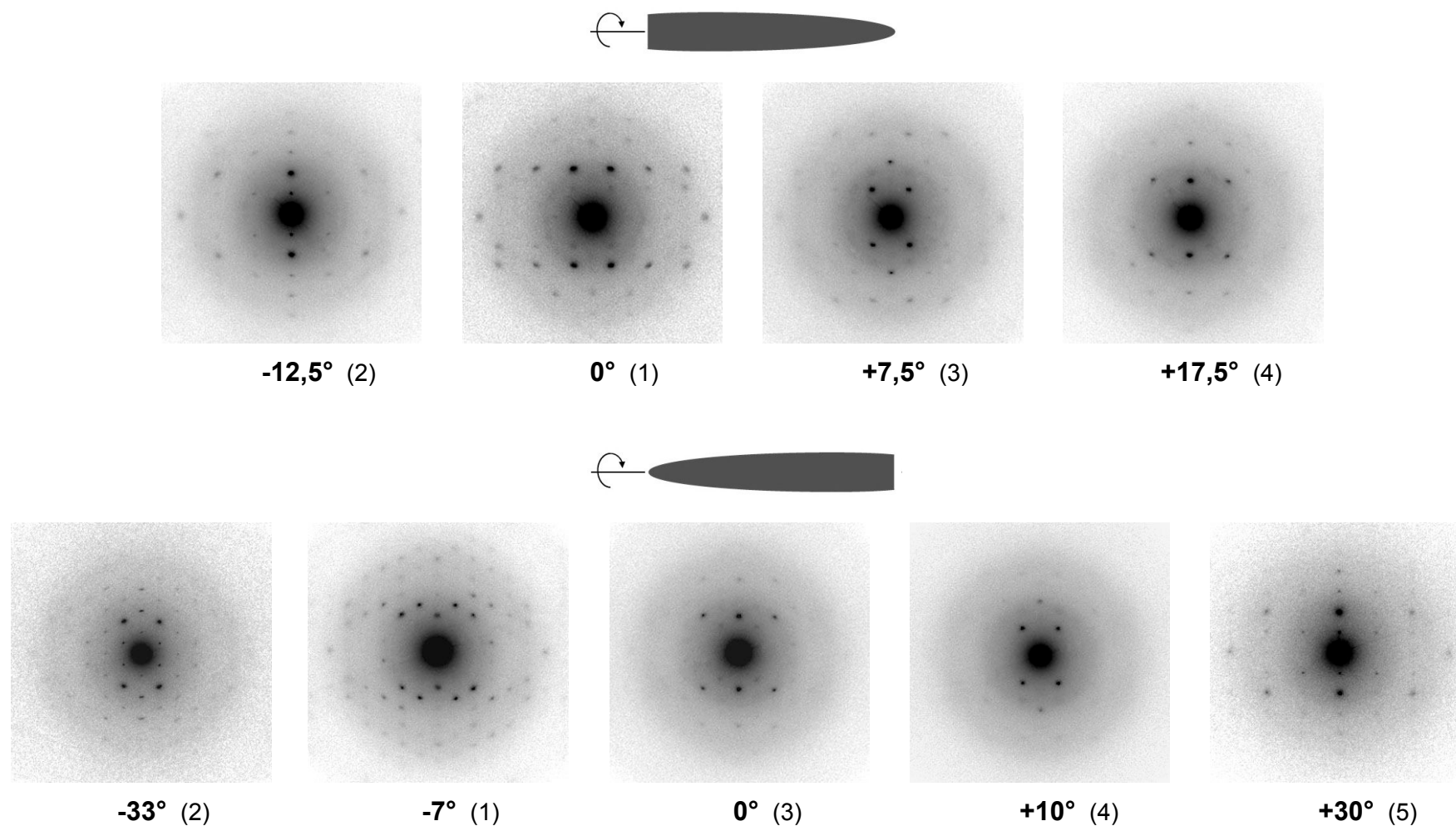


Figure VI-3 : Séries de clichés de diffraction électronique enregistrées à partir de deux cristaux inclinés autour de leur grand axe mais pointant dans deux directions opposées. Les angles indiqués correspondent à l'inclinaison du porte-objet. L'ordre d'enregistrement des clichés de la série est indiqué entre parenthèses. La résolution diminue à mesure que l'irradiation augmente.

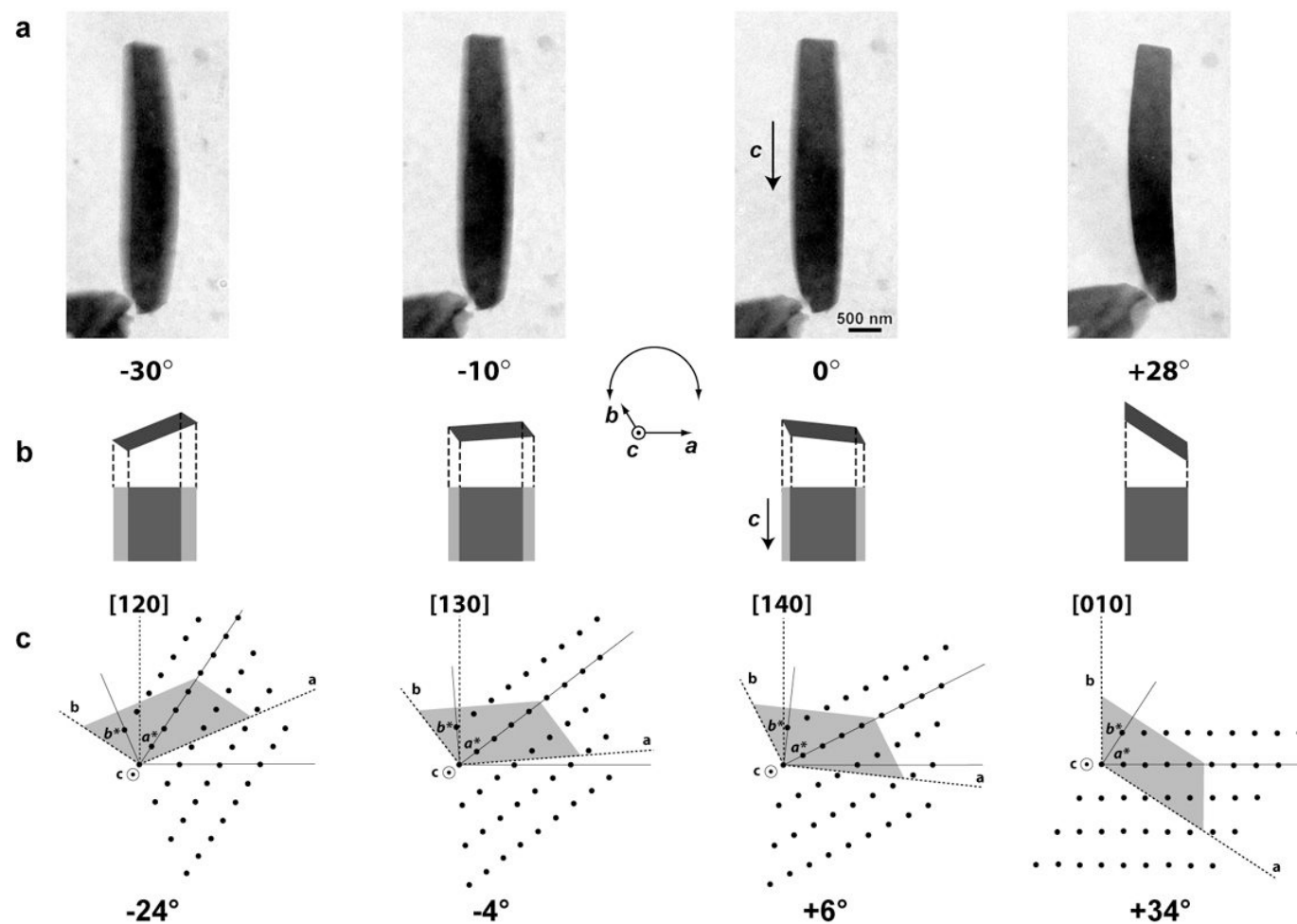
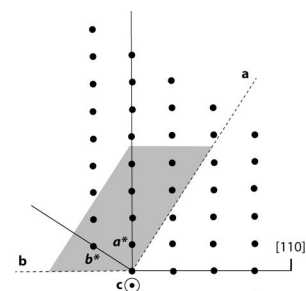
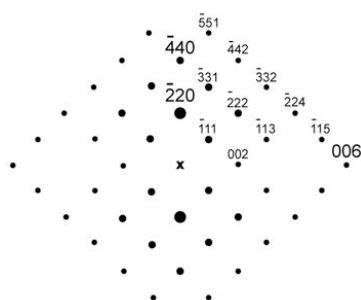
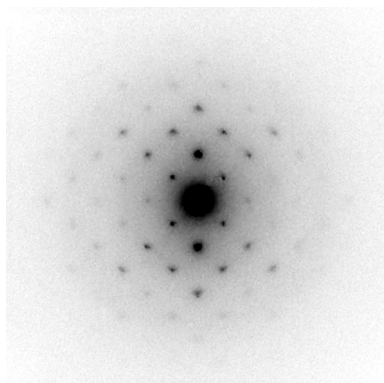
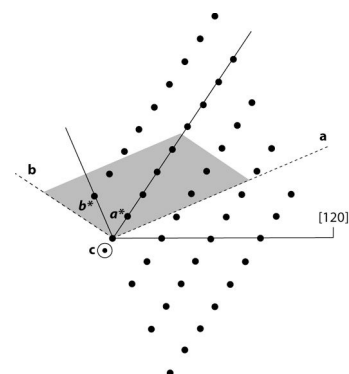
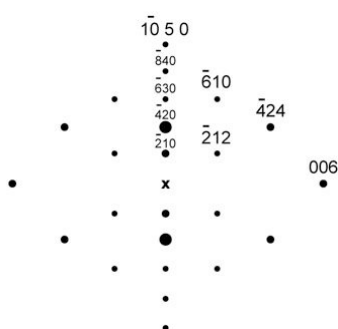
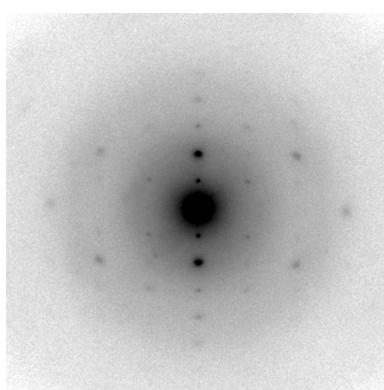


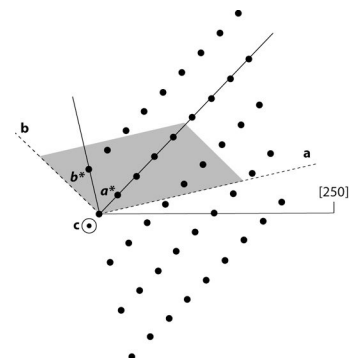
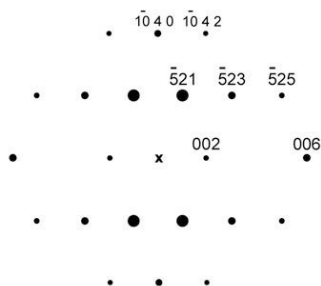
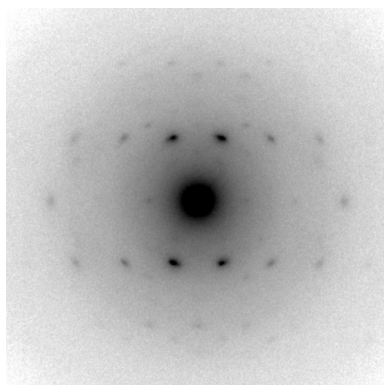
Figure VI-4 : a) Images de MET d'un cristal d'amylose A à différentes inclinaisons autour de l'axe c . Les angles indiquent l'inclinaison du porte-objet. b) Variation du contraste dans l'image en fonction de l'angle d'inclinaison du porte-objet. Le cristal est projeté selon la direction du faisceau d'électrons. Seuls 2 niveaux de gris ont été utilisés pour schématiser les contrastes dans les images de MET. c) Rotation de la section du cristal (en gris) et du réseau réciproque associé (point noirs). Les angles indiquent la rotation par rapport à un plan horizontal contenant l'axe a .



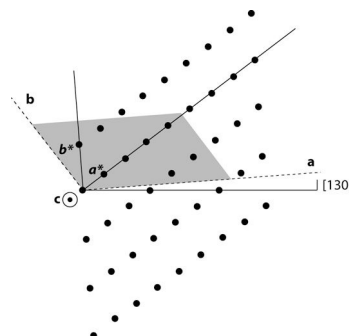
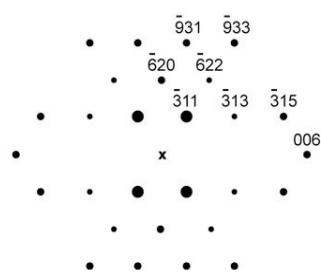
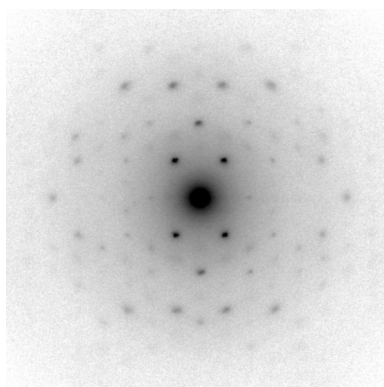
[110] -58°



[120] -24°



[250] -13°



[130] -4°

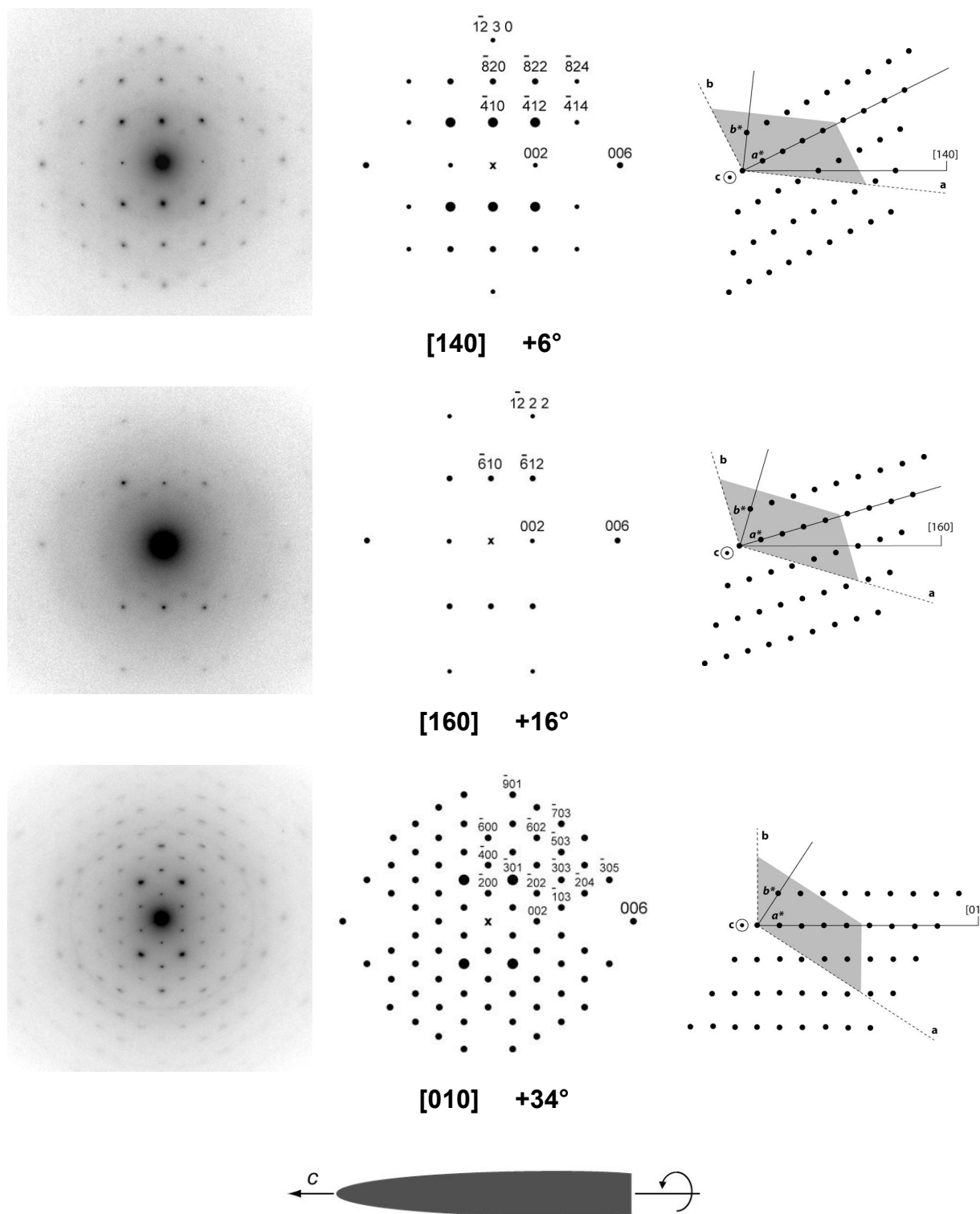


Figure VI-5 : Récapitulatif des clichés de diffraction (colonne de gauche) correspondant à la série d'axes de zone d'indices $[hk0]$ décrite sur le diagramme de la Figure VI-2 et enregistrés en inclinant les cristaux autour de leur grand axe, orienté horizontalement par rapport à la diffraction. L'angle d'inclinaison est défini par rapport au plan horizontal contenant l'axe a . La colonne du milieu rassemble les clichés indexés et la colonne de droite montre l'orientation du réseau réciproque en rotation autour de l'axe c . La section du cristal dans l'espace réel est superposée en gris.

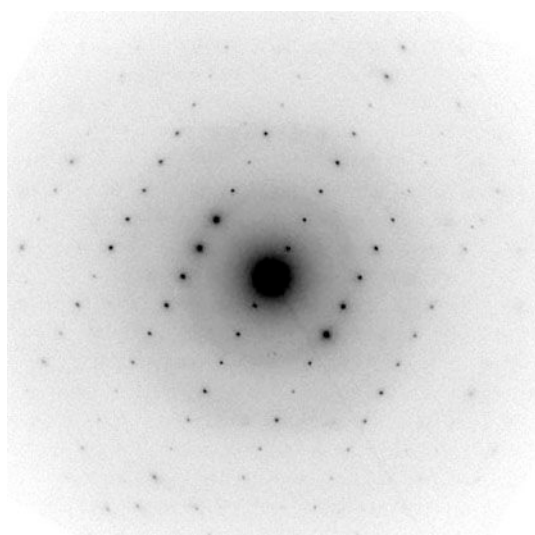
Une autre série de clichés de diffraction permettant de visualiser des axes de zones ne figurant pas dans la série $[hk0]$ précédente a été obtenue. Ces clichés ont été enregistrés à partir de cristaux de l'échantillon ASA(2)12-23. Compte tenu de la difficulté à déterminer les indices de ses axes en raisonnant dans l'espace réciproque de la maille monoclinique, l'indexation de plusieurs clichés a été grandement facilitée par l'utilisation du programme de modélisation moléculaire Cerius² (<http://accelrys.com/products/cerius2/>). Nous avons entré dans le logiciel le modèle de la maille monoclinique de l'amylose A défini par Imberty *et al.* (1988). Il a alors été possible de simuler des diagrammes de diffraction électronique en indiquant les indices hkl de différents axes de zone. Nous avons donc constitué une "banque" de clichés simulés en utilisant principalement les indices les plus bas. En comparant ces diagrammes avec les clichés expérimentaux, nous avons pu identifier quelques figures de diffraction supplémentaires qui sont rassemblées dans la Figure VI-6.

Il s'agit d'axes de zones appartenant à la série $[1k1]$, correspondant à une rotation des cristaux autour de l'axe $[\bar{1}01]$. Puisque cette série a été enregistrée à partir d'une unique expérience et bien que les cristaux aient une géométrie similaire à celles des autres échantillons, nous pensons que ces axes ont pu être atteints en raison d'une déformation de la grille de MET ayant conduit à une inclinaison initiale des cristaux sans pour autant incliner le porte-objet. Une seconde expérience réalisée à partir d'une nouvelle grille du même échantillon a en effet permis de retrouver des clichés correspondant à la série $[hk0]$ de la Figure VI-5.

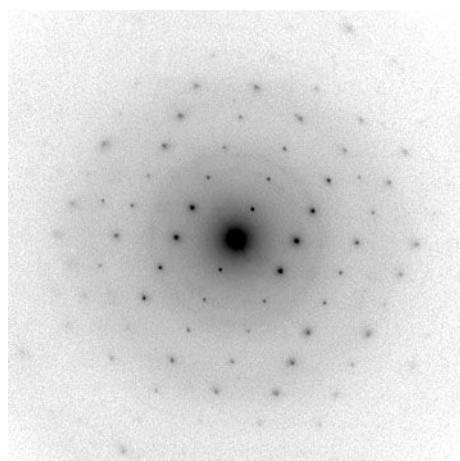
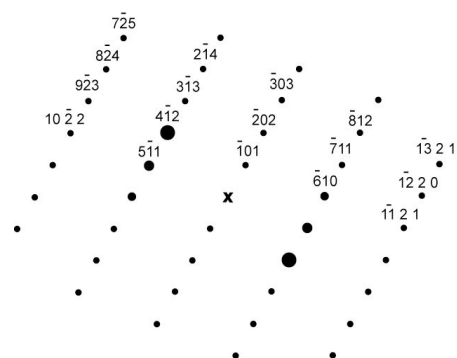
Par ailleurs, nous avons aussi indexé deux autres clichés correspondant à des axes de zone atteints "par hasard" au gré des inclinaisons du porte-objet et de l'orientation initiale de certains cristaux. Ces deux diagrammes sont présentés sur la Figure VI-7. Ils correspondent aux axes de zone $[021]$ et $[143]$.

