UNIVERSITE ECOLOGIE BRETAGNE GEOSCIENCES LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

UNIVERSITÉ DE NANTES

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : « Génie des Procédés Agroalimentaires »

Par

« Pauline FAUCARD »

« Structure et propriétés de polysaccharides et copolymères biosourcés obtenus par synthèse enzymatique »

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 19 janvier 2018 »
Unité de recherche : INRA, UR 1268 BIA (Biopolymères, Interactions, Assemblages), Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Didier LE CERF	Professeur des Universités, Université de Rouen
Jean-François LE MEINS	Maître de Conférence, Université de Bordeaux

Composition du Jury :

Président :	Charles TELLIER	Professeur des Universités, Université de Nantes
Examinateurs :	Gabrielle VERONESE-POTOCKI	Directrice de Recherche, INRA, Toulouse
	Sonia MOLINA-BOISSEAU	Maître de Conférence, CERMAV, Grenoble
Dir. de thèse :	Denis LOURDIN	Directeur de Recherche, INRA, UR 1268 BIA, Nantes
Co-dir. de thèse :	Agnès ROLLAND-SABATE	Ingénieur d'études, INRA, UMR 408 SQPOV, Avignon

Publications et communications

Publications

P. Faucard, F. Grimaud, D. Lourdin, J. E. Maigret, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, J. L. Putaux, G. Potocki-Véronèse, A. Rolland-Sabaté. (2018). Macromolecular structure and film properties of enzymatically-engineered high molar mass dextrans. *Carbohydrate Polymers*, 181, 337−344.

F. Grimaud, P. Faucard, L. Tarquis, S. Pizzut-Serin, P. Roblin, S. Morel, S. Le Gall, X. Falourd, A. Rolland-Sabaté, D. Lourdin, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, G. Potocki-Véronèse. (2018). Enzymatic synthesis of polysaccharide-based copolymers. *Green Chemistry*.

Communications orales

P. Savourat, F. Grimaud, A. Rolland-Sabaté, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, G. Potocki-Véronèse, D. Lourdin. Relations structure-propriétés de nouveaux dextranes obtenus par synthèse enzymatique. **GDR Symbiose**, Autrans (France), 26-29 avril 2016.

P. Savourat, A. Rolland-Sabaté, F. Grimaud, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, G. Potocki-Véronèse, D. Lourdin. Caractérisation de polysaccharides biosourcés par couplage d'un fractionnement flux-force et de diffusion de la lumière. **RBPGO7**, Nantes (France), 23-24 juin 2016.

P. Savourat, A. Rolland-Sabaté, F. Grimaud, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, G. Potocki-Véronèse, D. Lourdin. Caractérisation de polysaccharides biosourcés par couplage d'un fractionnement flux-force et de diffusion de la lumière. **3ème école thématique de FFF**, Nantes (France), 6-9 juin 2016.

P. Savourat. Relations structure/propriétés de nouveaux biocopolymères obtenus par synthèse enzymatique. **Journée Jeunes Chercheurs BIA**, Nantes (France), 21 juin 2016.

F. Grimaud, P. Savourat, A. Rolland-Sabaté, S. Pizzut-Serin, L. Tarquis, C. Moulis, D. Lourdin, M. Remaud-Siméon, G. Potocki-Véronèse. Assessing structure property relationships of biosourced dextrans. **TrapCat1**, Toulouse (France), 12-14 octobre 2016.

P. Faucard, F. Grimaud, D. Lourdin, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, G. Potocki-Véronèse, A. Rolland-Sabaté. Structure and properties of new dextrans obtained by enzymatic synthesis. **253rd ACS National Meeting**, San Francisco (USA), 2-6 avril 2017.

P. Faucard. Structure et propriétés de nouveaux polysaccharides synthétisés par voie enzymatique. **Journée Jeunes Chercheurs BIA**, Nantes (France), 13 juin 2017.

A. Rolland-Sabaté, P. Faucard, F. Grimaud, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, G. Potocki-Véronèse, D. Lourdin. Properties and structure of high molar mass bio-designed dextrans obtained using enzyme. **5th EPNOE International Polysaccharide Conference**, Jena (Allemagne), 20-24 août 2017.

Communications par affiche

P. Savourat, A. Rolland-Sabaté, F. Grimaud, C. Moulis, M. Remaud-Siméon, G. Potocki-Véronèse, D. Lourdin. Structure-property relationships of new dextrans obtained by enzymatic synthesis. **The 3rd Biopolymers 2015 International Conference**, Nantes (France), 14-16 décembre 2015.

A mon mari, Bastien

A mes parents, mon frère et ma grand-mère

« Travail avec courage et persévérance car la tenacité permet d'atteindre l'excellence »

Didier Court

Remerciements

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre l'unité Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Nantes et le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de l'Institut National des Sciences Appliqués (INSA) de Toulouse et a été réalisée dans le cadre du projet ASPiRe. Travailler au sein de cette collaboration a été très enrichissant aussi bien sur le plan professionnel que humain.