1.2.2. Calibration et détermination des paramètres de la maille cristalline

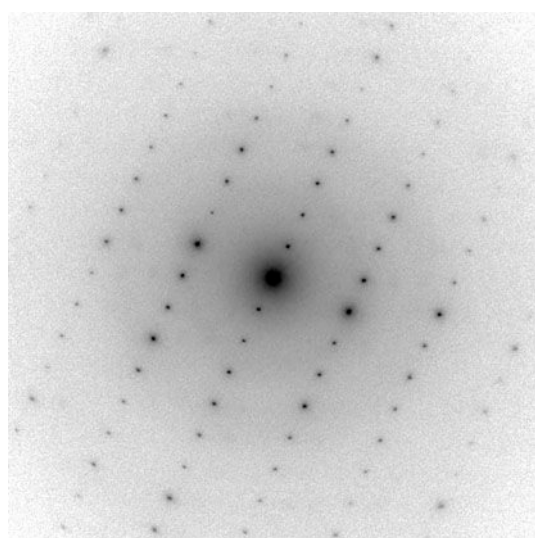
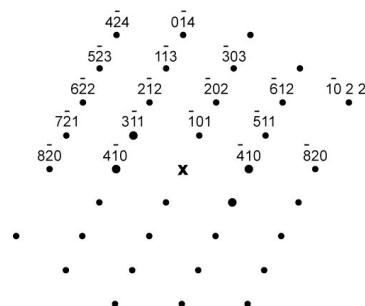
Une série de clichés de diffraction a été enregistrée à partir de cristaux déposés sur un film de carbone recouvert d'une fine couche d'or évaporée sous vide. Les distances réticulaires associées aux réflexions des principaux diagrammes de diffraction ont été calibrées grâce aux anneaux générés par la couche d'or (Figure VI-8). La distance réticulaire d_{hkl} des plans cristallins associés à une réflexion d'indices hkl est donnée par la formule :



[161]



[141]



[131]

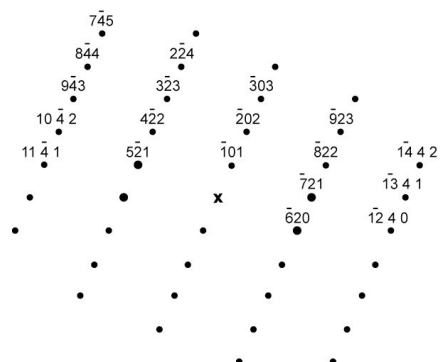


Figure V-6 (voir page suivante)

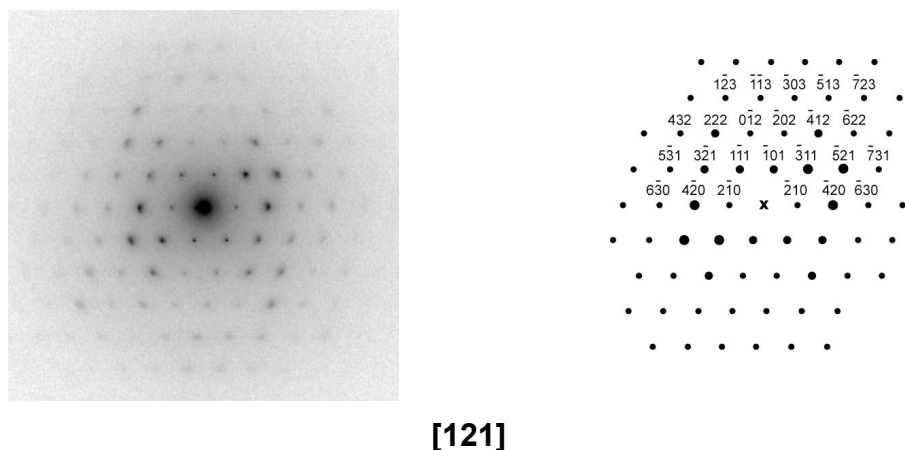


Figure VI-6 : Clichés de diffraction (colonne de gauche) correspondant à la série d'axes de zone d'indices **[1k1]** enregistrés à partir de cristaux inclinés autour de l'axe **[101]**. La colonne de droite rassemble les clichés indexés.

$$d_{hkl} = \frac{d_{or} \times D_{or}}{D_{hkl}} \quad (VI-1)$$

où d_{or} est la distance réticulaire associée à un anneau de diffraction de l'or, D_{hkl} la distance en pixels séparant une paire de réflexions symétriques par rapport au centre et D_{or} le diamètre de l'anneau d'or. Nous avons utilisé le premier anneau d'or correspondant à une distance réticulaire de 0,235 nm. Les distances en pixels ont été mesurées à partir des images numériques au moyen du logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Les clichés de diffraction exploitables ont ensuite été mis à l'échelle à partir de ces diagramme calibrés, en utilisant des réflexions communes. Lorsque cela a été possible, notamment pour les axes de zones les plus fréquemment rencontrés, les distances réticulaires calculées ont été moyennées à partir de plusieurs clichés (de 2 à 7).

En compilant les clichés de diffraction électroniques enregistrés pour les différents axes de zone identifiés (Figures VI-5, VI-6 et VI-7), nous avons constitué une liste de 183 tâches de diffraction ainsi que des distances réticulaires associées. Cette liste est présentée en Annexe. On notera aussi que certains clichés enregistrés selon des axes de la série **[1k1]** s'étendent parfois jusqu'à une résolution de 0,1 nm, ce qui traduit la grande perfection à très courte distance des cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(2)12-23**.

Nous avons déterminé les paramètres de la maille cristalline au moyen d'une application conçue par Y. Nishiyama et basée sur une régression par la méthode des moindres carrés, en imposant une contrainte monoclinique :

$$a=2,098 \text{ nm} , b= 1,147 \text{ nm} , c= 1,062 \text{ nm (axe de chaîne)} ; \alpha=\beta=90^\circ , \gamma=121,46^\circ$$

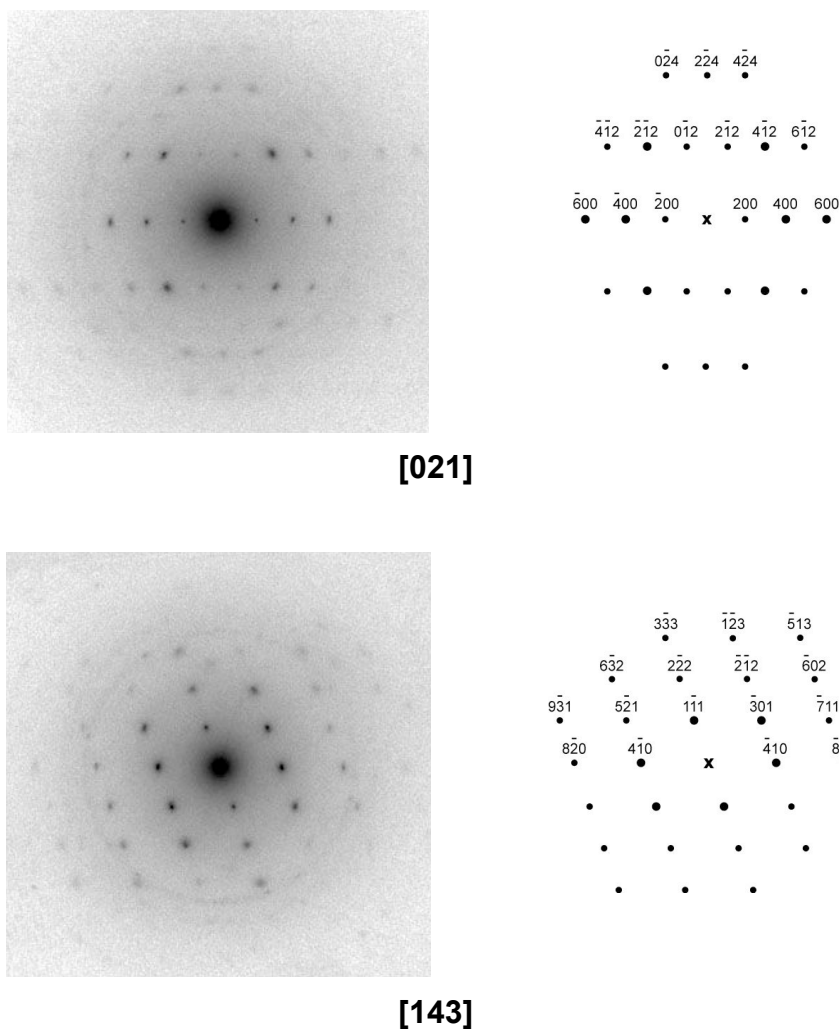


Figure VI-7 : Deux autres clichés de diffraction (colonne de gauche) indexés **[021]** et **[143]**.
La colonne de droite rassemble les diagrammes indexés.

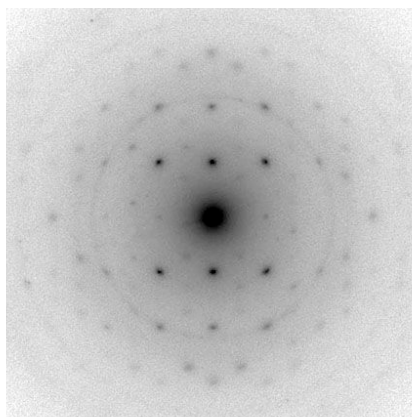


Figure VI-8 : Exemple de cliché de diffraction électronique enregistré à partir d'un cristal déposé sur un film de carbone doré. Les anneaux correspondent à la diffraction par les cristallites d'or orientées aléatoirement. le premier anneau correspond à une distance réticulaire de 0,235 nm.

Comme le montre le Tableau VI-1, ces paramètres sont en bon accord avec les valeurs proposées par **Imberty *et al.* (1988)** et **Popov *et al.* (2006)** et déduites à partir de données de diffraction des électrons ou des rayons X. Cependant, elles sont plus proches de celles déterminées par Popov *et al.* à partir de données de microdiffraction des rayons X enregistrées à 100 K sur des monocristaux d'amylose A préparés à partir de la fraction **ASA(F1)**.

Tableau VI-1 : Comparaison des paramètres et du volume de la maille monoclinique de l'allomorphe A calculés à partir des données issues de différentes expériences de diffraction.

	rayons X (fibres) ^a	rayons X (poudre) ^b	électrons (monocrist.) ^c	rayons X (monocrist.) ^d	rayons X (monocrist.) ^e	électrons (ce travail)
<i>a</i> (nm)	2,133	2,124	2,076	2,087	2,083	2,098
<i>b</i> (nm)	1,190	1,172	1,116	1,146	1,145	1,147
<i>c</i> (nm)	1,052	1,069	1,045	1,055	1,058	1,062
α (°)	90	90	90	90	90	90
β (°)	90	90	90	90	90	90
γ (°)	123,91	123,5	122,51	121,94	122,02	121,46
<i>V</i> (nm ³) ^f	2,216	2,218	2,042	2,141	2,139	2,180
<i>T</i> (°C)	20	20	-170	-170	-170	-180

(a) paramètres monocliniques recalculés à partir de la maille orthorhombique proposée par **Wu et Sarko, 1978b** ; (b) **Imberty *et al.*, 1987** ; (c) paramètres monocliniques recalculés à partir de la maille orthorhombique proposée par **Imberty *et al.*, 1988** ; (d) **Popov *et al.*, 2006** ; (e) **Popov *et al.*, 2008**.

(f) volume de la maille monoclinique : $V = a.b.c. \sin \gamma$

1.3. Densité des cristaux d'amylose A

Nous avons mesuré la densité de cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** en ajoutant des gouttes de tétrachlorure de carbone à des solutions de chloroforme et de dichlorométhane dans lesquelles les cristaux d'amylose A coulaient (procédure décrite dans le Chap. II, § 5.6). L'équilibre de ces cristaux dans les deux solutions mixtes a permis de déduire une densité de 1,50 g/cm³, valeur comparable à celle rapportée par Imberty *et al.* pour des monocristaux (1,48 g/cm³) et **Wu et Sarko (1977)** pour des fibres d'amylose (1,51 g/cm³).

1.4. Modèle moléculaire déterminé par diffraction des rayons X

Des expériences de microdiffraction des rayons X ont été réalisées par D. Popov (ligne ID13 de l'ESRF) sur des monocristaux d'amylose A préparés à partir de la fraction **ASA(F1)**. Bien que ces expériences n'aient pas directement été menées dans le cadre de cette thèse, nous en résumerons ici les principaux résultats qui touchent à la structure moléculaire des cristaux (**Popov *et al.*, 2006, 2008**).

Les cristaux utilisés, d'une longueur de 5 à 15 μm , sont présentés sur la Figure VI-9a. A l'aide d'un micromanipulateur, des cristaux individuels ont été fixés sur la pointe de capillaires en verre avec de la colle Araldite (Figure VI-9b). Les échantillons hydratés ont été ensuite rapidement congelés par un jet d'azote gazeux froid et maintenus à 100 K durant l'enregistrement des clichés, afin de limiter des dégâts d'irradiation. Les expériences de microdiffraction ont été réalisées avec un rayonnement synchrotron d'une longueur d'onde de $\lambda=0,00947$ nm et un faisceau collimaté à 10 μm . Des clichés, tels que celui présenté sur la Figure VI-9c, ont été enregistrés en faisant varier l'angle d'inclinaison des cristaux de 2 ou 4°, durant des temps de pose de 1 à 2 s (pour plus de détails, se reporter à **Popov *et al.*, 2006**). Il est important de noter que c'est la première fois que des données de ce type sont collectées à partir de monocristaux de polymères de taille micrométrique.

L'analyse d'une première série de clichés enregistrés sur 2 cristaux a fourni un jeu de 57 réflexions indépendantes, jusqu'à une résolution de 0,151 nm, et a permis de confirmer la maille monoclinique proposée par **Imberty *et al.* (1988)**. Les paramètres sont donnés dans le Tableau VI-1. Par ailleurs, il a été montré que sous l'effet de l'irradiation, la maille tendait à évoluer vers un réseau orthorhombique.

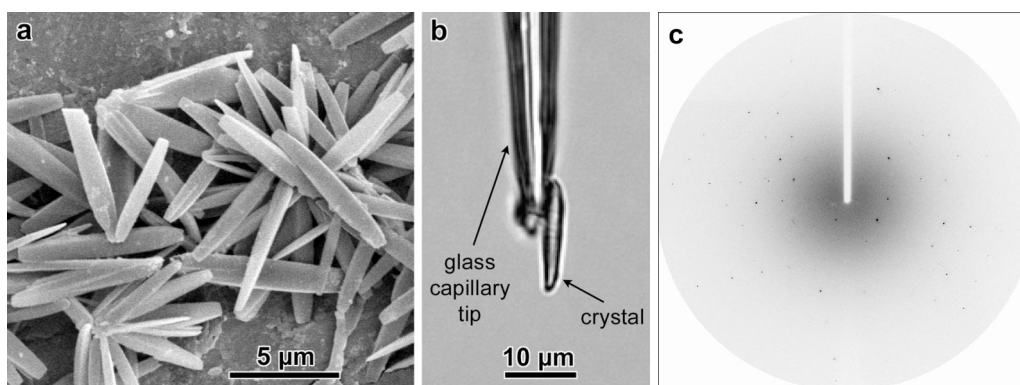


Figure VI-9 : a) Image de MEB de cristaux préparés par recristallisation de la fraction **ASA(F1)** ; b) micrographie optique montrant un cristal collé sur la pointe d'une capillaire de verre (de **Popov *et al.*, 2008**). c) Exemple de cliché de diffraction des rayons X enregistré à l'ESRF à partir d'un cristal unique d'amylose de type A (de **Popov *et al.*, 2006**).

Une seconde série d'expériences a été réalisée sur 14 cristaux, permettant de réunir un jeu de 98 réflexions indépendantes, jusqu'à une résolution de 0,13 nm. La structure cristalline a ensuite été déterminée au moyen des méthodes utilisées habituellement pour les cristaux de petites molécules et décrites en détail par **Popov *et al.* (2008)**. Un modèle bâti sur un réseau

de doubles hélices parallèles d'ordre 6 a été proposé mais un certain nombre de différences ont été observées par rapport au modèle moléculaire proposé auparavant par **Imberty *et al.* (1988)** (Figure VI-10a). Tout d'abord, en comparant les structures projetées selon l'axe *c* (Figure VI-10b), on constate que la section des doubles hélices est légèrement déformée dans le modèle de Popov *et al.* alors qu'elle est symétrique dans le modèle d'Imberty *et al.* Ceci est dû à la présence de paires de molécules d'eau intercalées entre les doubles hélices, tandis que la structure d'Imberty *et al.* contient deux fois moins de molécules d'eau et que celles-ci sont isolées.

Par ailleurs, le modèle révèle la présence d'un réseau dense de liaisons hydrogène stabilisant l'empilement des doubles hélices en impliquant tous les groupements hydroxyles et hydroxyméthyles (Figure VI-10c). Enfin, le modèle de Popov *et al.* propose un empilement des doubles hélices dit "*parallel-down*" (l'atome O5 est au-dessus de l'atome C5 le long de l'axe *c*) tandis que celles-ci sont "*parallel-up*" dans le modèle d'Imberty *et al.* Cela signifie que dans ce modèle révisé, l'extrémité non-réductrice des chaînes d'amylose pointe dans la même direction que l'axe *c* de la maille (Figure VI-10c). Ce résultat est important pour déterminer l'orientation des molécules dans les monocristaux présentés dans notre travail.

La densité calculée du cristal décrit par Popov *et al.* est de $1,62 \text{ g/cm}^3$, valeur sensiblement plus élevée que celle que nous avons déterminée expérimentalement ($1,50 \text{ g/cm}^3$). La différence pourrait être en partie expliquée par le fait que les paramètres de maille de Popov *et al.* (tout comme ceux mesurés par diffraction électronique) ont été déterminés à basse température et correspondent à une maille contractée.

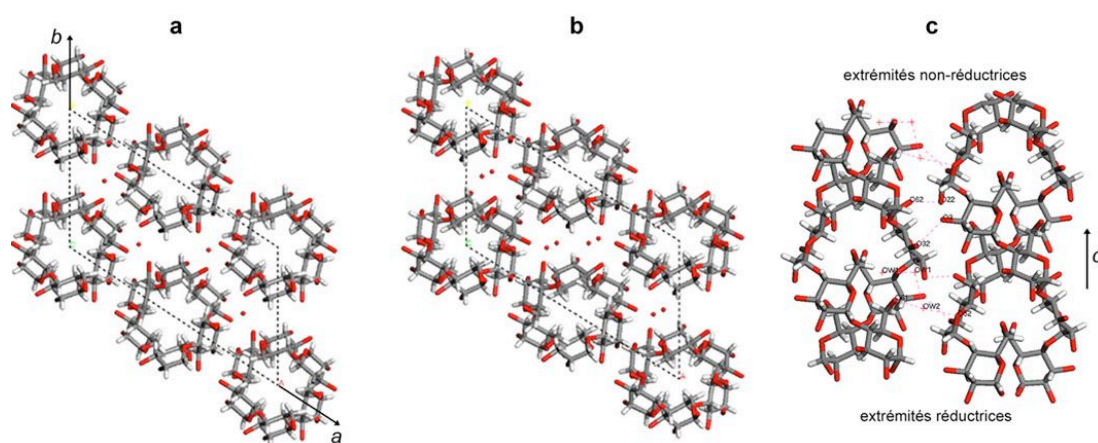


Figure VI-10 : a,b) Projection dans le plan (*a,b*) des modèles moléculaires de l'allomorphe A : a) **Imberty *et al.* (1988)** ; b) **Popov *et al.* (2008)**. c) Vue longitudinale des doubles hélices dans le modèle de Popov *et al.* Les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés. Les points isolés représentent les atomes d'oxygène des molécules d'eau (de **Popov *et al.*, 2008**).

2. STRUCTURE DES MONOCRISTAUX DE TYPE A

Les images de MEB de cristaux préparés à partir de différentes fractions d'amylose révèlent parfois une texture feuilletée. Celle-ci est plus visible lorsque les observations sont réalisées au moyen d'un MEB-FEG, plus résolutif (Figures VI-11a et 11b). Cette texture apparaît aussi à l'intérieur de cristaux cassés (Figure VI-11c). De même, cet aspect est observé sur les images de MET de cristaux colorés négativement, préparés aussi bien à partir de fractions synthétiques (Figure VI-12) que de dextrines issues d'une hydrolyse acide (Figure VI-13). Lorsque les cristaux sont vus à plat, le feuilletage apparaît plus nettement sur les faces latérales inclinées (Figure VI-12). Les images enregistrées par AFM en mode contact intermittent confirment cette texture, en particulier les images de phase (Figures VI-14 et VI-15).

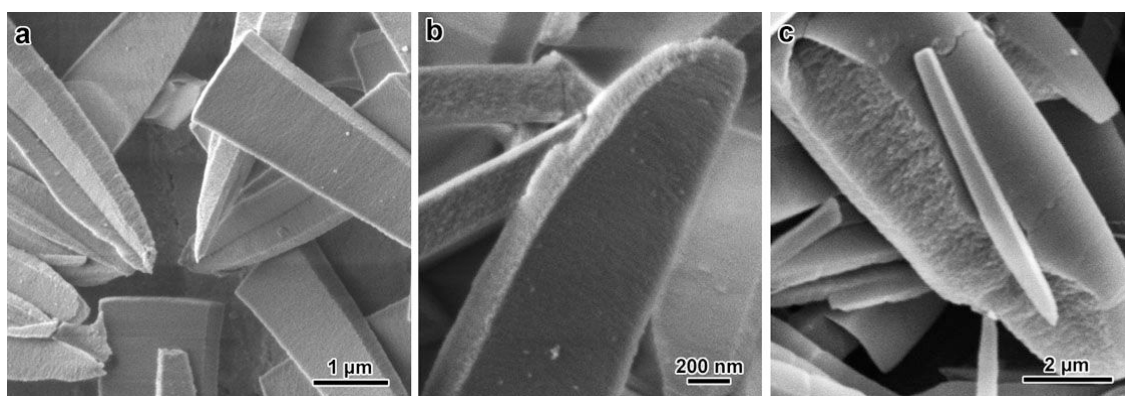


Figure VI-11 : Images de MEB de cristaux d'amylose A préparés à partir des fractions **ASA(2)12-23** (a,b) et **ASA(3)14-21** (c). (a) et (b) ont été enregistrées avec un MEB-FEG.

Pour ces trois techniques, les échantillons sont séchés et, le cas échéant, colorés ou métallisés, ce qui pourrait entraîner une modification partielle de la surface par déshydratation. Cependant, l'image de cryo-MET d'un cristal rapidement congelé et observé à l'intérieur d'un mince film de glace révèle aussi (bien que plus difficilement) une texture équivalente (Figure VI-13b), prouvant que le feuilletage n'est pas dû au séchage.

Les images enregistrées au moyen de toutes ces techniques suggèrent donc que les monocristaux d'amylose A ont une structure lamellaire, le feuilletage étant perpendiculaire à l'axe de croissance. Cette structure est généralement très régulière, à l'exception de cristaux préparés à base de dextrines de pomme de terre comme celui présenté sur la Figure VI-14c. Cette organisation lamellaire a déjà été rapportée par **Pohu *et al.* (2004)** pour des cristaux d'amylose A préparés à partir de dextrines de pomme de terre. Sur les images de MET d'échantillons colorés négativement, les lamelles apparaissent inclinées symétriquement de

part et d'autre du grand axe de ces cristaux. Elles ont une épaisseur de 5-7 nm. Sachant que le pas d'une double hélice d'ordre 6 vaut $2c$ soit environ 2,10 nm, un duplex formé de chaînes de DP 15 mesurerait 5,25 nm, ce qui est en bon accord avec la valeur expérimentale. Les mesures effectuées sur nos images permettent aussi d'évaluer une épaisseur des lamelles de 5 à 10 nm, ce qui est cohérent avec la longueur des fractions que nous avons utilisées (typiquement, une gamme de DP de 15 à 25 correspondrait à des duplex d'une hauteur de 5,25 à 8,75 nm).

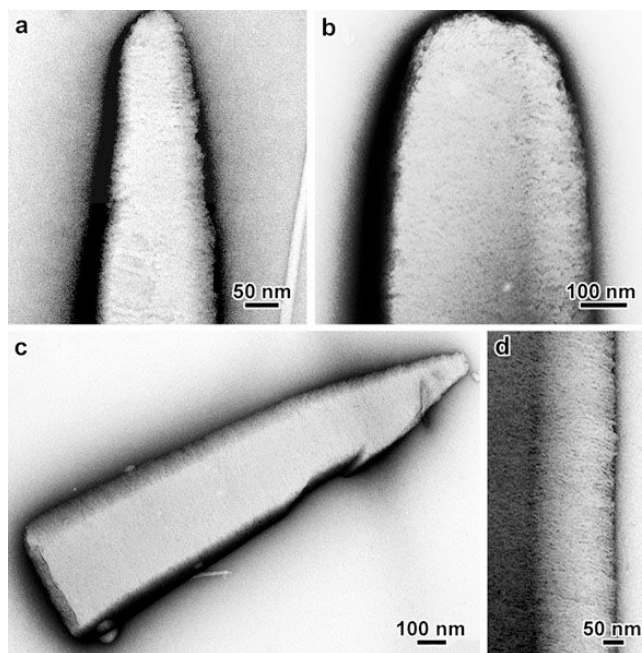


Figure VI-12 : Images de MET de cristaux formés à partir des fractions **ASA(F1)** (a), **ASA(1)23-32** (b) et **ASA(2)12-23** (c,d). L'image (d) est un détail du bord d'un cristal tel que celui présenté en (c). Les échantillons ont été colorés négativement.

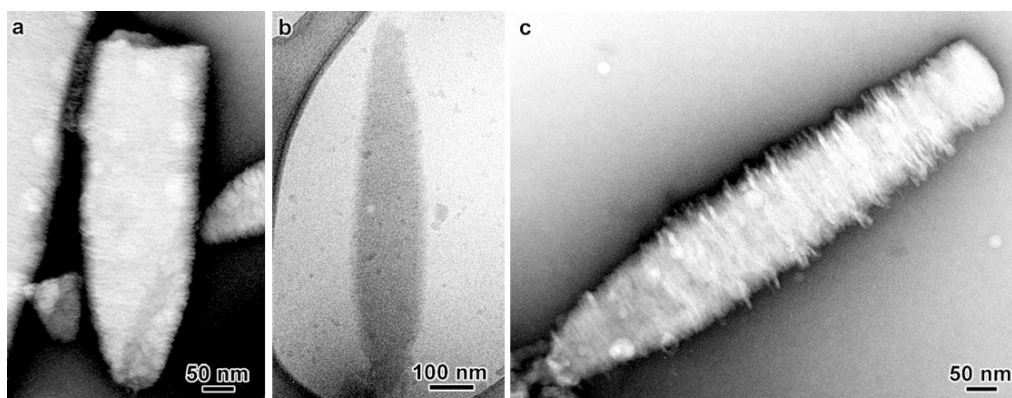


Figure VI-13 : Images de MET de cristaux formés à partir de dextrines de pomme de terre (fraction **DLP(2)8-21**). a,c) coloration négative ; b) cryo-MET.

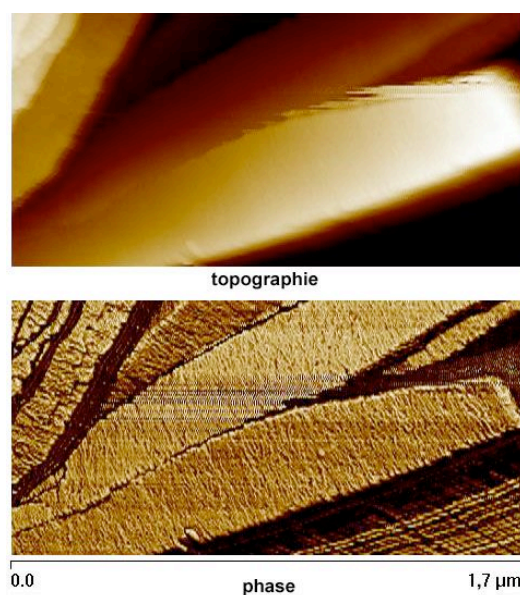


Figure VI-14 : Images d'AFM (mode contact intermittent) de cristaux préparés à partir de la fraction ASA(1)17-28. En haut : image de topographie ; en bas : image de phase.

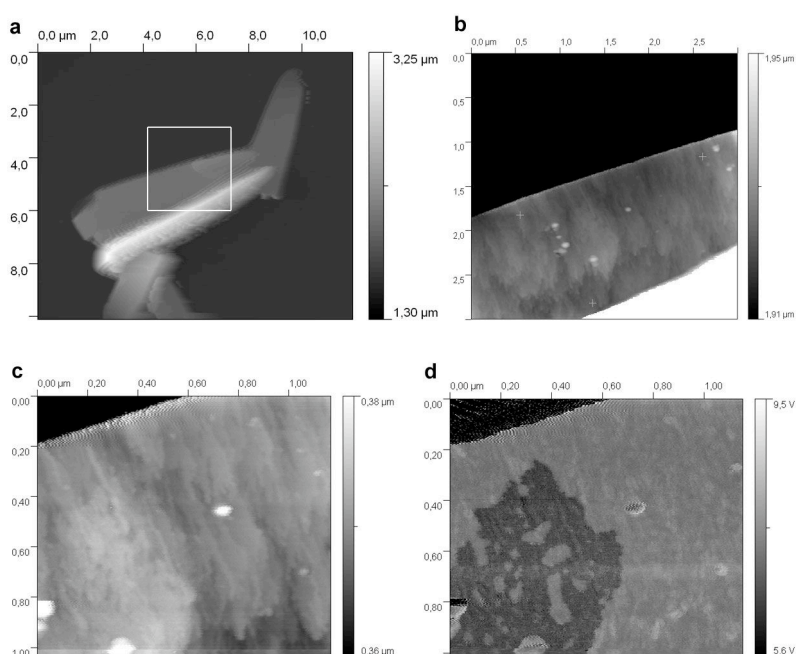


Figure VI-15 : Images d'AFM (more contact intermittent) de cristaux préparés à partir des dextrines d'amidon de pomme de terre DLP(2). a-c) images de topographie ; d) image de phase.

Comme nous l'avons montré précédemment (Chap. V, § 1), les objets formés par nucléation hétérogène de dextrines limites d'amidon de maïs (**MDR**) ou de pomme de terre (**DLP**) sur des microcristaux de cellulose ont aussi un aspect feuilleté très marqué. Les lamelles, orientées perpendiculairement aux whiskers, sont irrégulières (Figure VI-16) mais leur épaisseur est du même ordre que celle mesurée pour les cristaux en ogive. Les

irrégularités sont probablement dues à la polydispersité des fractions et à la présence de points de branchement. Bien que nous n'ayons pas pu le démontrer par diffraction électronique, nous pouvons faire l'hypothèse raisonnable que les doubles hélices sont orientées perpendiculairement aux lamelles, comme dans les cristaux en ogive. Cependant, contrairement à ces derniers, la croissance le long de l'axe *c* semble limitée.

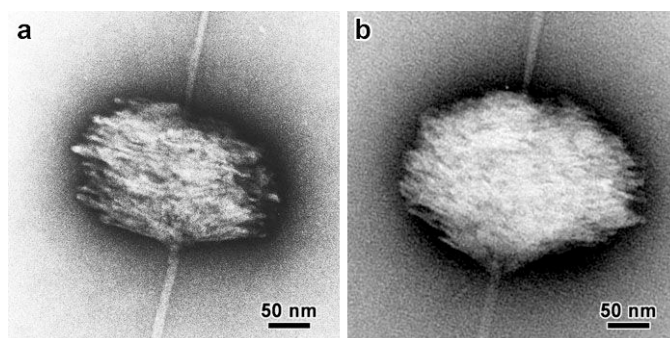


Figure VI-16 : Organisation lamellaire dans les cristaux formés par nucléation hétérogène sur des whiskers de cellulose : a) dextrines d'amidon de maïs MDR ; b) dextrines d'amidon de pomme de terre **DLP(1)8-27**.

3. DISCUSSION

3.1. Synthèse des résultats

Les différentes techniques d'imagerie et de diffraction utilisées dans ce travail ont permis de confirmer un certain nombre de résultats concernant la morphologie et la structure des cristaux d'amylose A mais aussi d'apporter plusieurs informations nouvelles :

- La structure monoclinique est confirmée par les données de diffraction électronique. L'axe *c* de la maille est de direction opposée à la direction de croissance des cristaux. La section parallélogramme des cristaux correspond à la projection du plan (*a,b*). La face la plus large est la face (010) et contient l'axe *a* tandis que la face la moins large est la face (100) et contient l'axe *b* (Figure VI-17). L'apex plat de certains cristaux correspond à la face (001).

- Les cristaux ont une structure lamellaire, les lamelles étant parallèles au plan (*a,b*) de la maille monoclinique et perpendiculaire au sens de la croissance cristalline.

- Le modèle moléculaire calculé par **Popov *et al.* (2008)** à partir de données de microdiffraction des rayons X confirme la maille monoclinique ainsi que l'empilement de doubles hélices d'ordre 6 proposé par **Imberty *et al.* (1988)**. La structure "révisée" est cependant deux fois plus hydratée que celle d'Imberty *et al.* Les doubles hélices sont

légèrement déformées et ont une orientation *parallel-down* dans la maille. L'extrémité non-réductrice des chaînes pointe donc dans le sens de l'axe *c* et à l'opposé de la direction de croissance.

Les chaînes d'amylose pointant toutes dans la même direction dans la maille et ayant deux extrémités chimiquement distinctes (Chap. II, § 1.1.2.1), les cristaux d'amylose A peuvent être décrits comme des **objets polaires**. Un monocristal ogival possède donc un côté réducteur, correspondant à son extrémité apicale, et une extrémité non-réductrice, du côté du point de nucléation (Figure VI-17).

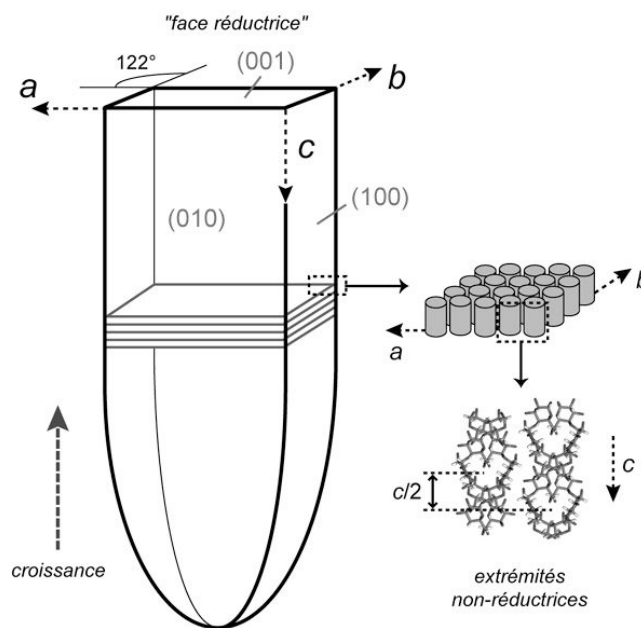


Figure VI-17 : Modèle schématique d'un monocristal d'amylose A synthétisant les différents résultats obtenus par les différentes méthodes de caractérisation structurale. La morphologie choisie est celle des cristaux formés à partir de la fraction ASA(2)12-23 (Figure VI-2). Les lamelles sont formées de doubles hélices symbolisées par des cylindres gris. Selon l'axe *a*, les duplex voisins sont alternativement décalés de $c/2$ selon l'axe *c*. Le modèle moléculaire est celui proposé par Popov *et al.* (2008).

3.2. Morphologie

Préparés à partir de fractions de DP typiquement compris entre 12 et 30, les cristaux d'amylose A sont des plaquettes (Chap. III). Cependant, l'orientation de la maille monoclinique dans les cristaux a montré que ceux-ci étaient foncièrement différents de cristaux lamellaires qui sont obtenus par cristallisation de polymères à partir de solutions diluées. L'axe de chaîne *c* est dans ce cas perpendiculaire au plan des lamelles. C'est le cas

pour plusieurs polysaccharides comme, par exemple, la cellulose (**Buléon et Chanzy, 1978, 1980 ; Helbert *et al.*, 1998**), la chitine (**Helbert *et al.*, 1998**) ou la forme V de l'amylose recristallisée en présence de complexant (**Buléon *et al.*, 2007**). Des cristaux lamellaires sont aussi préparés à partir de nombreux polymères synthétiques (**Tsuji et Kohjiya, 1995**).

L'orientation des chaînes dans le plan des plaquettes semble donc être une caractéristique unique des cristaux d'amylose A. Par certains aspects, ce cas s'apparente néanmoins à celui du collagène et, en particulier, à la formation *in vitro* de fibrilles cristallines en solutions diluées (**Prockop et Fertala, 1998**) ou concentrées; (**Gobeaux *et al.*, 2008**). Ces objets sont en effet formés par croissance longitudinale d'un assemblage de triples hélices se terminant par une pointe de forme parabolique (**Holmes *et al.*, 1992**). Cette analogie mériterait peut-être d'être explorée plus en détails.

3.3. Polarité

Si la nature polaire des cristaux découle des modèles moléculaires qui font intervenir des doubles hélices parallèles, elle reste à démontrer expérimentalement. L'identification de la polarité de cristaux de polysaccharides a déjà été abordée dans le cas de la cellulose et de la chitine natives. **Koyama *et al.* (1997)** ont fait croître sur l'extrémité réductrice de whiskers de cellulose I des nanoparticules d'argent qui sont visibles par MET. Ce traitement comprend une étape d'incubation à 65°C. Une autre méthode a été décrite par **Kim *et al.* (2000)** qui ont procédé à un marquage à l'or colloïdal des groupements aldéhydes des extrémités réductrices de microfibrilles de cellulose I. Enfin, une troisième méthode a récemment été mise au point par **Imai *et al.* (2002)** pour marquer l'extrémité réductrice de whiskers de chitine β . Son principe est la reconnaissance de biotine greffée sur la chitine, par la streptavidine fonctionnalisant la surface de nanoparticules d'or, la procédure ayant lieu à 50°C. Ces méthodes pourraient donc être adaptées au cas des cristaux d'amylose A, à condition de tester au préalable la stabilité des cristaux dans un milieu aqueux sans acétone, en particulier durant une étape de chauffage.

Les méthodes de marquage précédemment décrites ont été utilisées pour identifier la polarité chimique de microfibrilles de cellulose I et de chitine β formées de chaîne parallèles et biosynthétisées *in vitro* par des complexes enzymatiques. Le "sens" de la biosynthèse a ainsi pu être déterminé et, dans les deux cas, les microfibrilles s'allongent par ajout d'unités sucres à l'extrémité non-réductrice (**Koyama *et al.*, 1997 ; Imai *et al.*, 2002**). Le cas de l'amidon est différent car les molécules ne sont pas synthétisées sous forme de microfibrilles.

En particulier, l'amylopectine possède une seule extrémité réductrice et un très grand nombre d'extrémités non-réductrices correspondant aux extrémités des courtes branches linéaires (Chap II, § 1.1.2). Les modèles actuels décrivent la biosynthèse *in vivo* de l'amylopectine par l'action concertée de trois activités (élongation, branchement et débranchement) réalisées par différentes enzymes (**Ball et al., 1996**). Dans la phase d'élongation, l'ajout d'unités glucopyranosyl a lieu sur l'extrémité non-réductrice des chaînes linéaires. En prenant en compte le modèle moléculaire de **Popov et al. (2008)**, l'élongation des chaînes se ferait donc dans la direction de l'axe *c* de la maille monoclinique. De plus, en se basant sur le modèle en grappe de l'amylopectine actuellement admis (**Robin et al., 1974**), les lamelles cristallines auraient leur face non-réductrice orientée vers la surface du grain en croissance (Chap. I, § 1.1.2.2). Le grain d'amidon se développerait donc dans la direction de l'extrémité non-réductrice des chaînes. Ceci n'a cependant pas encore été démontré expérimentalement, en grande partie à cause de la difficulté de caractériser l'ultrastructure complexe des grains d'amidon.

Le couplage de l'analyse cristallographique de nos échantillons préparés *in vitro* et du modèle moléculaire de **Popov et al. (2008)** nous a conduits à conclure que les cristaux d'amylose A se développaient axialement, dans la direction de l'extrémité réductrice, alors que la croissance des grains d'amidon natifs par biosynthèse *in vivo* se ferait dans la direction de l'extrémité non-réductrice.

Par ailleurs, il est intéressant d'examiner le type d'organisation moléculaire observé pour d'autres polysaccharides cristallisés à partir de solutions diluées. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux travaux de Chanzy et coll. Nous citerons par exemple les résultats publiés à partir de cristaux de cellulose II (**Buléon et Chanzy, 1978**) et IV (**Buléon et Chanzy, 1980**), d'inuline (**André et al., 2006**), de chitosane (**Mazeau et al., 1994**), de $\beta(1,4)$ -xylane (**Chanzy et al., 1979**), de dextrane (**Guizard et al., 1984**) ou encore de manane I (**Chanzy et al., 1987**). Il ressort que les molécules constituant ces cristaux sont organisées de manière antiparallèle.

Les travaux concernant la forme V de l'amylose recristallisée sous forme de cristaux lamellaires en présence d'un complexant proposent des organisations antiparallèles de simples hélices. Cette hypothèse découle notamment de la nécessité de faire intervenir des repliements de chaînes lorsque l'amylose est plus longue que l'épaisseur des lamelles cristallines. De plus, les groupes d'espace déterminés par diffraction électronique conduisent généralement à construire des modèles à chaînes antiparallèles (**Buléon et al., 1990 ; Brisson et al., 1991 ; Helbert, 1994 ; Hulleman et al., 1996 ; Cardoso et al., 2007**). Cependant, à ce jour, peu de modèles ont été validés expérimentalement pour vérifier définitivement cette hypothèse.

Le cas de l'amylose A, formée de chaînes parallèles, apparaît donc comme relativement unique chez les polysaccharides. Seule l'amylose B, correspondant à une maille hexagonale été décrite par un modèle constitué de doubles hélices d'ordre 6 parallèles (**Imberty et Perez, 1988**). Cependant, à ce jour, il n'existe pas pour le type B d'analyse aussi complète que celle que nous avons réalisée sur les cristaux d'amylose A, ceci à cause de la difficulté de préparer des monocristaux.

La polarité chimique dans un solide peut être recherchée pour conférer au matériau des propriétés spécifiques, en particulier optiques et électroniques. Plusieurs travaux concernent l'élaboration de cristaux à base de petites molécules (**Hulliger *et al.*, 1998 ; Jouaiti *et al.*, 2002**) et il apparaît que la cristallisation *in vitro* de chaînes parallèles est difficile. Bien que nous n'ayons pas fait de bibliographie exhaustive à ce sujet, il semble donc que les solides polaires préparés par recristallisation soient assez rares.

CHAPITRE VII

MÉCANISME DE CROISSANCE

1. LES MORPHOLOGIES CRISTALLINES

Les principales formes d'organisation des cristaux d'amylose A préparés par nucléation homogène en solution diluée sont illustrées sur la Figure VII-1. La première correspond à des "rosettes" dont les "pétales", de longueur relativement identique et correspondant à des monocristaux, sont unis au centre de l'édifice, lieu de la nucléation (Figure VII-1a). Ces cristaux se sont développés dans toutes les directions et ne semblent pas avoir d'orientation particulière les uns par rapport aux autres (Figures VII-1a à 1c et 1g). Dans la seconde forme, les cristaux sont organisés en "éventail", avec une distribution en taille, et sont répartis symétriquement par rapport à un long cristal central (Figure VII-1b). De nouveaux cristaux se développent par nucléation hétérogène sur les faces les plus larges de cristaux déjà formés, avec un angle de rotation entre les grands axes de l'ordre de 5 à 10° (Figures VII-1a, 1b, 1d-1f). De plus, les cristaux se superposent comme dans un escalier en colimaçon et l'hélicité déterminée à partir des images de MEB est toujours gauche (Figures VII-1e à 1g).

Les rosettes s'inscrivent donc dans des sphères tandis que les éventails se développent plutôt dans un plan. Néanmoins, on ne peut pas exclure la possibilité selon laquelle les éventails aient été associés au sein d'édifices plus gros qui ont été fragmentés par des contraintes mécaniques (agitation, manipulation) ou durant le séchage (Figure VII-2). Une organisation intermédiaire, avec une distribution en taille des cristaux mais sans que ceux-ci ne soient organisés en marches d'escalier est aussi présentée sur la Figure VII-1h. Enfin, les cristaux organisés en "moustaches" se développent à partir d'un même site de nucléation dans deux directions opposées (Figures VII-1c et 1i).

De même, nous pouvons distinguer différents types morphologiques pour les monocristaux. Ceux-ci sont soit associés au sein des édifices décrits précédemment, soit individualisés, très probablement en raison de la fragmentation des organisations sous l'effet de contraintes mécaniques ou durant le séchage. En effet, si les cristaux semblent fortement liés les uns aux autres dans les éventails, la tenue mécanique des rosettes est visiblement moins bonne tant les contacts entre cristaux apparaissent limités (Figure VII-3). L'extrémité des cristaux correspondant au point de nucléation est pointue dans pratiquement tous les cas, l'exception étant le type *h* de la Figure VII-1 pour lequel elle est arrondie. La forme de l'extrémité apicale dépend de la fraction. Elle peut être pointue et mince (Figures VII-1d et 1h), plate (Figures VII-1e et 1f) ou arrondie (Figure VII-1g). Cette classification, telle que nous l'avons illustrée sur la Figure VII-1, suit l'augmentation du $\overline{DP}_n$ des fractions, ce que nous avons schématisé de manière plus complète sur la Figure VII-4.

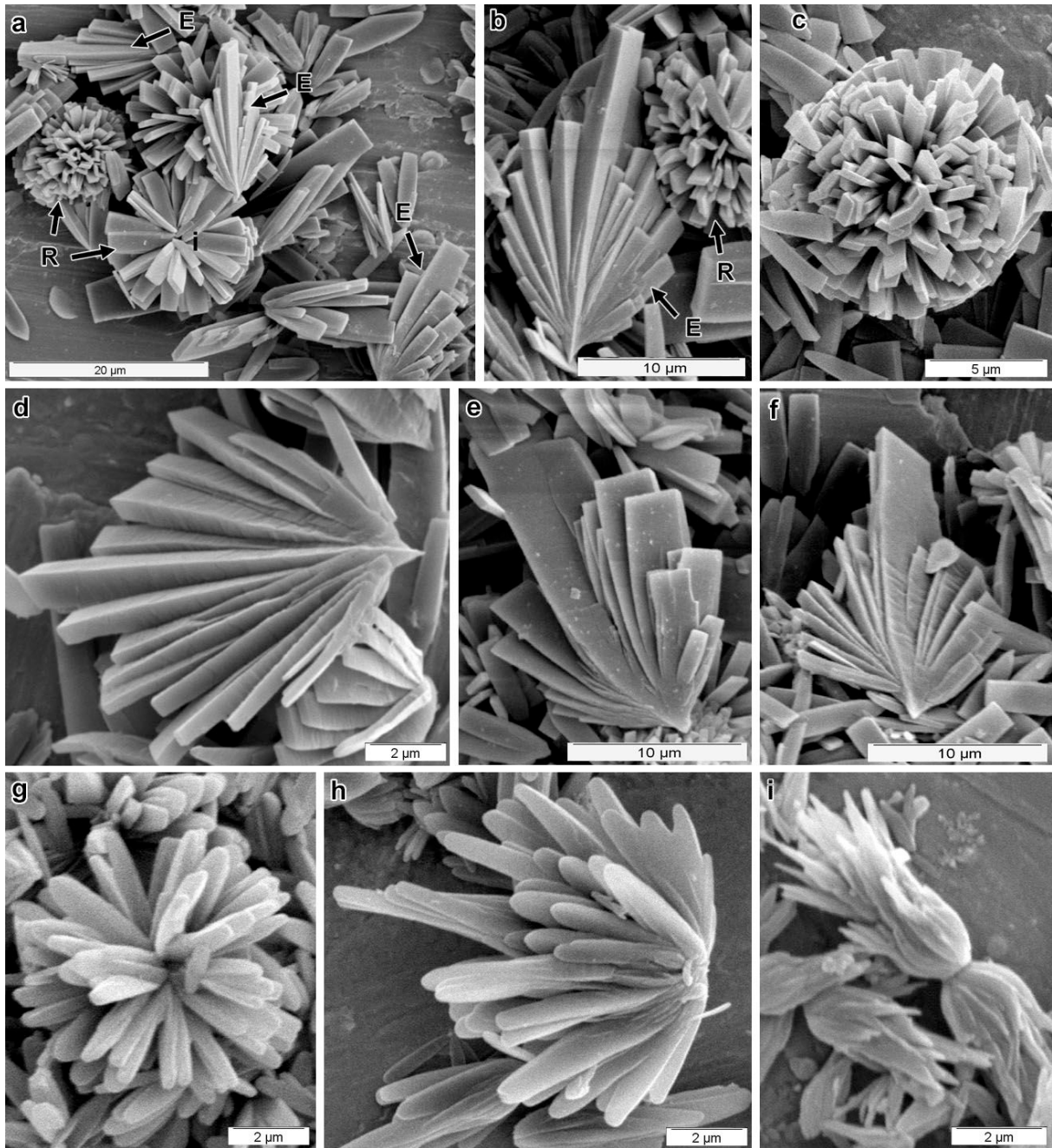


Figure VII-1 : Images de MEB de cristaux d'amylose A préparés à partir des fractions ASA(3)14-21 (a,b,e,f,g), ASA(2)12-23 (c), ASA(1)23-32 (g), ASA(3)20-29 (h) et ASA(3)23-33 (i). a, b, c et g montrent des exemples de "rosettes" tandis que a, b, d, e, f et h montrent des "éventails" et i des "moustaches". Dans les images où les deux types d'organisation coexistent (a,b), "R" indique les rosettes et "E" les éventails.

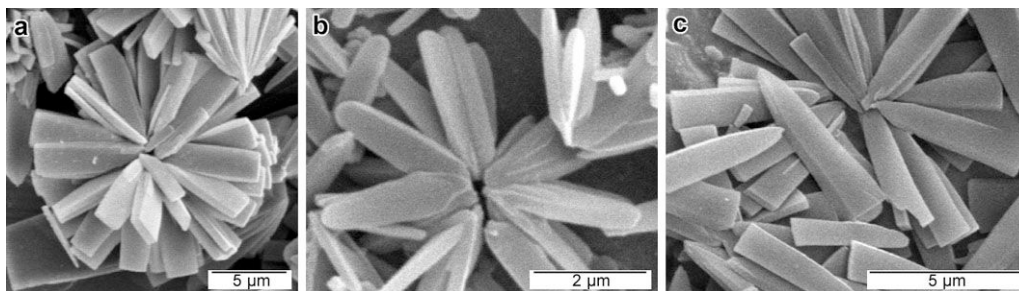


Figure VII-2 : Images de MEB de cristaux d'amylose A organisés en rosette plus ou moins écrasées par les forces capillaires durant le séchage et favorisant la séparation des monocristaux : fractions **ASA(3)14-21** (a), **ASA(1)23-32** (b) et **ASA(2)12-23** (c).

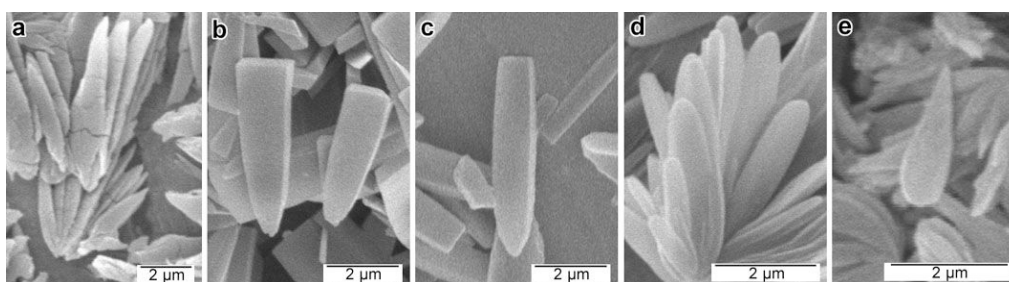


Figure VII-3 : Images de MEB récapitulant les principaux types morphologiques des cristaux individuels d'amylose A préparés en conditions de nucléation homogène (l'extrémité apicale est orientée vers le haut) : plaquette ogivale avec extrémité apicale pointue (a - **ASA(3)9-15**), cristaux avec apex plat (b - **ASA(2)12-23**, c - **ASA(1)17-28**), plaquette fusiforme avec apex arrondi (d - **ASA(3)20-29**), cristal avec apex pointu mais base arrondie (e - **ASA(3)23-33**).

2. INFLUENCE DES PARAMÈTRES MOLÉCULAIRES

2.1. Influence du DP moyen sur la morphologie des cristaux

Les caractéristiques morphologiques des cristaux préparés durant ce travail ont été récapitulées dans le Tableau IV-4 du Chapitre IV. Le schéma récapitulatif de la Figure VII-4 répartit les différentes formes cristallines en quatre classes, selon le $\overline{DP}_n$ des fractions utilisées. Des morphologies similaires peuvent être observées pour les cristaux préparés à partir de fractions différentes, même issues de synthèses différentes, mais possédant un $\overline{DP}_n$ comparable. Pour $\overline{DP}_n < 15$ (fractions en vert sur la Figure VII-4), les cristaux sont des plaquette ogivales. Les deux extrémités (point de nucléation et apex) sont pointues et minces. La partie centrale est plus large et épaisse (Figure VII-3a). Pour un $\overline{DP}_n$ compris entre 15 et 22 (en rouge sur la Figure VII-4), les cristaux sont des plaquettes de longueur variable possédant une extrémité apicale plate. Selon la fraction utilisée, les cristaux ont une forme triangulaire (**ASA(2)11-23**) ou plus allongée (par exemple **ASA(1)14-27** et **ASA(3)14-21**) (Figures VII-3b et VII-3c).

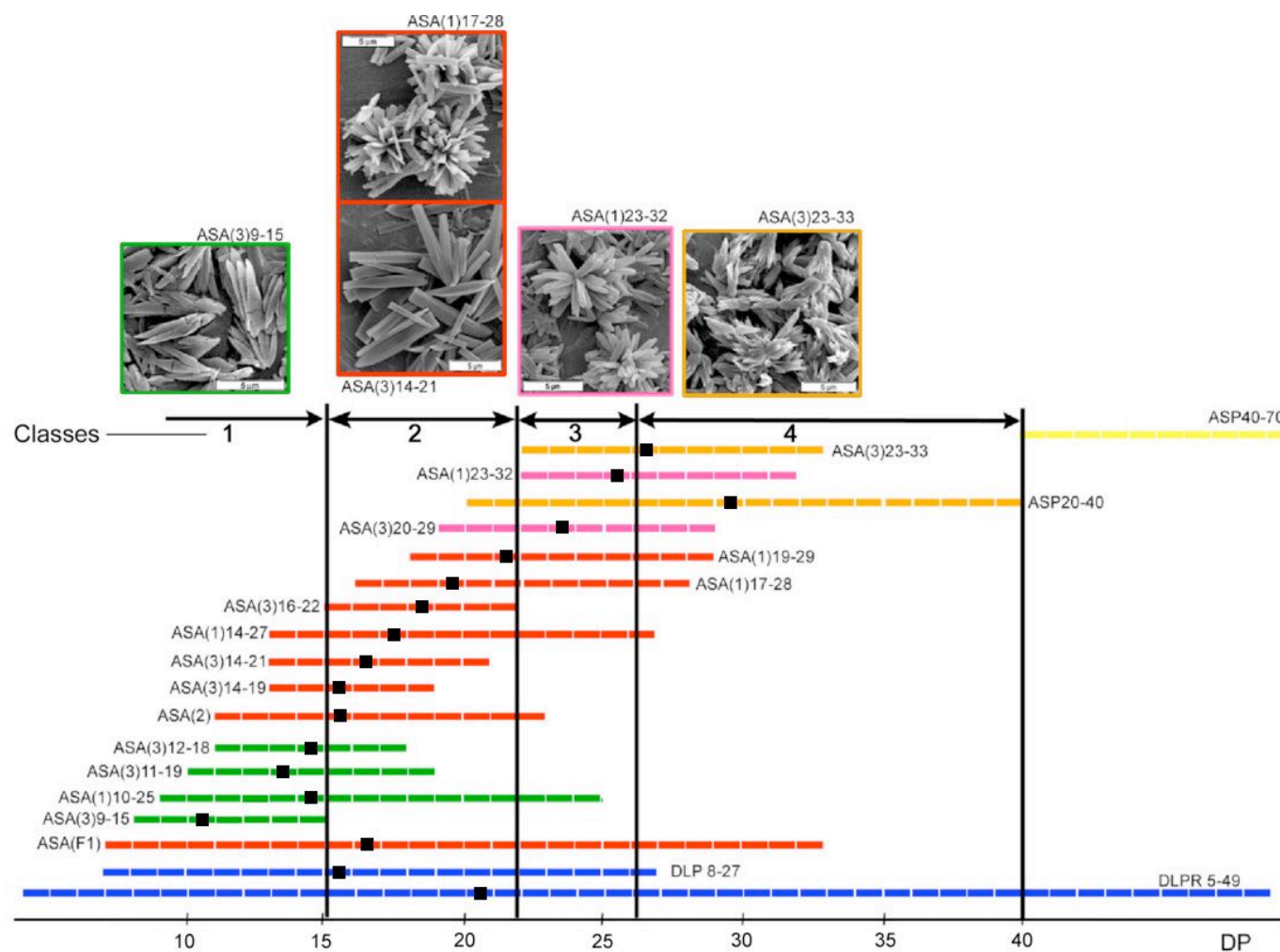


Figure VII-4 : Schéma récapitulant la morphologie des cristaux d'amylose A préparés en milieu homogène en fonction du DP. Chaque fraction est caractérisée par son DP_n (indiqué par le carré noir) et par une barre horizontale de couleur représentant la gamme de DP. Quatre classes ont été distinguées : 1) $DP_n < 15$ en vert ; 2) $15 < DP_n < 22$ en rouge ; 3) $22 < DP_n < 26$ en rose ; 4) $DP_n > 26$ en orange. Les images de MEB sont représentatives de la morphologie de la classe considérée. Les fractions en bleu correspondent à **DLP** et **DLPR**, et en jaune à **ASP40-70**.

La troisième classe (en rose sur la Figure VII-4) comprend les fractions dont le $\overline{DP}_n$ est compris entre 22 et 26. Les cristaux sont associés en rosettes, l'apex étant arrondi (Figure VII-3d). La dernière classe est constituée des fractions de $\overline{DP}_n$ compris entre 26 et 40 (secteur orange sur la Figure VII-4). Les cristaux qui appartiennent à cette dernière classe sont souvent associés en moustaches (Figure VII-3e). Ils ont une forme d'ogive, avec une extrémité apicale pointue et mince. La valeur de 40 a été choisie arbitrairement en raison de l'absence de monocristaux clairement identifiables préparés à partir de la fraction **ASP40-80**. L'absence d'une fraction possédant un $\overline{DP}_n$ intermédiaire entre **ASP20-40** et **ASP40-80** ne permet pas de fixer plus précisément la limite à partir de laquelle le changement de mode de cristallisation s'opère.

Les fractions **DLP** et **DLPR** (en bleu sur la Figure VII-4) possèdent un $\overline{DP}_n$ situé dans la gamme 15-22 (seconde classe). Les cristaux sont associés en rosettes mais les pétales sont des ogives avec l'extrémité apicale arrondie ou pointue et non pas plate comme les cristaux préparés à partir des fractions linéaires appartenant à cette classe. La présence de points de branchement dans ces fractions semble aussi influencer la forme des cristaux.

Au contraire, la polydispersité semble jouer un rôle moins important sur la morphologie. Par exemple, la fraction **ASA(F1)8-33**, qui possède un $\overline{DP}_n$ de 17 et une gamme de DP comparable à celle de **DLP**, forme des plaquettes à l'extrémité apicale plate et le site de nucléation pointu conformément aux cristaux préparés à partir de fractions de la deuxième classe.

2.2. Influence du DP moyen et de la polydispersité sur la taille des cristaux

La Figure VII-5 montre la variation de la longueur moyenne des cristaux en fonction du $\overline{DP}_n$ et de la largeur de distribution des fractions. Les cristaux préparés à partir de fractions synthétiques forment globalement des cristaux plus longs que ceux préparés à partir des dextrines limites. Les cristaux les plus grands sont obtenus à partir de fractions issues de la synthèse n°3 et avec un $\overline{DP}_n$ compris entre 15 et 19 : **ASA(3)11-19** ($\overline{DP}_n=14,5$), **ASA(3)12-18** ($\overline{DP}_n=15,3$), **ASA(3)14-21** ($\overline{DP}_n=17,5$) et **ASA(3)16-22** ($\overline{DP}_n=19,2$).

Les fractions synthétiques de $\overline{DP}_n$ et de polydispersité proche forment des cristaux de longueur comparable. Par exemple, les cristaux préparés à partir des fractions **ASA(1)10-25** ($\overline{DP}_n=15,4$ et $P=1,031$) et **ASA(2)12-23** ($\overline{DP}_n=16,5$ et $P=1,013$) ont des longueurs moyennes respectives de $4,8 \pm 1,6 \mu\text{m}$ et $4,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$. De même, les cristaux préparés à partir des fractions **ASA(1)23-32** ($\overline{DP}_n=26$ et $P=1,003$) et **ASA(3)23-33** ($\overline{DP}_n=27,5$ et $P=1,004$) ont des longueurs respectives de $2,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$ et $2,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$.

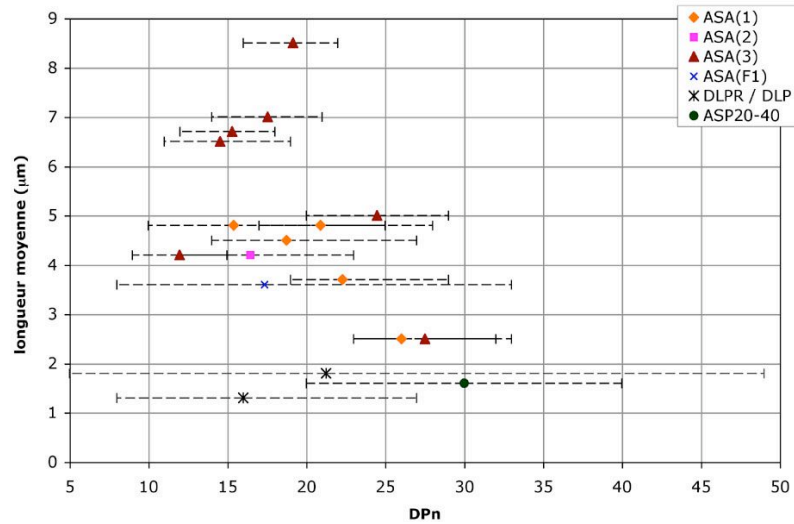


Figure VII-5 : Evolution de la longueur moyenne des cristaux en fonction du $\overline{DP}_n$. Les barres horizontales en pointillés représentent la gamme de DP de chaque fraction.

Un $\overline{DP}_n$ compris entre 15 et 19 semble nécessaire pour obtenir des cristaux de longueur supérieure à 5 µm mais la polydispersité est aussi un paramètre important. La Figure IV-6 montre l'évolution de la longueur moyenne des cristaux avec la polydispersité des fractions à partir desquelles ils ont été préparés. Les fractions **DLP(2)**, **DLPR** et **ASP**, plus polydisperses, forment des cristaux de longueur moyenne inférieure à 2 µm. Les cristaux préparés à partir des fractions **ASA(1)23-32** ($P=1,003$) **ASA(3)20-29** ($P=1,004$) et **ASA(3)23-33** ($P=1,004$) ont des longueurs moyennes respectives de 2,5, 5,0 et 2,5 µm. Avec la même polydispersité, mais avec un $\overline{DP}_n$ compris entre 15 et 19, les fractions **ASA(3)12-18** ($\overline{DP}_n=15,3$), **ASA(3)14-21** ($\overline{DP}_n=17,5$) et **ASA(3)16-22** ($\overline{DP}_n=19,1$) forment des cristaux de 6,7 µm, 7,0 µm et 8,5 µm, respectivement.

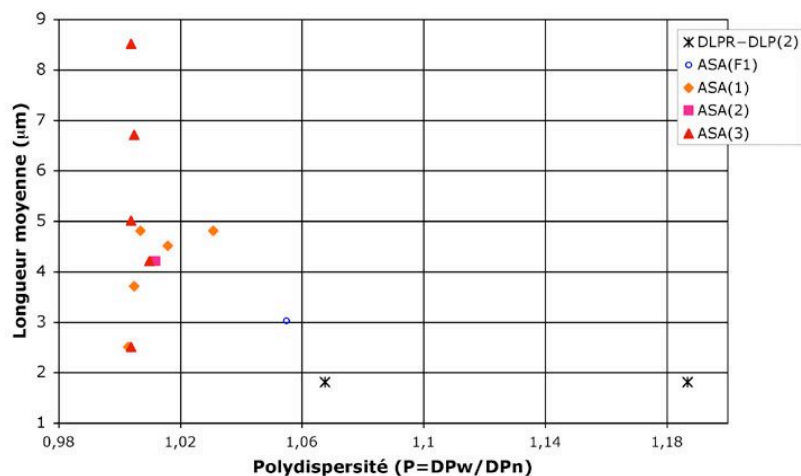


Figure VII-6 : Longueur moyenne des cristaux en fonction de la polydispersité des fractions.

La longueur moyenne des cristaux préparés à partir de la fraction **DLP(2)8-21** (plus polydisperse que les fractions obtenues par synthèse enzymatique) est inférieure à 2 μm . La fraction **ASA(F1)**, moins polydisperse ($P=1,055$) que **DLP(2)8-21**, avec un $\overline{DP}_n=17,4$, forme des cristaux de 3,6 μm de longueur de moyenne. Les cristaux préparés à partir de la fraction **ASA(3)14-21** ($\overline{DP}_n=17,5$ et $P=1,005$) ont une longueur moyenne de 7 μm . Une faible polydispersité est donc nécessaire pour obtenir des longs cristaux mais ce n'est pas une condition suffisante, les fractions devant aussi posséder un $\overline{DP}_n$ entre 15 et 19.

2.3. Influence du DP et de la polydispersité sur le type cristallin

Les produits de cristallisation de toutes les fractions d'amylose synthétique de $\overline{DP}_n$ inférieur à 40 présentent un spectre de DRX de type A. La fraction **DLPR** forme de cristaux dont le spectre est de type C. Le produit est donc un mélange de cristallites de type A et de type B, ce qui pourrait être expliqué par la polydispersité élevée de cette fraction. Les chaînes plus longues ($DP>35$) formeraient les cristallites de type B et les plus courtes ceux de type A (**Hizukuri et al., 1983 ; Pfannemüller, 1986 ; Buléon et al., 1984 ; Pohn et al., 2004b**).

Les résultats rapportés par différents auteurs sur la cristallisation de courtes chaînes d'amylose de DP contrôlé en solution aqueuse (**Pfannemüller, 1987 ; Gidley et Bulpin, 1987**) confirment le rôle prépondérant de la longueur des chaînes. Selon Pfannemüller, les fragments d'amylose de DP 10-13, à une concentration de 10% (p/v), forment des cristallites de type A alors que ceux de $DP\geq 13$ forment le type B, à une concentration de 2-3% dans l'eau pure. Selon Gidley et Bulpin, à une concentration de 50% (p/v) les fragments d'amylose de DP 10-14 conduisent à la formation du type A alors qu'à une concentration de 35% (p/v) le type A est obtenu pour les DP de 10 à 12 et le type C pour les DP de 13 à 14. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Hizukuri et al. (1983)** sur les résidus branchés d'hydrolyse de grains d'amidon natifs. Des chaînes d'amylose longues ou courtes favorisent respectivement la cristallisation en type B ou A (**Hizukuri, 1961 ; Hizukuri et al., 1980 ; Gidley et Bulpin, 1987**).

Les résultats de **Pohn et al. (2004b)** montrent aussi l'influence de la longueur des chaînes sur le type cristallin. Pendant l'incubation à 52°C de maltodextrines avec une enzyme de débranchement (isoamylase), en solution aqueuse concentrée (25% p/v), les chaînes cristallisent au fur et à mesure de la déramification. Les spectres de DRX des produits formés à 12 et 48 h d'incubation sont respectivement caractéristiques du type B et du type A. Selon les auteurs, la solubilité des différentes molécules, directement liée à leur longueur et taux de ramification, serait à l'origine de ce phénomène de cristallisation fractionnée. Le DP des

chaînes est plus élevé dans les cristaux formés à 12 h (supérieur à 40, $\overline{DP}_n$ du pic majoritaire égal à 31,2) que dans ceux formés à 48 h (inférieur à 40, $\overline{DP}_n$ du pic principal égal à 24,1). Les auteurs ont conclu que la quasi-totalité des longues chaînes linéaires est présente dans le premier produit et pouvait être impliquée dans les cristallites de type B. En revanche, entre 12 et 48 h, c'est la cristallisation des courtes chaînes en type A qui est fortement favorisée.

Dans notre cas, la température de nucléation (environ 58°C), la concentration (0,05% p/v) et la présence d'acétone favorisent la cristallisation des chaînes courtes en type A. Dans le cas des cristaux préparés à partir de la fraction **DLPR**, les cristallites de type B seraient formés par cristallisation des chaînes les plus longues et ramifiées alors que l'acétone n'a pas encore diffusé, tandis que les chaînes courtes, plus solubles, précipiteraient ensuite en présence d'acétone pour former le type A. Le spectre de DRX des cristaux préparés à partir de la fraction **ASP40-70** qui contient les chaînes linéaires les plus longues de notre étude, est lui-aussi de type C, ce qui va donc dans le même sens.

2.4. Influence du taux de branchement

Nous avons examiné l'influence du taux de branchement des fractions **MDR6-22**, **DLP(1)8-27**, **DLP(2)8-21** et **DLPR5-49** sur la formation des cristaux. Le Tableau VII-1 récapitule la forme, la taille et un index de cristallinité des cristaux préparés à partir de ces fractions. Une fraction synthétique linéaire, **ASA(F1)8-33**, a été ajoutée pour comparaison car elle possède une gamme de DP comparable à celle des fractions branchées.

Les fractions **MDR6-22** ($\% \alpha(1,6)=8,5\%$) et **DLP(2)8-21** ($\% \alpha(1,6)=6,1\%$) cristallisent mal (faible rendement ou nécessité d'ajouter un agent nucléant) et sous forme de particules ovoïdes et lamellaires sans que celles-ci ne se développent longitudinalement comme c'est le cas pour les cristaux fusiformes. La solubilité plus grande est sans doute due à la fois à l'existence de chaînes très courtes mais aussi par le fait que d'autres chaînes sont branchées. Avec une gamme de DP comparable, la fraction **DLP(1)8-27** ($\% \alpha(1,6)=4,8\%$) forme des cristaux fusiformes dont la forme est très similaire à celle des cristaux préparés à partir de **DLPR5-49** ($\% \alpha(1,6)=4,8\%$). La dimension axiale des agrégats lamellaires préparés avec des fractions **MDR6-22** et **DLP(2)8-21** est de l'ordre de 0,3 μm . La longueur des cristaux obtenus à partir de **DLP(1)8-27** et **DLPR5-49** est supérieure et en moyenne de 1,5 μm . La fraction synthétique linéaire **ASA(F1)8-33** permet de former des cristaux encore plus longs (3,3 μm).

Il semble donc que le taux de branchement des chaînes limite la croissance cristalline. Au-delà de 5%, il devient même un "frein" sérieux au développement de structures régulières.

Tableau VII-1 : Caractéristiques des cristaux préparés à partir des fractions **MDR**, **DLP(1)**, **DLP(2)**, **DLPR**. Comparaison avec les cristaux obtenus à partir de **ASA(F1)** et **ASA(3)14-21**. Pour les fractions **MDR** et **DLP(2)**, la "longueur" est en fait la taille des cristaux mesurée perpendiculairement aux lamelles. Les signes + permettent dévaluer la cristallinité.

Fraction (DP _{min} -DP _{max})	Taux de branchement (%)	Forme des cristaux	Longueur (μm) [écart-type (μm)]	Cristallinité	Allomorphe
MDR (6-22)	8,5	Agrégats ovoïdes Bords mal définis	0,3–0,4	+	A
DLP(2) (8-21)	6,1	Agrégats ovoïdes Bords mal définis	0,2–0,3	++	A
DLP(1) (8-27)	4,8	Plaquettes fusiformes	1,0–2,0	+++	A
DLPR (5-49)	4,4	Plaquettes fusiformes	1,0–2,0	++	C
ASA(F1) (8-33)	0	Plaquettes fusiformes Extrémité apicale plate	3,3 [0,8]	+++	A

3. LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA CRISTALLISATION

Afin de tenter de comprendre le (les) mécanisme(s) intervenant dans la formation des cristaux d'amylose A, nous avons essayé de retracer le "chemin" de la cristallisation en examinant chaque étape, en partant de la solution initiale d'amylose.

3.1. Solubilisation de l'amylose

L'eau est un mauvais solvant de l'amylose à température ambiante (**Moates *et al.*, 1997**). Le chauffage de la solution aqueuse diluée d'amylose à 150°C dissout efficacement les agrégats formés lors de la préparation des fractions (notamment la lyophilisation) puis les doubles hélices (**Creek *et al.*, 2006**). L'eau devient un bon solvant de l'amylose vers 170°C (**Moates *et al.*, 1997 ; Benczedi *et al.*, 1998**), température à laquelle les chaînes perdent toute conformation hélicoïdale. Nous considérerons donc que nos solutions de départ, après chauffage à 150°C, ne contiennent que des chaînes individuelles avec un caractère hélicoïdal peu marqué.

3.2. Formation des doubles hélices

Au cours du refroidissement de 150 à 60°C, la solution devient métastable et les chaînes d'amylose moins solubles s'associent en doubles hélices (que nous appellerons aussi "duplex") afin de minimiser l'exposition des parties hydrophobes et d'offrir une surface plus hydrophile. Si plusieurs auteurs ont étudié la dissolution de cristaux de dextrines limites (**Whittam *et al.*, 1990 ; Moates *et al.*, 1997 ; Crochet *et al.*, 2005**) ou se sont attachés à comprendre les

changements de conformation de chaînes d'amylose de haut poids moléculaire en solution concentrée ou dans des gels (**Miles *et al.*, 1985 ; Benczédi *et al.*, 1998**), à notre connaissance, la formation de doubles hélices dans des solutions diluées de courtes chaînes isolées n'a jamais été mise en évidence expérimentalement. Afin de vérifier cette hypothèse, on peut envisager de mesurer la masse des duplex par unité de longueur par diffusion de la lumière ou encore de procéder à des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles afin de distinguer, en fonction de la température, si l'espèce en présence est une chaîne simple ou un duplex. Les deux techniques ne permettraient pas, cependant, de valider l'existence d'une hélicité mais seulement l'association de deux chaînes. Ces expériences peuvent être menées dans l'eau puisque le type allomorphique B qui est lui-aussi décrit par un empilement de doubles hélices (Chap. I, § 1.1.2.3 et 3.1.2) se forme très lentement par refroidissement d'une solution aqueuse d'amylose sans ajout de précipitant (**Buléon *et al.*, 1984**).

Nous ferons donc l'hypothèse que les doubles hélices sont formées au cours de la première étape de refroidissement de la solution, avant la diffusion de précipitant, et nous considérerons que ces duplex sont les briques élémentaires de l'architecture cristalline.

3.3. Nucléation

Ajouter de l'acétone, mauvais solvant de l'amylose, dans le système revient à décaler les courbes d'équilibre $C=f(T)$ de la Figure I-24 vers le bas. La diffusion d'acétone abaisse donc la concentration critique de nucléation et la sursaturation augmente. En considérant que le réacteur est à température à peu près constante, le système entre alors dans la phase de nucléation et des germes se forment par association de duplex.

Pour ce qui est de la cristallisation des fractions d'amylose synthétique, même si les organisations cristallines et les cristaux sont très bien identifiées, il est difficile de déterminer la morphologie des germes. Les images de MEB du prélèvement effectué dans une solution de chaînes **ASA(3)14-21** en début de cristallisation montre des objets cristallins déjà parfaitement formés (Figure IV-32a). Des prélèvements effectués entre le début de la diffusion de précipitant et l'apparition de la turbidité permettraient peut-être de piéger des germes de petite taille et de les observer par MET. Quelques résultats ont néanmoins pu être obtenus à partir des cristallisations de dextrans limites et seront décrits un peu plus loin.

Comme nous l'avons rappelé au § 1.1 de ce chapitre, les organisations de monocristaux sont principalement de deux types : les rosettes et les éventails. Ces deux organisations pourraient résulter de deux modes de nucléation ou de deux types de germes. Plusieurs hypothèses peuvent être faites : i) des germes de morphologies différentes sont équiprobables;

ii) un type de germe se formerait dans la solution tandis que l'autre se développerait sur les parois du réacteur ; iii) les deux types de germes se formeraient lors d'événements de nucléation différents intervenant à différents degrés de sursaturation, par exemple dus à des fluctuations de concentration du précipitant (partition, condensation sur les parois du réacteur).

3.3.1. Les éventails

Les éventails possèdent toujours un grand cristal central autour duquel se répartissent symétriquement des cristaux de taille variable (Figures VII-1d à et VII-1f). On peut donc imaginer que ce cristal central résulte d'une nucléation primaire en milieu homogène. Les éventails sont la forme la plus fréquente en début de cristallisation, comme l'a montré le prélèvement réalisé au tout début de la cristallisation (Chap. IV, § 5.2, Figure IV-32a). En effet, la concentration initiale faible et la diffusion lente d'acétone favoriseraient la nucléation homogène de cristaux isolés. Mais les deux faces (010) de ce cristal en croissance deviennent alors des sites de nucléation hétérogène et deux autres cristaux se développent de part et d'autre du cristal primaire. Ces cristaux secondaires offrent eux aussi une nouvelle face (010) pour la nucléation hétérogène de deux autres cristaux, et ainsi de suite (Figure VII-7). La distribution de taille de cristaux d'un éventail reflèterait donc la chronologie de leur nucléation.

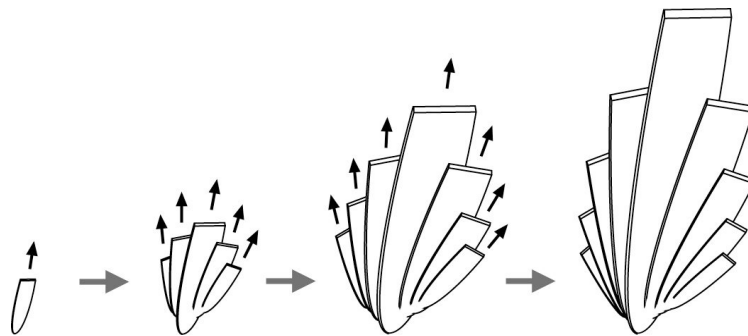


Figure VII-7 : Représentation schématisée du développement d'une organisation en éventail à partir d'un cristal unique. D'autres cristaux nucléent sur les faces (010).

On remarquera aussi que la nucléation secondaire n'intervient en général qu'une seule fois par surface (010) disponible, uniquement à la base des édifices cristallins et a donc probablement lieu tôt dans le processus. La nucléation est très favorisée en début de cristallisation mais diminue ensuite avec la sursaturation, alors que le nombre de cristaux grandit. Il reste cependant à comprendre, d'une part, l'origine de l'angle de rotation entre les grands axes des cristaux et, d'autre part, la raison de la chiralité gauche que développent ces cristaux organisés en spirale. La surface de cristaux sur laquelle la nucléation secondaire a

lieu étant constituée de doubles hélices couchées, il faudrait déterminer si des relations d'épitaixie peuvent exister et si l'adsorption d'un duplex en solution est favorable dans une direction autre que parallèle aux doubles hélices de la surface. Des calculs énergétiques d'interaction sur des surfaces modèles, tels que ceux réalisés, par exemple, par **Hanus et Mazeau (2006)** pour étudier l'adsorption de xyloglucanes sur la cellulose, pourraient sans doute nous aider à répondre à ces questions.

3.3.2. Les rosettes

Dans les rosettes, les cristaux se développent en étoile à partir d'un site de nucléation commun. Comme le montrent les images de la Figure VII-3, il est difficile d'identifier ce germe tant le contact entre les cristaux semble réduit. Il est possible que le germe ressemble à une petite rose des sables et soit déjà un polycristal faisant intervenir des macles. Dans ce cas, il offrirait plusieurs directions de croissance. On peut aussi imaginer que la rosette soit une variante de la forme en éventail si les événements de nucléation hétérogène consécutifs sont si rapprochés dans le temps que les cristaux se développent pratiquement en même temps et ont donc des tailles très proches. Les résultats de notre expérience décrivant l'influence de la concentration initiale en amylose et du mode d'addition du précipitant ont montré que les rosettes devenaient la forme dominante lorsque la concentration augmentait et/ou si le précipitant était ajouté en une seule fois (Chap. IV, § 5.2). En s'appuyant sur le diagramme $C=f(T)$ de la Figure I-24, on voit qu'aussi bien une concentration de départ élevée qu'un grand décalage des courbes d'équilibre vers le bas résultant à ajout rapide de précipitant génèrent une sursaturation plus élevée. Cette "force motrice" de la cristallisation plus grande favorisera la nucléation primaire, augmentant le nombre de germes, mais aussi la nucléation secondaire, de nouveaux cristaux se développant rapidement à partir des surfaces cristallines formées.

3.3.3. Cas des dextrines limites

Dans le cas de la cristallisation des dextrines limites de pois ridé (**DLPR5-49**) et de pomme de terre (**DLP(2)8-21**), les images de MEB des Figures IV-1 et IV-2 ont montré l'existence d'organisation de cristaux fusiformes. A plus petite échelle, l'examen des images de MET d'échantillons colorés négativement permet de proposer quelques pistes quant à la nature des germes. Dans les deux échantillons, il existe clairement des réseaux irréguliers (Figures VII-8 et VII-9) évoquant parfois ceux formés par recristallisation (ou "rétrogradation") d'amylose de plus haute masse moléculaire (**Putaux et al., 2001**). Ces

réseaux semblent constitués de cristallites de 20-30 nm pour **DLPR** et 10-15 nm pour **DLP(2)**. On distingue des objets plus allongés, "attachés" à certains cristallites (Figure VII-9). Ils semblent formés de lamelles perpendiculaires à leur grand axe. Dans le cas de la fraction **DLP(2)**, on reconnaît sans peine la forme caractéristique des cristaux en ogive dont l'extrémité la plus pointue est reliée au réseau de cristallites. Sur l'image de la Figure VII-9a, on voit clairement que plusieurs cristaux allongés sont reliés à un même réseau. Les cristaux préparés par Pohn *et al.* à partir de dextrines limites de pomme de terre montrent aussi une structure lamellaire et semblent également reliés à des réseaux mal définis (Figure VII-10, **Pohn *et al.*, 2004a**, image non-publiée). Ces réseaux pourraient se former rapidement par cristallisation des chaînes les plus longues (et donc les moins solubles) sous la forme de petits cristallites. Ceux-ci ne pourraient pas croître mais serviraient de germes pour cristalliser les chaînes les plus courtes sous forme d'ogives.

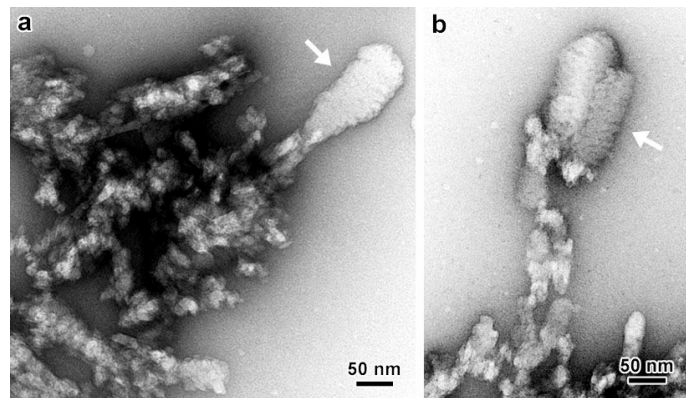


Figure VII-8 : Images de MET de formes cristallisées de la fraction **DLPR** (coloration négative). Les flèches blanches pointent vers de petits cristaux en ogive émergeant des réseaux de cristallites. Ils présentent clairement une organisation lamellaire.

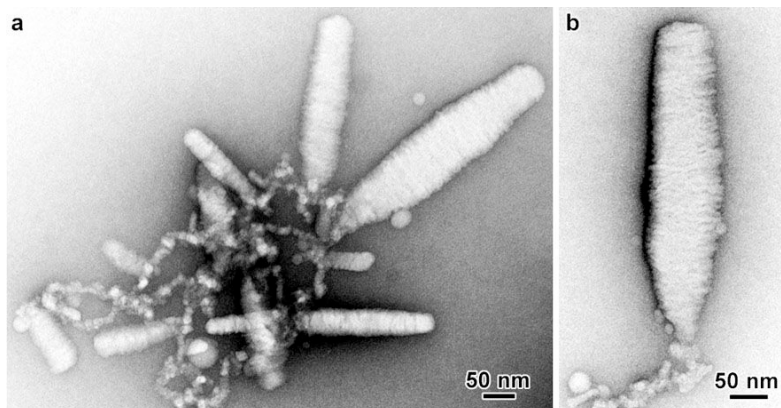


Figure VII-9 : Images de MET de cristaux formés à partir de dextrines de pomme de terre (fraction **DLP(2)**). L'échantillon a été coloré négativement.

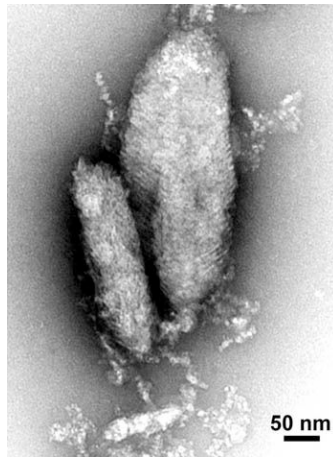


Figure VII-10 : Image de MET de cristaux formés à partir de dextrines de pomme de terre (Pohu *et al.*, 2004a, image non publiée). L'échantillon a été coloré négativement.

3.4. Croissance

Les germes croissent dès qu'ils ont atteint leur taille critique et la croissance se poursuit tant que le milieu reste sursaturé. Les cristaux préparés à partir d'un grand nombre des fractions utilisées dans cette étude sont des plaquettes allongées dont la section est un parallélogramme aplati (Figure VI-17). Ils se développent donc plus en longueur qu'en largeur et en épaisseur. Comme l'ont montré les résultats de l'expérience durant laquelle nous avons observé les cristaux prélevés à différents temps (Chap. IV, § 4), la largeur se stabilise dès les premiers stades (Figure VI-34) tandis que la longueur augmente jusqu'à épuisement de l'amylose. Nous pouvons faire la même constatation en comparant les cristaux préparés à différentes températures (Chap. VI, § 5.1). La largeur est pratiquement constante tandis que la longueur croît très nettement avec la température, ce qui conduit à une morphologie en aiguille (Figure IV-37).

3.4.1. Croissance latérale

Pour que les lamelles croissent latéralement, les duplex doivent venir se placer sur les faces (100) et (010), parallèlement aux autres doubles hélices. La largeur des cristaux étant supérieure à l'épaisseur, l'adsorption des duplex est donc plus favorable sur la face (100). Pour essayer de comprendre d'où venait cette différence, Karim Mazeau (CERMAV) a réalisé un calcul préliminaire dont le principe est schématisé sur la Figure VII-8. Des doubles hélices ont été placées en position cristallographique sur l'une des faces d'un "mini-cristal" monoclinique d'amylose A contenant 6 doubles hélices (Figure VII-11). L'énergie du système a été calculée et comparée dans les différents cas. Deux positions ont été testées, indiquées par A et B. Il ressort que la position B sur la face (100) conduit à une énergie inférieure, ce qui est en accord avec le fait que cette face croît plus vite dans la direction *a*. Ceci pourrait s'expliquer

par le fait que le décalage de $c/2$ selon c de la double hélice B permet à celle-ci d'être plus proche des ses deux voisines, ce qui conduit à un empilement plus dense.

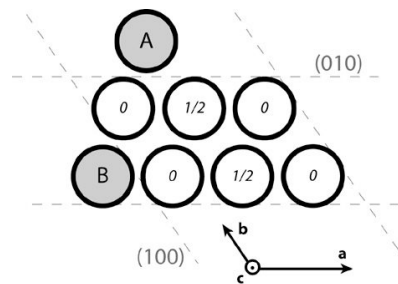


Figure VII-11 : Vue selon l'axe c de la maille monoclinique de l'amylose A. Les cercles symbolisent les doubles hélices et leur décalage dans la maille est indiqué au centre. Les duplex A ou B ont été ajoutés et l'énergie des deux systèmes résultants a été calculée.

La comparaison des cristaux préparés à partir de différentes fractions d'amylose synthétique (Chap. IV) montre que la largeur moyenne est généralement de l'ordre de $1\ \mu\text{m}$. L'épaisseur est plus variable mais elle oscille en moyenne autour de $200\ \text{nm}$. Ces valeurs constitueraient donc les dimensions d'équilibre des faces (100) et (010).

3.4.2. Croissance longitudinale

Le fait que la croissance des cristaux se poursuit axialement conduit à penser que la face (001) est moins stable. On peut en effet considérer que la face (001) possède une certaine "rugosité" qui a deux origines (Figure VII-12) :

- les doubles hélices en position cristallographique dans la maille monoclinique sont alternativement décalées de $+c/2$ et $-c/2$ selon l'axe c (Chap. VI, § 1.4) (**Imberty et al., 1988 ; Popov et al., 2008**) ;
- les fractions sont polydisperses ce qui implique que les lamelles sont constituées de duplex de longueur différente et dont les deux "brins" peuvent aussi être inégaux.

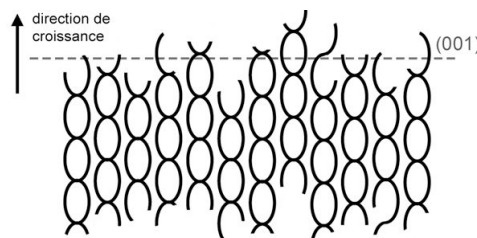


Figure VII-12 : Coupe schématique d'une lamelle cristalline montrant l'organisation parallèle des doubles hélices. La surface (001) est "rugueuse" à cause du décalage des hélices dans la maille le long de c et de la polydispersité des chaînes.

Selon les deux mécanismes formalisés par **Burton et al. (1951)**, la croissance axiale des cristaux par ajout de couches successives sur la face (001) peut se faire par :

- nucléation bidimensionnelle : plusieurs germes se forment sur la surface, croissent dans le plan et "coalescent" pour former des lamelles complètes (Figure VII-13a).

- propagation d'une spirale de croissance. C'est le mécanisme le plus fréquemment rencontré car il s'appuie sur les défauts souvent présents sur les surfaces cristallines (**Puel et al., 2005**). Les lamelles se développent et se superposent grâce au mouvement tournant d'une dislocation vis (Figure VII-13b).

Il nous est difficile de valider l'un ou l'autre de ces mécanismes pour la croissance des cristaux d'amylose A. Des images de MEB-FEG d'échantillons métallisés (Figure VI-11) ou de MET de spécimens colorés (Figure VI-12) nous ont permis d'observer des détails sur l'empilement latéral des lamelles. Les faces apicales n'ont pu être observées que par MEB. Si la résolution des images de MEB conventionnelle est insuffisante pour déterminer la structure des surfaces, les images de MEB-FEG ont permis de distinguer la rugosité de la face apicale (Figure VI-2). Néanmoins, nous n'avons pas observé de défauts caractéristiques permettant d'identifier le mécanisme de développement des lamelles. La déshydratation de l'échantillon sous vide et après la métallisation entraînent probablement une dégradation de la surface.

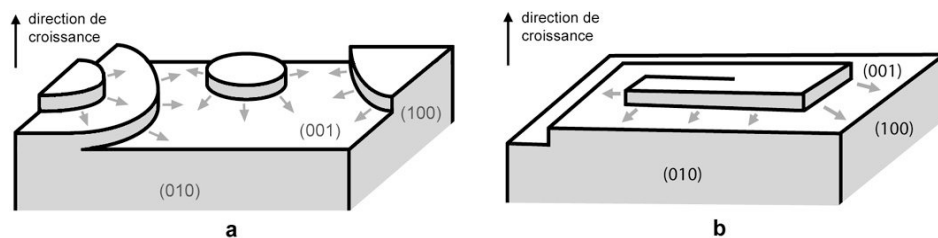


Figure VII-13 : Schémas des possibles mécanismes de croissance de lamelles sur la face (001) : a) germination bidimensionnelle (les fronts de croissance ont été arrondis pour simplifier) (adapté de **Boistelle et Astier, 1988**) ; b) propagation spiralee d'une dislocation vis.

3.4.3. Forme de l'extrémité apicale

Si la section des cristaux ayant une forme géométrique bien marquée est toujours un parallélogramme aplati, nous avons observé différentes formes pour les extrémités apicales : plates, arrondies ou coniques (Figure VII-3). D'une part, comme nous l'avons évoqué aux § 1 et 2.1, cette forme semble bien corrélée à la gamme de DP des fractions utilisées (Figure VII-4). D'autre part, elle est aussi révélatrice de la dernière étape de la cristallisation, alors que la sursaturation diminue et qu'on s'approche de la concentration d'équilibre.

Selon le modèle de croissance lamellaire que nous avons décrit, la forme dépendrait de la distribution de largeur des lamelles empilées (Figure VII-14). On peut tout d'abord imaginer que la vitesse de croissance latérale varie avec la taille des molécules, la tendance étant que des molécules plus petites (des duplex plus courts) s'adsorbent et s'orientent plus rapidement sur le front de croissance. Cela va dans le sens de nos observations (apex plat pour la fraction de DP 12-23, arrondi pour un DP 20-29 et conique pour un DP 23-33), excepté pour ce qui est des fractions les plus courtes dont les cristaux sont pointus. Par ailleurs, **Holmes *et al.* (1992)** ont expliqué la forme paraboloidale de "fibrilles" hélicoïdales de collagène préparées *in vitro* par une variation de l'accrétion (ajout de matière par unité de surface) en fonction du diamètre de l'objet fusiforme. Dans ce cas, l'accrétion serait proportionnelle à l'inverse du diamètre.



Figure VII-14 : Empilements de lamelles décrivant les différentes formes de l'extrémité apicale des cristaux.

4. CONCLUSION

Nous avons débuté ce chapitre en récapitulant les principaux types morphologiques décrivant les organisations cristallines mais aussi des cristaux qui les composent. En nous appuyant sur les résultats présentés dans les Chapitres IV et V, nous avons dégagé quelques tendances pour comprendre l'influence de certaines caractéristiques moléculaires des fractions (DP moyen, polydispersité, taux de branchement) sur la morphologie et la structure des organisations cristallines. En nous appuyant aussi sur l'analyse cristallographique présentée au Chapitre VI, ces résultats nous ont permis d'aborder la cristallogénèse de l'amylose A en termes de mécanismes de nucléation et de croissance en solution diluée, conduisant à la formation de cristaux aux morphologies inhabituelles dans le monde des polymères.

Si notre analyse s'est principalement focalisée sur les cristaux aux formes géométriques bien identifiées, il est vrai qu'il a été plus difficile d'expliquer les cas "extrêmes" de la gamme d'échantillons étudiée. C'est plus particulièrement le cas pour les produits obtenus à partir des fractions les plus longues qui forment des réseaux de petits cristallites difficiles à étudier par MET ou diffraction électronique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Différentes fractions de courtes chaînes d'amylose, dont les caractéristiques moléculaires se rapprochent de celles des courtes branches de l'amylopectine, ont été préparées par hydrolyse acide et enzymatique d'amidon natif et par synthèse enzymatique *in vitro*. Ces fractions faiblement branchées (polydisperses) ou parfaitement linéaires (peu polydisperses) ont été cristallisées à partir de solutions aqueuses diluées par diffusion d'un précipitant. Le réacteur mis au point nous a permis d'étudier l'influence de certains paramètres opératoires, tels que la température de cristallisation, la cinétique de refroidissement, le mode d'ajout du précipitant ou encore la présence de substrats inductifs. Pour chaque fraction, nous avons déterminé la morphologie, les dimensions et le type allomorphe des cristaux formés, en utilisant des techniques complémentaires d'imagerie optique ou électronique et de diffraction des rayons X ou des électrons.

En milieu homogène, deux grands types d'organisations cristallines ont été observées (les "rosettes" et les "éventails"), dont la proportion semble dépendre principalement du temps de cristallisation et de la concentration initiale en amylose. Ces assemblages sont généralement constitués de cristaux oblongs de quelques μm de long dont l'extrémité apicale peut être plate, arrondie ou conique en fonction du DP moyen de la fraction utilisée. Lorsqu'elle est identifiable, la section transverse des cristaux est un parallélogramme aplati dont l'angle obtus moyen est proche de 120° , en bon accord avec l'angle γ de la maille monoclinique de l'allomorphe A. Les cristaux apparaissent constitués de lamelles élémentaires perpendiculaires à la direction de croissance et dont l'épaisseur est du même ordre que la longueur des doubles hélices formées par les courtes chaînes d'amylose.

La structure moléculaire des chaînes d' α -glucanes est un paramètre important à prendre en compte lors de la cristallisation. Un DP moyen compris entre 15 et 19 et une faible polydispersité sont nécessaires pour obtenir des cristaux de longueur supérieure à 5 μm . Les cristaux préparés à partir de fractions synthétiques forment globalement des cristaux plus longs que ceux préparés à partir de dextrines limites. La présence de points de branchement influence donc la morphologie cristalline. Un taux de ramification élevé ($>5\%$) limite la croissance axiale des cristaux à une taille d'environ 300 nm.

Les cristaux préparés à partir de fractions de DP inférieur à 40 ont un diagramme de diffraction des rayons X de type A tandis que les fractions contenant des chaînes plus longues présentent un spectre de type C, typique d'un mélange des deux allomorphes A et B. Ce résultat corrobore les données de la littérature sur l'influence de la longueur de chaîne sur le type

allomorphique formé *in vitro*, les chaînes les plus longues cristallisant sous la forme B. D'autre part, pour un DP moyen dépassant 40, les molécules ne forment plus d'organisations de monocristaux mais plutôt des réseaux irréguliers de cristallites de quelques dizaines de nm.

Les cristaux d'amylose A présentés dans cette étude figurent parmi les plus grands monocristaux de polysaccharides jamais préparés *in vitro*. Grâce à eux, la structure cristalline d'un polymère a été résolue pour la première fois par microdiffraction des rayons X à l'ESRF à partir de monocristaux de taille micrométrique. Ces résultats combinés à ceux recueillis par diffraction électronique ont permis d'orienter la maille monoclinique par rapport à la géométrie des cristaux et d'indexer leur faces cristallines. En particulier, nous avons déterminé que l'extrémité réductrice des chaînes d'amylose était orientée dans le sens de la croissance cristalline.

La largeur et l'épaisseur des cristaux semblent atteindre assez rapidement une valeur d'équilibre tandis que la croissance se poursuit longitudinalement. Ceci suggère que la face (001), perpendiculaire à l'axe *c* et donc aux doubles hélices, est moins stable. L'allongement des cristaux pourrait donc être contrôlé par la propagation spiralée d'une (de) dislocation(s) vis.

Nous avons introduit dans le réacteur un agent nucléant (whiskers de cellulose) ou des surfaces (lames de verre ou de mica) afin d'induire la cristallisation de fractions très solubles ou de modifier les conditions de nucléation et de croissance des cristaux d'amylose et donc leur morphologie. Les fractions synthétiques forment toujours des cristaux allongés dont la taille varie néanmoins avec le type de substrat. Les dextrines partiellement branchées forment des assemblages en "shish-kebabs" autour des whiskers de cellulose. Les cristaux présentent une organisation lamellaire irrégulière perpendiculaire au substrat mais se développent très peu longitudinalement.

De manière générale, la morphologie des plaquettes monocristallines de plusieurs μm de long préparées *in vitro* à partir des fractions d'amylose synthétique est très éloignée de celle des cristallites isolés à partir de grains d'amidon natif hydrolysé. Il existe cependant deux points communs : la forme de la section transverse des plaquettes ogivales (perpendiculaire aux doubles hélices) et celle des cristallites issues d'amidon natif de type A ont été bien corrélées à l'organisation des doubles hélices dans le plan (*a,b*) de la maille monoclinique de l'allomorphe A. D'autre part, tout comme les courtes branches de l'amylopectine, les chaînes d'amylose de faible DP tendent à former des lamelles. Dans l'amidon natif, la distribution spécifique des points de branchement et l'organisation en grappes de l'amylopectine imposent l'organisation lamellaire des courtes chaînes constituant les branches. *In vitro*, la linéarité et la faible polydispersité des courtes chaînes favorisent la croissance de cristaux micrométriques

tandis que les fractions faiblement branchées forment des objets dont l'organisation lamellaire irrégulière évoque celle de l'amidon natif. Le rôle des points de branchement semble donc crucial dans l'établissement d'une architecture cristalline.

A l'issue de ce travail, les cristaux d'amylose A apparaissent comme des objets assez inhabituels dans le domaine des polymères. Nous n'avons pas trouvé d'exemple comparable de cristal micrométrique en forme de plaquette allongée dont les chaînes seraient parallèles au grand axe du cristal. Il faut remarquer que, compte tenu de la gamme de DP étudiée, les chaînes d'amylose sont plutôt courtes par rapport aux chaînes de polymère habituellement utilisées pour préparer des cristaux lamellaires (qui font intervenir des repliements de chaîne). A l'inverse, ces chaînes sont plutôt longues pour que l'on puisse les considérer comme des oligomères et entrer dans le cadre de la cristallisation de "petites molécules". Il reste cependant à mieux comprendre les raisons conduisant à cette morphologie particulière et la modélisation moléculaire est un outil complémentaire à mettre en œuvre. D'autre part, si la polarité moléculaire des cristaux déduite de l'analyse cristallographique et de la modélisation semble être une propriété rare, elle reste à valider expérimentalement.

Il serait aussi intéressant de comprendre si la chiralité gauche de la torsion observée sur des monocristaux (parfois) et des organisations cristallines hélicoïdales (quasi-systématiquement) est une expression de la chiralité moléculaire de l'amylose à une échelle microscopique.

Un certain nombre d'expériences ont conduit à la formation de morphologies cristallines étonnantes et difficiles à "ranger" dans notre classification. Nous avons montré l'exemple de cristaux particulièrement longs avec une extrémité apicale creuse en forme de queue d'hirondelle mais d'autres cas tout aussi "exotiques" n'ont pas été présentés. Même si ces expériences n'ont pas été reproduites, les résultats laissent entrevoir une richesse morphologique dont l'exploration passe certainement par une instrumentation plus précise du réacteur de cristallisation.

L'objectif de modifier la morphologie des cristaux d'amylose A en utilisant des surfaces inductives pour encourager le développement d'une structure lamellaire étendue latéralement et avec l'axe de chaîne normal au plan de la lamelle n'a pas été atteint. Néanmoins, nous considérons les essais réalisés sur du mica ou du verre comme préliminaires et il conviendra de réfléchir à la nature du substrat et aux conditions environnementales pour encourager l'orientation, voire l'épitaxie.

Par ailleurs, il serait intéressant de développer des systèmes modèles de cristallisation en environnement confiné. Le confinement pourrait être abordé en travaillant à des concentrations plus élevées que celles habituellement utilisées pour la cristallisation des polysaccharides. Ces expériences pourraient être effectuées à partir de solutions ou dans des gels mais aussi en induisant l'agrégation des courtes chaînes d'amylose par déshydratation dans des couches multilamellaires de phospholipides et les fameuses phases "oignons", par dialyse contre du polyéthylène glycol.

Enfin, si notre travail s'est focalisé sur les monocristaux d'amylose A dont la préparation est relativement simple, il est indispensable de se pencher sur le cas de l'amylose B dont l'étude structurale a été principalement menée sur des poudres polycristallines ou des fibres. La raison de l'extrême difficulté d'en préparer des monocristaux par cristallisation *in vitro* (une seule étude rapportée dans la littérature !) reste assez mystérieuse, alors que ce type cristallin est tout aussi répandu que le type A dans l'amidon natif.

La poursuite de l'étude des organisations cristallines de l'amylose de faible DP et sous forme de doubles hélices passera certainement par des collaborations multidisciplinaires avec des chercheurs issus des domaines de la cristallogénèse des polymères synthétiques, des biopolymères mais aussi des minéraux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albenne C., Skov L.K., Mirza O., Gajhede M., Feller G., D'Amico S., André G., Potocki-Véronèse G., van der Veen B.A., Monsan, P. et Remaud-Simeon M. (2004). Molecular basis of the amylose-like polymer formation catalyzed by *Neisseria polysaccharea* amylase. *J. Biol. Chem.* **279**(1), 726-734.
- André I., Mazeau K., Tvaroska I., Putaux J.L., Winter W.T., Taravel F., Chanzy H. (1996). Molecular and crystal structures of inulin from electron diffraction data. *Macromolecules* **29**(13), 4626-4635.
- Angellier H., Choinsard L., Molina-Boisseau S., Ozil P. and Dufresne A. (2004). Optimisation of the preparation of aqueous suspensions of waxy maize starch nanocrystals using a response surface methodology. *Biomacromolecules* **5**, 1545-1551.
- Ball S., Guan H.P., James M., Myers A., Keeling P., Mouille G., Buléon A., Colonna P., Preiss J. (1996). From glycogen to amylopectin: a model explaining the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**, 349-352.
- Banks W. et Greenwood C.T. (1975). Starch and its components. Edinburgh University Press. Edinburgh.
- Bassett D.C. et Vaughan A.S. (1986). Reply to a discussion of spherulitic crystallization and morphology. *Polymer* **27**(9), 1472-1476.
- Battista O.A. et Smith P.A. (1962). Microcrystalline cellulose. *J. Ind. Eng. Chem. (Washington, D. C.)* **54**, 20-29.
- Bayer R.K. et Baltà Calleja F.J. (2005). Comment on the structure of amorphous starch as derived from precursors of crystallization: the role of the entanglement network. *J. Macromol. Sci., Phys.* **44**, 471-479.
- Benczedi D., Tomka I. et Escher F. (1998). Thermodynamics of amorphous starch-water systems. 1. Volume Fluctuations. *Macromolecules* **31**(9), 3055-3061.
- Bentivoglio M. (1927). Investigation of the rate of growth of crystals in different directions. *Proc. Roy. Soc. London, Series A: Math, Phys. Engineer. Sci.* **115**, 59-87.
- Bernazzani P., Chapados C. et Delmas G. (2000). Double-helical network in amylose as seen by slow calorimetry and FTIR. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **38**, 1662-1677.
- Bernazzani P., Chapados C. et Delmas G. (2001). Phase change in amylose-water mixtures as seen by Fourier transform infrared. *Biopolymers* **58**, 305-318.
- Bertoft E. (1991). Investigation of the fine structure of alpha-dextrins derived from amylopectin and their relation to the structure of waxy-maize starch. *Carbohydr. Res.* **212**, 229-244.
- Bertoft E. (2004). Lintnerisation of two amylose-free starches of A- and B-crystalline types, respectively. *Starch/Stärke* **56**(5), 167-180.
- Biliaderis C.G., Grant D.R. et Vose J.R. (1981). Structural characterization of legume starches. I. Studies on amylose, amylopectin, and β -limit dextrins. *Cereal Chem.* **58**(6), 496-502.
- Biliaderis C.G., Grant D.R. et Vose J.R. (1981). Structural characterization of legume starches. II. Studies on acid-treated starches. *Cereal Chem.* **58**(6), 502-507.
- Blanshard J.M.V. (1987). Starch granule structure and function: a physicochemical approach. *Crit. Rep. Appl. Chem.* **13**, 16-54.
- Blundell, D. J., Keller, A., Kovacs, A. J. (1966). A new self-nucleation phenomenon and its application to the growing of polymer crystals from solution. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Lett Ed.* **4**, 481-486.
- Bock, K., Pedersen, C. et Pedersen, H. (1984). Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biol.* **42**, 193-225.
- Boistelle R. et Astier J.P. (1988). Crystallization mechanism in solution. *J. Cryst. Growth* **90**, 14-30.
- Booy F.P., Chanzy H. et Sarko A. (1979). An electron diffraction study of single crystals of amylose complexed with *n*-butanol. *Biopolymers* **18**, 2261-2266.

- Binsbergen, F.L. (1973).** Heterogeneous nucleation in the crystallization of polyolefins. III. Theory and mechanism. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **11**(1), 117-135
- Brisson J., Chanzy H. et Winter W.T. (1991).** The crystal and molecular structure of V_h amylose by electron diffraction analysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 31-39.
- Brückner S., Allegra G., Pegoraro M. et La Mantia F.P. (2001).** Scienza e tecnologia dei materiali polimerici. EdiSES s.r.l., Naples.
- Buléon A., Chanzy, H. et Roche, E. (1976).** Epitaxial crystallization of cellulose II on *Valonia* cellulose. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **14**, 1913-1916.
- Buléon A. et Chanzy H. (1978).** Single crystals of cellulose II. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **16**, 833-839.
- Buléon A. et Chanzy H. (1980).** Single crystals of cellulose IV_{II}: preparation and properties *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **18**, 1209-1217.
- Buléon A. et Tran V. (1990).** Systematic conformational search for the branching point of amylopectin. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 345-352.
- Buléon A., Chanzy H. et Roche E. (1977).** Shish kebab-like structures of cellulose. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Lett.* **15**(5), 265-270.
- Buléon A., Véronèse G. et Putaux J.L. (2007).** Self-association and crystallization of amylose. *Aust. J. Chem.* **60**, 706-718.
- Buléon A., Bizot H., Delage M.M. et Multon J.L. (1982).** Evolution of the crystallinity and specific gravity of potato starch versus water adsorption and desorption. *Starch/Stärke* **34**, 361-366.
- Buléon A., Duprat F., Booy F.P. et Chanzy H. (1984).** Single crystal of amylose with a low degree of polymerisation. *Carbohydr. Polym.* **4**, 461-482.
- Buléon A., Bizot H., Delage M.M. et Pontoire B. (1987).** Comparison of X-ray diffraction pattern and sorption properties of the hydrolysed starches of potatoes, wrinkled and smooth pea, broad bean and wheat. *Carbohydr. Polym.* **7**, 161-173.
- Buléon A., Colonna P., Planchot V. et Ball S. (1998).** Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**(2), 85-112.
- Burton W.K., Cabrera N. et Frank C.F. (1951).** The growth of crystals and the equilibrium structure of their surfaces. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. A, Math. Phys. Sci.* **243**(866), 299-358.
- Büttcher, V., Welsh, T., Willmitzer, L. et Kossmann, J. (1997).** Cloning and characterization of the gene for amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* : production of a linear α -1,4-glucan. *J. Bacteriol.* **179**, 3324-3330.
- Cameron R.E. et Donald A.M. (1993).** A small-angle X-ray scattering study of starch gelatinization in excess and limiting water. *J. of Polym. Sci. Part. B Polym. Phys.* **31**, 1197-1203.
- Cardoso M.B. (2007).** De l'amidon de riz aux cristaux d'amylose : extraction alcaline de l'amidon de riz, propriétés de l'amylose en solution et structure de complexes d'inclusion de l'amylose V. Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier, Grenoble.
- Cardoso M.B., Putaux J.L., Nishiyama Y., Helbert W., Hytch M., Silveira N.P., Chanzy H. (2007).** Single crystal of V-amylose complexed with α -naphthol. *Biomacromolecules* **8**(4), 1319-1326.
- Carothers W.H. (1940).** Collected papers on polymerization. Eds Mark H., Whitby G.S., Interscience Publishers, New York.
- Cartier N, Domard A. et Chanzy H. (1990).** Single crystals of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 289-294.
- Chanzy H. (1990).** Aspects of cellulose structure. Dans "Cellulose Sources and Exploitation. Industrial Utilization Biotechnology", Eds J.F. Kennedy, G.O. Phillips & P.A. Williams, Prentice Hall, pp 3-12.
- Chanzy H., Dubé M. et Marchessault R.H. (1979).** Structural polymorphism of (1,4)- β -D-xylan. *Polymer* **20**, 1037-1039.

- Chanzy H. et Vuong R. (1985).** Ultrastructure and morphology of crystalline polysaccharides. Dans "Polysaccharides. Ultrastructure and Morphology". Mac Millan Press, pp 41-71.
- Chanzy H., Dube M. et Marchessault R.H. (1978).** Shish-kebab morphology. Oriented recrystallization of mannan on cellulose. *Tappi J.* **61**(7), 81-82.
- Chanzy H., Pérez S., Miller D.P., Paradossi G., Winter W. (1987).** An electron diffraction study of the mannan I crystal and molecular structure. *Macromolecules* **20**, 2407-2413.
- Charlson A., Gorin P. et Perlin A. (1956).** The configuration of glycosidic linkages in oligosaccharides. II By degradation of reducing disaccharides to 2-o-glycosyl-glycerol. *Can. J. Chem.* **34**, 1811-1818.
- Cheetham N.W.H. et Tao L. (1998).** Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydr. Polym.* **36**, 277-284.
- Chrétiennot-Dinet M.J., Giraud-Guille M.M., Vaultot D., Putaux J.L., Saito Y. et Chanzy H. (1997).** The chitinous nature of filaments ejected by *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* **33**, 666-672.
- Cleven R., van der Berg C. et van der Plas L. (1978).** Crystal structure of hydrated potato starch. *Starch/Stärke* **30**, 223-238.
- Colonna P. et Buléon A. (1992).** New insights on starch structure and properties. Proc. 9th International Cereal and Bread Congress, Paris, pp 25-42.
- Colonna P., Gallant D. et Mercier C. (1981).** *Pisum sativum* and *Vicia faba* carbohydrates: studies of fractions obtained after dry and wet protein extraction processes. *J. Food Sci.* **45**, 1629-1639.
- Colonna P., Buléon A. et Mercier C. (1981).** *Pisum sativum* and *Vicia faba* carbohydrates: structural studies of starches. *J. Food Sci.* **46**, 88-93.
- Colonna P., Buléon A., Lemaguer M. et Mercier C. (1982).** *Pisum Sativum* and *Vicia Faba* carbohydrates: part IV - Granular structure of wrinkled pea starch. *Carbohydr. Polym.* **2**, 43-59.
- Creek J.A., Ziegler G.R. et Runt J. (2006).** Amylose crystallization from concentrated aqueous solution. *Biomacromolecules* **7**(3), 761-770.
- Crochet P., Beauxis-Lagrange T., Noel T.R., Parker R. et Ring S.G. (2005).** Starch crystal solubility and starch granule gelatinisation. *Carbohydr. Res.* **340**, 107-113.
- Dabernat H., Delmas C.F., Riou J.Y. et Lareng M.B. (1985).** Sensibilité de *Neisseria polysaccharea* aux antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur / Microbiol.* **136A**, 233-239
- de Saussure T. (1814).** Sur la conversion de l'amidon. *Bull. Pharm.* **6**, 499-504.
- Donald A.M., Lisa Kato P., Perry P.A. et Waigh T.A. (2001).** Scattering studies of the internal structure of starch granules. *Starch/Stärke* **53**, 504-512.
- Dorel S. (2000).** Nanostructuration de la muscovite : Une étude par diffraction d'électrons lents en mode oscillant. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris-Sud.
- Duprat F., Gallant D., Guilbot A., Mercier C. et Robin J.P. (1980).** L'amidon. Dans "Les Polymères Végétaux", Eds Montier et Gauthier-Villars, pp 176-231.
- Emond S., Mondeil S., Jaziri K., André I., Monsan P., Remaud-Siméon M. et Potocki-Véronèse G. (2008).** Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**, 25-32.
- Elazzouzi-Hafraoui S., Nishiyama Y., Putaux J.L., Dubreuil F. et Rochas C. (2008).** The shape and size distribution of crystalline nanoparticles from acid-hydrolyzed native cellulose. *Biomacromolecules* **9**, 57-65.
- Faijes M., Imai T., Bulone V. et Planas A. (2004).** *In vitro* synthesis of a crystalline (1-3,1-4)- β -D-glucan by a mutated (1-3,1-4)- α -D-glucanase from *Bacillus*. *Biochem. J.* **380**, 635-341.
- Flory P.J. (1949).** Statistical mechanics of dilute polymer solutions. *J. Chem. Phys.* **17**, 1347-1348.
- Flory P.J. (1953).** Principles of Polymer Chemistry. Cornell University Press.

- Flory P.J. (1962).** On the Morphology of the Crystalline State in Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2837
- French D. (1972).** Fine structure of starch and its relationship to the organisation of starch granules. *J. Jap. Soc. Starch Sci.* **19**(1), 8-25.
- French A.D. (1984).** Organisation of the starch granules. Dans "Starch: Chemistry and Technology", Eds R.L. Whistler, J.N. Bemiller et E.F. Paschall, pp 183-247.
- Gaill F., Persson J., Sugiyama J., Vuong R. et Chanzy H. (1992).** The chitin system in the tubes of deep sea hydrothermal vent worms. *J. Struct. Biol.* **109**, 116-128.
- Gallant D. (1974).** Contribution à l'étude de la structure et de l'ultrastructure du grain d'amidon, Thèse de Doctorat, Université Paris VI, Paris.
- Gallant D. et Guilbot A. (1969).** Etude de l'ultrastructure du grain d'amidon à l'aide de nouvelles méthodes de préparation en microscopie électronique. *Starch/Stärke* **21**, 156-163
- Gallant D., Bouchet B., Buléon A. et Perez, S. (1992).** Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur. J. Clin. Nutr.* **46**, S3-S16
- Gallant D., Bouchet B. et Baldwin P.M. (1997).** Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organisation. *Carbohydr. Polym.* **32**(4), 177-191.
- Galliard T. et Bowler P. (1987).** Morphology and composition of starch. *Crit. Rep. Appl. Chem.* **13**, 55-78.
- Geil P.H. (1963).** "Polymer Single Crystals", Chapitre V, Wiley Intersciences Ed., New York.
- Gérard C., Planchot V., Colonna P. et Bertoft E. (2000).** Relationship between branching density and crystalline structure of A- and B-type maize mutant starches. *Carbohydr. Res.* **326**(2), 130-144.
- Gérard C., Planchot V., Buléon A. et Colonna P. (2001).** Amylolysis of maize mutant starches. *J. Sci. Food Agric.* **81**, 1281-1287.
- Gérard C., Colonna P., Buléon A. et Planchot V. (2002).** Order in maize mutant starches revealed by mild acid hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* **48**(2), 131-141.
- Gernat C., Radosta S., Anger H. et Damaschung G. (1993).** Crystalline parts of three different conformations detected in native and enzymatically degraded starches. *Starch/Stärke* **45**, 309-314
- Gessler K., Usón I., Takaha T., Krauss N., Smith S.S., Okada S., Sheldrick G.M. et Saenger W. (1999).** V-Amylose at atomic resolution: X-ray structure of a cycloamylose with 26 glucose residues (cyclomaltohexaicosaoase). *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **96**, 4246-4251.
- Gidley M.J. et Bociek S.M. (1985).** Molecular organisation in starches: a ^{13}C CP/MAS NMR study. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7040-7044.
- Gidley M.J. et Bulpin P.V. (1987).** Crystallisation of malto-oligosaccharides as models of the crystalline forms of starch: minimum chain-length requirement for the formation of the double hélices. *Carbohydr. Res.* **161**, 291-300.
- Gidley M.J. et Bulpin P.V. (1989).** Aggregation of amylose in aqueous systems: the effect of chain length on phase behavior and aggregation kinetics. *Macromolecules* **22**, 341-346.
- Giraud-Guille (1984).** Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle. *Tissue Cell.* **16**(1), 75-92.
- Gobeaux F., Mosser G., Anglo A., Panine P., Davidson P., Giraud-Guille M.M., Belamie E. (2008).** Fibrillogenesis in dense collagen solutions: a physicochemical study. *J. Mol. Biol.* **376**, 1509-1522.
- Godet M., Tran V., Delage M.M. et Buléon A. (1993).** Molecular modeling of the specific interactions involved in the amylose complexation by fatty acids. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 11-16.
- Gorham P.R. et Colvin J.R. (1957).** Cellulose deposition in elongation epidermal cells of avena coleoptiles. *Experimental Cell Res.* **13**, 187-189

- Gourgues-Lorenzon A.F. et Haudin J.M. (2006).** Matériaux pour l'ingénieur. Les Presses, Mines de Paris.
- Gray D.G. (1974).** Polypropylene transcrystallization at the surface of cellulose fibers. *Polym. Lett.* **12**, 509-515.
- Guibourdenche M., Popoff M.Y. et Riou J.Y. (1986).** Deoxyribonucleic acid relatedness among *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. cinerea* and *N. polysaccharea*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **137B**, 177-185.
- Guizard C., Chanzy H., Sarko A. (1984).** Molecular and crystal structure of dextrans: a combined electron and X-ray diffraction study. 1. The anhydrous, high temperature polymorph. *Macromolecules* **17**, 100-107.
- Gunning A.P., Giardina T.P., Faulds C.B., Juge N., Ring S.G., Williamson G. et Morris V.J. (2003).** Surfactant-mediated solubilisation of amylose and visualisation by atomic force microscopy. *Carbohydr. Polym.* **51**, 177-182.
- Hall R.S. et Manners D.J. (1980).** The structural analysis of some amyloextrins. *Carbohydr. Res.* **83**, 93-101
- Hanashiro I., Abe J.I. et Hizukuri S. (1996).** A periodic distribution of chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. *Carbohydr. Res.* **283**, 151-159.
- Hanus J. et Mazeau K. (2006).** The xyloglucan-cellulose assembly at the atomic scale. *Biopolymers* **82**(1), 59-73.
- Hehre E.J., Hamiltroon D. et Carlson A.S. (1949).** Synthesis of a polysaccharide of the starch-glycogen class from sucrose by a cell-free bacterial enzyme system (amylosucrase). *J. Biol. Chem.* **177**, 267-279
- Helbert W. (1994).** Données sur la structure du grain d'amidon et des produits de recristallisation de l'amylose. Thèse de Doctorat de l'Université Joseph Fourier, Grenoble.
- Helbert W. et Chanzy H. (1994).** Oriented growth of V-amylose *n*-butanol crystals on cellulose. *Carbohydr. Polym.* **24**, 119-122.
- Helbert W. et Chanzy H. (1994).** Single-crystal of V-amylose complexed with *n*-butanol or *n*-pentanol – structural features and properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **16**, 207-213.
- Helbert W., Chanzy H., Planchot V., Buléon A. et Colonna P. (1993).** Morphological and structural features of amylose spherocrystal of A-type. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 183-187.
- Herrmann K., Gerngross O. et Abitz W. (1930).** Zur röntgenographischen Strukturereforschung des Gelatinemicells. *Z. Phys. Chem.* **10**, 365-371
- Herth W. et Zugenmaier P. (1977).** Ultrastructure of the chitin fibrils of the centric diatom *Cyclotella cryptica*. *J. Ultrastruct. Res.* **68**, 230-235.
- Hewitt J.M., Linder M., Perez S. et Buléon A. (1986).** High-resolution CP-MAS ¹³C-NMR spectra of solid amyloextrins and amylose polymorphs. *Carbohydr. Res.* **154**, 1-13.
- Hizukuri S. (1985).** Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydr. Res.* **141**, 295-306.
- Hizukuri S. (1986).** Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* **147** 342-347.
- Hizukuri S., Kaneko T. et Takeda Y. (1983).** Measurement of the chain length of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* **147**, 342-347.
- Hizukuri S., Kaneko T. et Takeda Y. (1983).** Measurement of the chain length of amylopectin and its relevance to the origin of crystalline polymorphism of starch granule. *Biochim. Biophys. Acta.* **760**, 188-191.
- Hizukuri S., Takeda Y., Abe J.I., Hanashiro I., Matsunobu G. et Kiyota H. (1997).** Starch: structure and functionality. Royal Society of Chemistry, London.

- Holmes D.F., Chapman J.A., Prockop D.J. et Kadler K.E. (1992).** Growing tips of type I collagen fibrils formed in vitro are near-paraboloidal in shape, implying a reciprocal relationship between accretion and diameter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9855-9859.
- Hoover R. et Vasanathan T. (1994).** Effect of the heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of cereal, legume and tuber starches. *Carbohydr. Res.* **252**, 33-53.
- Horio M. (1964).** The theory of crimp of textile fibers. Dans "Memoirs of the Faculty of Engineering", Kyoto University.
- Hudson C. (1909).** The significance of certain numerical relations in the sugar group. *J. Amer. Chem. Soc.* **31**, 66-86.
- Hulleman S.H.D., Helbert W., Chanzy H. (1996).** Single crystals of V amylose complexed with glycerol. *Int. J. Biol. Macromol.* **18**, 115-122.
- Hulliger J., Langley P.J., König O., Rothz S.W., Quintely A., Rechsteiner P. (1998).** A supramolecular approach to the parallel alignment of nonlinear optical molecules. *Pure Appl. Opt.* **7**, 221-227.
- Imai T., Watanabe T., Yui T., Sugiyama J. (2002).** Directional degradation of β -chitin by chitinase A1 revealed by a novel reducing end labelling technique. *FEBS Lett.* **510**(3), 201-205.
- Imberty A., Buléon A., Tran V. et Pérez S. (1991).** Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch/Stärke.* **43**(10) 375-384.
- Imberty A., Chanzy H., Pérez S., Buléon A. et Tran V. (1987).** New three-dimensional structure for A-starch. *Macromolecules.* **20**(10), 2634-2636.
- Imberty A., Chanzy H., Pérez S., Buléon A. et Tran V. (1988).** The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *J. Mol. Biol.* **201**, 365-378.
- Imberty A. et Pérez S. (1988).** A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers* **27**, 1205-1221.
- Jaccodine R. (1955).** Observations of spiral growth steps in ethylene polymer. *Nature* **176**, 305.
- Jane J-L. (2006).** Current understanding on starch granule structures. *J. Appl. Glycosci.* **53**, 205-213.
- Jane J-L., Chen Y.Y., Lee L.F., McPherson A.E., Wong K-S., Radosavljevic M., Kasemsuwan T. (1999).** Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chem.* **76**, 629-637.
- Jane J-L. et Robyt J.F. (1984).** Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydr. Res.* **132**, 105-118.
- Jane J-L., Wong K. et McPherson A. (1997).** Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Nägeli dextrins. *Carbohydr. Res.* **300**, 219-227.
- Jayakody L. et Hoover R. (2002).** The effect of lintnerization on cereal starch granules. *Food Res. Int.* **35**, 665-680.
- Jenkins P.J. et Donald A.M. (1995).** The influence of amylose on starch granule structure. *Int. J. Biol. Macromol.* **17**(6), 315-321.
- Jenkins P.J. et Donald A.M. (1997).** The effect of acid hydrolysis on native starch granule structure. *Starch/Stärke.* **49**, 262-267.
- Jenkins P.J., Cameron R.E. et Donald A.M. (1993).** A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke.* **45**(12), 417-420.
- Jouaiti A., Hosseini M.W., Kyritsakas N. (2002).** Non-centrosymmetric packing of 1-D coordination networks based on chirality. *Chem. Commun.* 1898-1899.
- Kainuma K. et French A.D. (1971).** Nägeli amyloextrin and its relationship to starch granule structure. I. Preparation and properties of amyloextrins from various starch types. *Biopolymers* **10**, 1673-1680.

- Kainuma K. et French D. (1972).** Naëgli amyloextrin and its relationship to starch granule structure. II. Role of water in cristallisation of B-starch. *Biopolymers* **11**, 2241-2250.
- Kamogawa A., Fukui T. et Nikuni Z. (1968).** Potato α -glucan phosphorylase: crystallization, amino acid composition and enzymatic reaction in the absence of added primer. *J. Biochem.* **63**, 361-369.
- Kandra L., Gyémánt G., Farkas E. et Lipták A. (1997).** Action pattern of porcine pancreatic alpha-amylase on three different series of β -maltooligosaccharide glycosides. **298**, 237-242.
- Kassenbeck P. (1978).** Beitrag zur kenntis der verteilung von amylose und amylopectin in stärkekömem. *Starch/Stärke* **2**, 40-46.
- Keith H.D. et Padden F.D. (1986).** A discussion of spherulitic crystallization and spherulitic morphology in high polymers. *Polymer* **27**, 1463-1471.
- Keller A. (1955).** The spherulitic structure of crystalline polymers: Part I. Investigations with the polarizing microscopy. *J. Polym. Sci.* **17**, 291-308.
- Keller A. (1957).** A note on single crystals in polymers: Evidence for a folded chain configuration. *Phil. Mag.* **2**, 1171-1175.
- Keller A. et Waring J.R.S. (1955).** The spherulitic structure of crystalline polymers. Part III. Geometrical factors in spherulitic growth and the fine-structure *J. Polym. Sci.* **17**, 447-472.
- Kim U-J., Kuga S., Wada M., Okano T., Kondo T. (2000).** Periodate oxidation of crystalline cellulose. *Biomacromolecules* **1**(3), 488-492.
- Kiozumi K., Fukuda M. et Hizukuri S. (1991).** Estimation of the distribution of chains length of amylopectins by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatography* **585**, 233-238.
- Kitamura S., Tanahashi H. et Kuge T. (1984).** Study of polysaccharides by the fluorescence method. III. Chain length dependence of the micro-brownian motion of amylose in an aqueous solution. *Biopolymers* **23**, 1043-1056.
- Kitamura S., Yunokawa H., Mitsuie S. et Kuge T. (1982).** Study on polysaccharide by the fluorescence method. II. Micro-brownian motion and conformational change of amylose in aqueous solution. *Polym. J.* **14**(2) 93-99.
- Kobayashi S., Hobson L.J., Sakamoto J., Kimura S., Sugiyama J., Imai T. et Itoh T. (2000).** Formation and structure of artificial cellulose spherulites via enzymatic polymerization. *Biomacromolecules* **1**, 168-173.
- Koyama M., Helbert W., Imai T., Sugiyama J., Henrissat B. (1997).** Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9091-9095.
- Koch J.T., Andersson R. et Aman P. (1998).** Quantitative analysis of amylopectin unit chains by means of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatography A.* **800**(2), 199-206.
- Kossman J., Buttcher V. et Welsh T. (1995).** DNA sequences coding for enzyme capable of facilitating the synthesis of linear α -1.4 glucans in plants, fungi and microorganisms. *Brevet international* WO 95/31553.
- Le Bail P., Bizot H. et Buléon A. (1993).** "B" to "A" type phase transition in short amylose chains. *Carbohydr. Polym.* **21**, 99-104.
- LeLay P. et Delmas G. (1998).** Investigation of the physical network of amorphous amylose by slow calorimetry. *Carbohydr. Polym.*, **37**, 49-60.
- Lemke H., Burghammer M., Flot D., Rössle M. et Riekel C. (2004).** Structural processes during starch granule hydration by synchrotron radiation microdiffraction. *Biomacromolecules* **5**(4), 1316-1324.
- Lim S.T., Chang E.H. et Chung H.J. (2001).** Thermal transition characteristics of the heat-moisture treated corn and potato starches. *Carbohydr. Polym.* **46**, 107-115.

- Lintner C.J. (1886).** Studien über die Diastase. *J. Prak. Chem.* **34**, 378-386.
- MacGregor E.A. et MacGregor A.W. (1985).** A model for the action of cereal alpha amylases on amylose *Carbohydr. Res.* **142**, 223-236.
- Mandelkern L. (1964).** Crystallisation of polymers. McGraw-Hill - New York.
- Mandelkern L. (1976).** Structure and properties of polymer crystals formed in dilute solution. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **6**, 119-138.
- Marentette et Brown (1993).** Polymer Spherulites I: birefringence and morphology. *J. Chem. Edu.* **70**, 435-439.
- Mauritz K.A., Baer E., Hopfinger A.J. (1978).** The epitaxial crystallization of macromolecules *J. Polym. Sci. Macromol. Rev.* **13**, 1-61.
- Mazeau K., Winter, W.T., Chanzy H. (1994).** Molecular and crystal structure of a high temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data. *Macromolecules* **27**, 7606-7612.
- Mazur A.K et Nakatani H. (1993).** Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic alpha-amylase hydrolysis of amylose and amylopectin. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**(1), 29-38.
- Mercier C. (1973).** The fine structure of corn starches of various amylose percentage : waxy, normal and amylomaïze. *Starch/Stärke.* **25**, 78-83.
- Meyer K.H. (1952).** The past and present of starch chemistry. *Experientia.* **8**, 405-420.
- Miles M.J., Morris V.J. et Ring S.G. (1985).** Gelation of amylose. *Carbohydr. Res.* **135**, 257-269.
- Moates G.K., Noel T.R., Parker R. et Ring S.G. (1997).** The effect of chain length and solvent interactions on the dissolution of the B-type crystalline polymorph of amylose in water. *Carbohydr. Res.* **298**, 327-333.
- Muhr A.H., Blanshard J.M.V. et Bates D.R. (1984).** The effect of lintnerisation on wheat and potato starch granules. *Carbohydr. Polym.* **4**, 399-425.
- Nägeli C.W. (1874).** Beitäge zur näheren Kenntniss des stärke grupe. *Annalen der Chemie* **173**, 218-227.
- Nakanishi Y., Norisuye T., Teramoto A. et Kitamura S. (1993).** Conformation of amylose in dimethyl sulfoxide. *Macromolecules* **26**, 4220-4225.
- Nordmark T.S. et Ziegler G.R. (2002).** Structural features of non-granular spherulitic maize starch. *Carbohydr. Res.* **337**, 1467-1475.
- Nordmark T.S. et Ziegler G.R. (2002).** Spherulitic crystallization of gelatinized maize starch and its fractions. *Carbohydr. Polym.* **49**, 439-448.
- Nuessli J., Putaux J-L., Le Bail P. et Buléon A. (2000).** Crystal structure of amylose complexes with small ligands. *Int. J. Biol. Macromol.* **33**, 227-234.
- O'Sullivan C. et Pérez S. (1999).** The relationship between internal chain length of amylopectin and crystallinity in starch. *Biopolym.* **50**(4), 381-390.
- Ostendorf F., Schmitz C., Hirth S, Kühnle A, Kolodziej J.J., Reichling M. (2008).** How flat is an air-cleaved mica surface ? *Nanotechnology* **19**, 305705.
- Okada G. et Hehre E.J. (1974).** New studies on amylsucrase, a bacterial α -D-glucosylase that directly converts sucrose to a glycogen-like α -glucan. *J. Biol. Chem.* **10**, 126-135.
- Oostergetel G.T. et van Bruggen E.F.J. (1989).** On the origin of a low angle spacing in starch. *Starch/Stärke* **41**(9), 331-335.
- Oostergetel G.T. et van Bruggen E.F.J. (1993).** The crystalline domains in potato starch granules are arranged in helical fashion. *Carbohydr. Polym.* **21**, 7-12.
- Paris M., Bizot H., Emery J., Buzaré J.Y. et Buléon A. (1999).** Crystallinity and structuring role of water in native and recrystallized starches by ^{13}C CP-MAS NMR spectroscopy 1: Spectral decomposition. *Carbohydr. Polym.* **39**, 327-339.

- Pennings A.J. et Kiel A.M. (1965).** Fractionation of polymers by crystallization from solution, III. On the morphology of fibrillar polyethylene crystals grown in solution *Colloid Polym. Sci.* **205**, 160-162
- Pennings A.J., van der Mark M.A.A. et Kiel A.M. (1970).** Hydrodynamically induced crystallization of polymers from solution. *Colloid Polym. Sci.* **237**, 336-358.
- Pérez S., Imberty A., Scaringe R.P. (1990).** In: Computer modeling of carbohydrate molecules. Eds French, A.D., Brady, J.W., American Chemical Society, Washington, DC, pp 281-299.
- Persson E., Domard A. et Chanzy H. (1992).** Single crystals of α -chitin. *Int. J. Biol. Macromol.* **14**, 221-224.
- Pfannemüller B. (1968).** Einfluß der kompetitiven substrathemmung auf die kinetik der phosphorylase aus kartoffeln. *Starch/Stärke* **20**, 351-362.
- Pfannemüller B. (1987).** Influence of the chain length of short monodisperse amylose on the formation of A- and B- type X-ray diffraction patterns. *Int. J. Biol. Macromol.* **9**, 105-108.
- Pfannemüller B. et Burchard W. (1969).** Unterschiedlicher verlauf der phosphorolytischen amylosesynthese mit maltotriose und höheren maltodextrinen als starter. *Makromol. Chem.* **121**, 1-17.
- Pfannemüller B. et Bauercarnap A. (1977).** Electron microscopic studies on fibrils formed from retrograded synthetic amyloses. *Colloid Polym. Sci.* **255**, 844-848.
- Pizzut-Serin S., Potocki-Véronèse G., van der Veen B.A., Albenne C., Monsan P. et Remaud-Simeon M. (2005).** Characterisation of a novel amylosucrase from *Deinococcus radiodurans*. *FEBS Lett.* **579**, 1405-1410.
- Planchot V. (1993).** α -amylases d'*Aspergillus fumigatus*. Mécanisme d'action en phase hétérogène. Thèse de doctorat de la Faculté des Sciences et Techniques, Nantes.
- Planchot V., Colonna P. et Buléon A. (1997).** Enzymatic hydrolysis of α -glucan crystallites. *Carbohydr. Res.* **298**, 319-326.
- Pohu A., Putaux J.-L., Planchot V., Colonna P. et Buléon A. (2004a).** Origin of the limited α -amylosis of debranched maltodextrins crystallized in the A form: a TEM study on model substrates. *Biomacromolecules* **5**(1), 119-125.
- Pohu A., Planchot V., Putaux J.-L., Colonna P. et Buléon A. (2004b).** Split crystallization during debranching of maltodextrins at high concentration by isoamylase. *Biomacromolecules* **5**, 1792-1798.
- Popoff B. (1934).** Spha'rolithenbau und Strahlungskristallisation. *Latv. Farm. Zurn.* Riga
- Popov D., Burghammer M., Buléon A., Montesanti N., Putaux J.-L. et Riekkel C. (2006).** A-amylose single crystals : unit cell refinement from synchrotron radiation microdiffraction data. *Macromolecules* **39**, 3704-3706.
- Popov D., Buléon A., Burghammer M., Chanzy H., Montesanti N., Putaux J.-L. , Potocki-Véronèse G. et Riekkel C. (2008).** Crystal structure of A-amylose: a revisit from synchrotron microdiffraction analysis of single crystals. *Macromolecules*, sous presse
- Potocki de Montalk G., Remaud-Siméon M., Willemot R.-M., Planchot V. et Monsan P. (1999).** Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* and characterization of the recombinant enzyme. *J. Bacteriol.* **181**, 375-381.
- Potocki de Montalk G., Remaud-Siméon M., Willemot R.-M., Sarçabal P., Planchot V. and Monsan P. (2000).** Amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*: novel catalytic properties. *FEBS Lett.* **471**, 219-223.
- Potocki-Véronèse G., Putaux J.L., Dupeyre D., Albenne C., Remaud-Siméon M., Monsan P. and Buléon A. (2005).** Amylose synthesized in vitro by amylosucrase: morphology, structure, and properties. *Biomacromolecules*. **6**(2), 1000-1011.
- Prockop D.J. et Fertala A. (1998).** The collagen fibril: the almost crystalline structure. *J. Struct. Biol.* **122**, 111-118.

- Puel F., Veessler S. et Mangin D. (2005).** Cristallisation. Aspects théoriques. Dans: Techniques de l'Ingénieur, article n°J2-710, mise à jour de l'article initial de Klein J.P., Boistelle R. et Dugua J.
- Putaux J.-L., Buléon A. et Chanzy H. (2000).** Network formation in dilute amylose and amylopectin studied by TEM. *Macromolecules* **33**(17), 6416-6422.
- Putaux J.L., Molina-Boisseau S., Momaur T. et Dufresne A. (2003).** Platelet nanocrystal resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. *Biomacromolecules* **4**(5), 1198-1202.
- Rappenecker G. et Zugenmaier P. (1981).** Detailed refinement of the crystal structure of Vh-amylose *Carbohydr. Res.* **89**, 11-19.
- Revol J.F. et Marchessault R.H. (1993).** In vitro nematic ordering of chitin crystallites. *Int. J. Biol. Macromol.* **16**, 329-335.
- Remaud-Simeon M., Albaret F., Canard B., Varlet I., Colonna P., Willemot R.M. et Monsan P. (1995).** Studies on a recombinant amylosucrase. Dans "Carbohydrate Bioengineering", Eds. Petersen S. B., Svensson B. et Pedersen S., Elsevier Science, pp 313-320.
- Ring S.G., Miles M.J., Morris V.J., R T. et Colonna P. (1987).** Spherulitic crystallisation of short chain amylose. *Int. J. Biol. Macromol.* **9**, 158-160.
- Riou J.Y., Guibourdenche M. et Popoff M.Y. (1983).** A new taxon in the genus *Neisseria*. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur* **134B**, 257-267.
- Riou J.Y., Guibourdenche M., Perry M.B., MacLean L.L., Griffith W. (1986).** Structure of the exocellular D-glucan produced by *Neisseria polysaccharea*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 909-911.
- Riou J.Y. et Guibourdenche M. (1987).** *Neisseria polysaccharea* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* **37**, 163-165.
- Riou J.Y. et Guibourdenche M. (1992).** Méthodes de laboratoire *Neisseria* et *Branhamella*. Ed. Institut Pasteur, Paris, France.
- Robin J.P. (1976).** Comportement du grain d'amidon à l'hydrolyse acide ménagée. Etude physico-chimique et enzymatique de la fraction insoluble. Contribution à la connaissance. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Robin J.P., Mercier C., Charbonnière R. et Guilbot A. (1974).** Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chem.* **51**, 389-406.
- Robin J.P., Mercier C., Duprat F., Charbonnière R., Guilbot A. (1975).** Amidon lintnerisées. Etudes chromatographique et enzymatique des résidus insolubles provenant de l'hydrolyse chlorhydrique d'amidon de céréales, en particulier de maïs cireux. *Die Stärke* **27**, 36-45.
- Roger P., Baud B., Colonna P. (2000).** Characterization of starch polysaccharides by flow field-flow fractionation–multi-angle laser light scattering–differential refractometer index. *J. Chromat. A.* **917**, 179-185.
- Saez-Nieto J.A., Lujan R., Martinez-Suarez J.V. Beron S., Vasquez J.A., Vinas M. et Campos J. (1990).** *Neisseria lactamica* and *Neisseria polysaccharea* as possible sources of meningococcal beta-lactam resistance by genetic transformation. *Antimicrob. Agents Chemoth.* **34**, 2269-2272.
- Schlesinger W. et Leeper H.M. (1953).** Gutta. I. Single crystals of alpha-gutta. *J. Polym. Sci.* **XI**, 202-213.
- Skov L.K., Mirza O. et Henriksen A., Potocki De Montalk G., Remaud-Simeon M., Sarçabal P., Willemot R.M., Monsan P., GajhedeDagger M. (2001).** Amylosucrase, a glucan-synthesizing enzyme from the alpha-amylase family. *J. Biol. Chem.* **276**, 25273-25278.
- Smith A.M. (1999).** Making starch. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 3223-229.
- Storks K.H. (1938).** An electron diffraction examination of some linear high polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**(8), 1753-1761.

- Stute R. (1992).** Hydrothermal modification of starches : the differences between annealing and heat/moisture treatment. *Stärke* **44**, 205-214.
- Suito E., Uyeda N., Ashida M. et Yamamoto K. (1966).** Effect of cleavage steps of muscovite on the epitaxial growth of copper phthalocyanine. *Proc. Jap. Acad.* **42**, 54-59.
- Takeda Y., Hizukuri S., Takeda C. et Suzuki A. (1987).** Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and un branched molecules. *Carbohydr. Res.* **165**, 139-145.
- Tester R.F., Karkalas J. et Qi X. (2004).** Starch-composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* **39**, 151-165.
- Thompson D.B. (2000).** On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydr. Polym.* **43**(3), 223-239.
- Tomasik P. et Schilling C.H. (1998a).** Complexes of starch with inorganic guests. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **53**, 263-343.
- Tomasik P. et Schilling C.H. (1998b).** Complexes of starch with organic guests. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **53**, 345-426.
- Tsuji M. et Kohjiya S. (1995).** Structural studies on crystalline polymer solids by high resolution electron microscopy. *Prog. Polym. Sci.* **20**, 259-308.
- Umeki K. and Kainuma K. (1981).** Fine structure of năgeli amylopectin obtained by acid treatment of defatted waxy-maize starch - structural evidence to support the double-helix hypothesis. *Carbohydr. Res.* **96** 143-159.
- Valeton J.J.P. (1923).** *Z. Kristall.* **59**, 135.
- Vermeulen R., Goderis B., Reynaers H. et Delcour J.A. (2004).** Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. *Biomacromolecules* **5**(5), 1775-1786.
- Waigh T., Hopkinson I., Donald A., Butler M., Heidelbach et Riekkel C. (1997).** Analysis of the native structure of starch granules with x-ray microfocus diffraction. *Macromolecules* **30**(13), 3812-3813.
- Waigh T.A., Perry P., Riekkel C., Gidley M.J. et Donald A.M. (1998).** Chiral side-chain liquid-crystalline polymeric properties of starch. *Macromolecules* **31**, 7980-7984.
- Welland E.L. et Donald A. (1991).** Single crystals of V-amylose. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 69-72.
- Whelan W.J. et Bailey J.M. (1954).** The action pattern of potato phosphorylase *Biochem. J.* **58**, 560-569.
- Whistler R.L. et Daniel J.R. (1984).** Molecular structure of starch. Dans "Starch: Chemistry and Technology", R.L. Whistler, J.N. Bemiller et E.F. Paschall, pp 153-182.
- Whittam M.A., Orford P.D., Ring S.G., Clark S.A., Parker M.L., Cairns P., Miles M.J. (1989).** Aqueous dissolution of crystalline and amorphous amylose-alcohol complexes. *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, 339-344.
- Whittam M.A., Noel T.R. et Ring S.G. (1990).** Melting behaviour of A- and B-type crystalline starch. *Int. J. Biol. Macromol.* **2**, 359-362.
- Winter W.T., Chanzy H., Putaux J-L. et Helbert W. (1998).** Inclusion compounds of amylose. *Polym. Prepr.* **39**, 1447-1460.
- Wittmann J.C. et Lotz B. (1990).** Epitaxial crystallization of polymers on organic and polymeric substrates. *Prog. Polym. Sci.* **15**, 909-948.
- Wittmann J.-C. et Smith P. (1991).** Highly oriented thin films of poly(terafluoroethylene) as a substrate for oriented growth of materials. *Nature* **352**, 414-417.
- Wu H.-C.H. et Sarko A. (1977).** The crystal structure of A-starch: is it double helical? *Carbohydr. Res.* **54**, C3-C6.

- Wu H.-C.H. et Sarko A. (1978a).** The double-helical molecular structure of crystalline B-amylose. *Carbohydr. Res.* **61**, 7-25.
- Wu H.-C.H. et Sarko A. (1978b).** The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose. *Carbohydr. Res.* **61**, 27-40.
- Wunderlich B. (2005).** *Macromolecular Physics in 2005*. Springer.
- Wunderlich B. et Melillo L. (1966).** Surface recrystallization of polyethylene extended-chain crystals. *Science* **154**, 1329-1330.
- Wunderlich B. (1976).** *Macromolecular Physics, Volume 2: Crystal Nucleation, Growth, Annealing*. Academic Press, New York.
- Yamaguchi M., Kainuma K. et French D. (1979).** Electron microscopic observation of waxy maize starch. *J. Ultrastruct. Res.* **69**, 249-261.
- Yamashita Y. et Monobe K. (1971).** Single crystal of amylase V complexes. 3. Crystal with 81 helical configuration. *J. Polym. Sci. Part. A-2* **9**, 1471-1781.
- Yamashita Y., Ryugo J. et Monobe K. (1973).** Electron microscopic study on crystals of amylase V complexes. *J. Electron Microsc.* **22**, 19-26
- Yanase M., Takaha T. et Kuriki T. (2007).** Developing and engineering enzymes for manufacturing amylose. *J. Appl. Glycosci.* **54**, 125-131.
- Ziegler G.R., Nordmark T.S. et Woodling S.E. (2003).** Spherulitic crystallization of starch: influence of botanical origin and extent thermal treatment. *Food Hydrocolloids*. **17**, 487-494.
- Ziegler G.R., Creek J.A. et Runt J. (2005).** Spherulitic crystallization in starch as model for starch granule initiation. *Biomacromolecules* **6**, 1547-1554.
- Zobel H.F. (1988a).** Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch/Stärke*. **40**(2), 44-50.
- Zobel H.F. (1988b).** Starch crystal transformation and their industrial importance. *Starch/Stärke* **40**, 1-7.

ANNEXE

Indices hkl des 183 tâches de diffraction identifiées dans les clichés enregistrés à partir de cristaux d'amylose A, distances réticulaires d_{obs} déduites après calibration à l'or, distances réticulaires d_{obs} recalculées à partir des paramètres de maille déterminés par la méthode des moindres carrés, erreur $|d_{\text{obs}}-d_{\text{cal}}|$.

h	k	l	d_{obs} (nm)	d_{cal} (nm)	$ d_{\text{obs}}-d_{\text{cal}} $ (nm)
-19	6	1	0,11016	0,10960	0,00056
-18	4	6	0,09657	0,09673	0,00016
-17	4	5	0,10659	0,10625	0,00034
-16	4	4	0,11892	0,11730	0,00162
-15	4	3	0,13021	0,12999	0,00022
-15	2	3	0,12446	0,12449	0,00003
-14	4	2	0,14515	0,14422	0,00093
-14	2	8	0,09782	0,09739	0,00043
-14	2	2	0,13843	0,13837	0,00006
-13	4	1	0,16023	0,15937	0,00086
-13	2	7	0,10882	0,10854	0,00028
-13	2	1	0,15470	0,15369	0,00101
-13	1	7	0,10545	0,10570	0,00025
-12	3	0	0,17195	0,17433	0,00238
-12	2	0	0,16930	0,16943	0,00013
-12	2	6	0,12291	0,12240	0,00051
-12	1	6	0,11863	0,11887	0,00024
-11	2	5	0,14040	0,14002	0,00038
-11	1	5	0,13521	0,13554	0,00033
-11	0	3	0,14798	0,14783	0,00015
-10	2	4	0,16368	0,16294	0,00074
-10	1	4	0,15742	0,15715	0,00027
-10	1	2	0,18011	0,18302	0,00291
-10	0	2	0,16944	0,16959	0,00015
-9	3	3	0,19146	0,19398	0,00252
-9	2	3	0,19467	0,19346	0,00121
-9	1	3	0,18047	0,18586	0,00539
-9	0	9	0,10154	0,10148	0,00006
-9	0	3	0,17301	0,17337	0,00036
-9	0	1	0,19603	0,19545	0,00058
-8	4	0	0,23402	0,23822	0,00420
-8	3	2	0,22742	0,23172	0,00430
-8	2	2	0,23556	0,23460	0,00096
-8	2	0	0,25838	0,26150	0,00312
-8	1	2	0,22534	0,22471	0,00062
-8	0	8	0,11378	0,11417	0,00039
-8	0	4	0,17135	0,17108	0,00027
-8	0	2	0,20541	0,20615	0,00074
-7	4	1	0,24251	0,24838	0,00587
-7	3	1	0,27134	0,27662	0,00528
-7	2	3	0,22381	0,22875	0,00494
-7	2	1	0,29201	0,28845	0,00356
-7	1	1	0,27502	0,27674	0,00172
-7	0	7	0,13016	0,13048	0,00032
-7	0	3	0,20735	0,20726	0,00009
-7	0	1	0,24924	0,24856	0,00068
-6	4	2	0,23612	0,24116	0,00504
-6	3	0	0,31111	0,31763	0,00652
-6	2	2	0,28444	0,29097	0,00653

-6	1	0	0,34271	0,33887	0,00384
-6	0	6	0,15231	0,15222	0,00009
-6	0	4	0,19859	0,19832	0,00027
-6	0	2	0,25615	0,26005	0,00390
-6	0	0	0,29500	0,29826	0,00326
-5	4	3	0,22031	0,22045	0,00014
-5	3	1	0,32467	0,33054	0,00587
-5	2	1	0,37422	0,38043	0,00621
-5	1	3	0,26355	0,26872	0,00517
-5	0	5	0,18178	0,18267	0,00089
-5	0	3	0,25179	0,25170	0,00009
-5	0	1	0,33724	0,33918	0,00194
-4	3	2	0,30183	0,30442	0,00259
-4	2	0	0,47056	0,47644	0,00588
-4	1	2	0,36987	0,37263	0,00276
-4	1	0	0,51906	0,52301	0,00395
-4	0	4	0,22812	0,22834	0,00022
-4	0	2	0,34034	0,34215	0,00181
-4	0	0	0,44200	0,44740	0,00540
-3	-2	9	0,11016	0,11018	0,00002
-3	2	1	0,47681	0,48232	0,00551
-3	1	1	0,58024	0,58194	0,00170
-3	0	5	0,19980	0,20011	0,00031
-3	0	3	0,30463	0,30445	0,00018
-3	0	1	0,51556	0,52011	0,00455
-3	-1	5	0,18746	0,18964	0,00218
-2	-2	8	0,12446	0,12447	1,0006e
-2	1	0	0,94523	0,95288	0,00765
-2	0	4	0,25308	0,25455	0,00147
-2	0	2	0,45694	0,45667	0,00027
-2	0	0	0,90550	0,89480	0,01070
-2	-1	4	0,23556	0,23789	0,00233
-2	-1	2	0,37962	0,37710	0,00252
-1	0	3	0,34632	0,34730	0,00098
-1	0	1	0,91389	0,91335	0,00054
-1	-2	3	0,27570	0,27054	0,00516
-1	-2	5	0,18800	0,18950	0,00150
-1	-1	7	0,14932	0,14843	0,00089
-1	-1	3	0,31366	0,31731	0,00365
-1	-2	7	0,14242	0,14268	0,00026
0	-1	2	0,46266	0,46672	0,00406
0	-1	6	0,17531	0,17419	0,00112
0	-2	4	0,23034	0,23336	0,00302
0	-2	6	0,16616	0,16645	0,00029
0	0	2	0,52781	0,53104	0,00323
0	0	4	0,26461	0,26552	0,00091
0	0	6	0,17625	0,17701	0,00076
1	-1	1	0,77109	0,77913	0,00804
1	-1	5	0,20955	0,20886	0,00069
1	-2	3	0,29909	0,29778	0,00131
1	-2	5	0,19899	0,19818	0,00081
1	-3	5	0,18127	0,18230	0,00103
2	-1	0	0,95100	0,95288	0,00188
2	-1	2	0,46457	0,46387	0,00070
2	-1	4	0,25605	0,25578	0,00027
2	-2	0	0,58201	0,57323	0,00877
2	-2	2	0,38680	0,38956	0,00276
2	-2	4	0,23956	0,24093	0,00137
2	-4	4	0,20021	0,19111	0,00910
3	-1	1	0,57817	0,58194	0,00377

3	-1	3	0,31462	0,31552	0,00090
3	-3	3	0,25838	0,25971	0,00133
3	-1	5	0,20317	0,20316	0,00000
3	-1	7	0,14715	0,14824	0,00109
3	-2	3	0,29909	0,29630	0,00279
3	-3	1	0,36022	0,35958	0,00064
3	-3	3	0,25700	0,25971	0,00271
3	-4	9	0,10858	0,10899	0,00041
4	-1	0	0,51784	0,52301	0,00517
4	-1	2	0,37568	0,37263	0,00305
4	-1	4	0,23545	0,23676	0,00131
4	-1	6	0,16672	0,16767	0,00095
4	-2	0	0,47681	0,47644	0,00037
4	-2	2	0,35682	0,35463	0,00219
4	-2	4	0,23400	0,23194	0,00206
4	-2	8	0,12902	0,12789	0,00113
4	-4	0	0,28692	0,28660	0,00032
4	-4	2	0,25114	0,25222	0,00108
4	-4	8	0,12022	0,12046	0,00024
5	-2	1	0,38079	0,38043	0,00036
5	-2	3	0,26792	0,26725	0,00067
5	-2	5	0,18937	0,18836	0,00101
5	-2	7	0,14409	0,14219	0,00190
5	-4	7	0,13338	0,13359	0,00021
5	-5	1	0,22586	0,22413	0,00173
5	-1	1	0,38567	0,38472	0,00095
6	-1	0	0,34114	0,33887	0,00227
6	-1	2	0,28700	0,28566	0,00134
6	-1	4	0,21272	0,20900	0,00372
6	-2	0	0,35002	0,34783	0,00219
6	-2	2	0,28728	0,29097	0,00369
6	-2	4	0,20929	0,21106	0,00177
6	-2	6	0,15971	0,15776	0,00195
6	-3	0	0,31635	0,31763	0,00128
6	-3	2	0,27205	0,27259	0,00054
6	-4	6	0,14775	0,14815	0,00040
6	-6	0	0,19240	0,19108	0,00132
7	-2	5	0,17562	0,17330	0,00232
7	-4	5	0,16368	0,16333	0,00035
8	-1	2	0,22406	0,22471	0,00065
8	-2	0	0,25610	0,26150	0,00540
8	-2	2	0,23126	0,23460	0,00334
8	-2	4	0,18714	0,18632	0,00082
8	-4	4	0,17720	0,17732	0,00012
8	-4	0	0,23783	0,23822	0,00039
9	-6	9	0,09880	0,09877	0,00003
9	-4	3	0,18764	0,18724	0,00040
9	-3	1	0,22260	0,22655	0,00395
9	-3	3	0,19256	0,19398	0,00142
9	-3	5	0,15519	0,15663	0,00144
9	-2	3	0,19661	0,19346	0,00315
10	-1	2	0,18261	0,18302	0,00041
10	-2	2	0,19467	0,19236	0,00231
10	-4	0	0,20757	0,20373	0,00384
10	-4	2	0,19265	0,19021	0,00244
10	-4	4	0,16395	0,16163	0,00232
10	-6	8	0,10511	0,10553	0,00042
11	-2	1	0,18483	0,18340	0,00143
11	-4	1	0,18658	0,18521	0,00137
11	-6	7	0,11241	0,11217	0,00024

12	-1	2	0,15386	0,15358	0,00028
12	-2	2	0,16477	0,16142	0,00335
12	-3	0	0,17141	0,17433	0,00292
12	-3	2	0,16298	0,16564	0,00266
12	-4	2	0,16267	0,16528	0,00261
12	-4	4	0,14351	0,14548	0,00197
12	-6	6	0,11835	0,11821	0,00014
12	-4	0	0,17469	0,17391	0,00078
13	-6	5	0,12291	0,12305	0,00014
14	-6	4	0,12638	0,12607	0,00031
15	-6	3	0,12719	0,12681	0,00038
16	-6	2	0,12557	0,12514	0,00043
17	-6	1	0,12230	0,12133	0,00097
18	-6	0	0,11667	0,11594	0,00073
erreur moyenne :					0,00192

Système modèle de cristallisation de l'amylose A

L'amidon, principal glucide de réserve des végétaux supérieurs et l'une des sources caloriques majeures de l'espèce humaine, se présente sous la forme de grains microscopiques (1-100 μm) constitués d'un mélange de deux homopolymères de glucose, l'un linéaire (l'amylose) et l'autre ramifié (l'amylopectine). La cristallinité de l'amidon natif (de l'ordre de 35%) trouve son origine dans l'organisation en grappe de l'amylopectine. Les courtes branches de la macromolécule forment des doubles hélices qui s'associent latéralement pour former des lamelles cristallines. La caractérisation de ces cristallites dans le grain à une échelle locale reste problématique. Pour étudier la cristallisation de l'amidon, on peut aussi concevoir des systèmes *in vitro* simplifiés ou "modèles" et s'intéresser au comportement de courtes chaînes dont le degré de polymérisation est de l'ordre de celui des courtes branches de l'amylopectine. Au cours de ce travail, nous avons préparé des fractions de courtes chaînes d'amylose par hydrolyse d'amidon natif et par synthèse enzymatique *in vitro*. Ces fractions en solutions aqueuses diluées ont été cristallisées par diffusion lente d'un précipitant. Nous avons étudié l'influence de paramètres moléculaires (degré de polymérisation, polydispersité, taux de branchement) ou opératoires (concentration, température, présence de substrats inductifs) sur le mode de cristallisation et la morphologie des produits. Une analyse cristallographique détaillée des monocristaux par diffraction ainsi qu'une description de leur structure lamellaire sont aussi présentées.

Model system for the crystallization of A-amylose

Starch, the main carbohydrate reserve of higher plants and one of the major sources of calories in the human diet, occurs in the form of microscopic granules (1-100 μm) consisting of a mixture of two homopolymers of glucose, namely linear amylose and branched amylopectin. The crystallinity of native starch (about 35%) results from the cluster organization of amylopectin. The short branches of the macromolecule form double helices that associate laterally to form crystalline lamellae. The characterization of these crystallites in the granule at a local scale remains problematic. To study the crystallization of starch, one can also develop simplified or "model" *in vitro* systems and focus on the behavior of short chains with a degree of polymerization that is similar to that of the short branches of amylopectin. During this work, we have prepared fractions of short amylose chains by hydrolyzing native starch granules and by *in vitro* enzymatic synthesis. These fractions have been crystallized in dilute aqueous solutions by slow diffusion of a precipitant. We have studied the influence of various parameters (degree of polymerization, polydispersity, concentration, temperature) on the mode of crystallization and morphology of the products. A detailed crystallographic analysis of single crystals by diffraction and a description of their lamellar structure are presented as well.