Je voudrais adresser en premier lieu ma plus vive reconnaissance à Monsieur Denis Lourdin, Directeur de Recherche à l'INRA (BIA) ainsi qu'à Madame Agnès Rolland-Sabaté, Ingénieur d'études à l'INRA (SQPOV) pour m'avoir encadrée et avoir offert à une chimiste organicienne l'opportunité de travailler sur un projet à l'interface de la chimie analytique et de la chimie des matériaux. Cette immersion au sein de ces deux disciplines a été un grand enrichissement. Merci de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir permis de découvrir cet univers et en particulier la technique A4F. Merci pour le temps consacré à nos nombreux échanges aussi bien scientifiques que techniques qui ont permis d'aboutir à la réalisation de ce travail.

Je souhaite également remercier les membres du jury : Monsieur Charles Tellier, Professeur émérite à l'Université de Nantes, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'en avoir été le président. Que Monsieur Didier Le Cerf, Professeur au laboratoire Polymères – Biopolymères – Surfaces à l'Université de Rouen (PBS, UMR6270) et Monsieur Jean-François Le Meins, Maître de Conférence au Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques à l'Univesité de Bordeaux (LCPO, UMR5629) trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail et d'en être rapporteurs. Je remercie également Mesdames Gabrielle Véronèse-Potocki et Sonia Molina-Boisseau, pour avoir examiné cette thèse et apprécié le travail réalisé. Merci également pour vos remarques, questions et discussions constructives qui ont suivies.

Je voudrais maintenant remercier les collaborateurs du projet ASPiRe du LISBP sans qui ce travail n'aurait pas existé, en particulier, Florent Grimaud pour la qualité de nos échanges et surtout pour son travail acharné à fournir des échantillons les plus pures possible ! Merci également à Gabrielle Véronèse-Potocki, Magali Remaud-Siméon et Claire Moulis pour le management et la coordination du projet ainsi que la qualité de nos échanges lors des réunions.

Je remercie également les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, Gabrielle Véronèse-Potocki et Eric Leroy pour leurs conseils, leur appui scientifique et leur gentillesse.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements à Jean-Luc Putaux dont le chemin a croisé le mien au cours de ce travail. Jean-Luc, merci d'avoir prêté une oreille attentive à toutes mes questions et suggestions. Merci pour ton investissement à la caractérisation en microscopie des polysaccharides, pour ta disponibilité et pour nos discussions qui m'ont enrichie et portée pendant cette dernière année.

Je tiens à remercier Alain Buléon pour le temps consacré à nos questions, son regard expert et ces conseils avisés, Sophie Guilois pour m'avoir former aux techniques chromatographiques au début de ma thèse, Bruno Pontoire, pour son appui technique concernant la DRX, Xavier Falourd et Loïc Foucat, pour leur aide précieuse en RMN et notamment à l'identification du pourcentage de branchements des polysaccharides, Sophie Le Gall et Brigitte Laillet, pour leur gentillesse et leur disponibilité pour les manips de perméthylation, Catherine Garnier et Camille Jonchère, pour leur aide et appui scientifique concernant la rhéologie, Marie-Jeanne Crépeau, pour sa disponibilité lors de mes manips Skalar, Joëlle Davy, pour son aide aux manips de MEB à l'IMN (je peux rajouter un échantillon ?!), Pierre-Emmanuel Petit, pour sa confiance sur les manips de DRX effectuées à l'IMN.

Je voudrais remercier Marie Maubert qui a apporté sa motivation et ses qualités à la réalisation de ces travaux au cours de son stage au laboratoire.

Un grand merci général à l'ensemble de l'INRA-BIA en particulier les membres des équipes MC2 et Nano : stagiaires, doctorants, post-doctorants et permanents avec qui j'ai partagé mes journées et passé de très bons moments que ce soit des discussions scientifiques ou moins scientifiques, des pauses-cafés…

Un merci particulier à ces collègues hors du commun devenus de vrais amis : Merci à la team des « investigateurs », Jean-Eudes, un collègue de bureau comme on aimerait toujours avoir, merci pour ta disponibilité, ton soutien et tous ces bons moments partagés, et Karine, la surfeuse qui nous est arrivée tout droit de Roscoff, toujours prête à refaire une manip sortant de nulle part sous le stress de cette fin de thèse. Merci aussi à la team #fitgirls# pour tous ces moments sportifs et surtout moins sportifs.. Laëtitia, je n'oublierai pas ce premier « big » congrès à SF et tout ce qui s'en est suivi…, Chloé A., merci pour ton sourire et ta bonne humeur de chaque instant, et Marie, merci pour tes news/anecdotes en tout genre ! Merci aussi à Amine et Chloé V., deux superbes rencontres du début de cette thèse.

Je souhaite remercier mes amis qui ont été les témoins privilégiés de cette aventure. Merci pour votre soutien et vos encouragements au quotidien pendant ces trois ans : Dr Charlotte (binôme d'études !), Alexis (bientôt ton tour !), Amandine, Guillaume, Sylvain, Alice, Marine, Mathilde, les familles « Fontaine de Fer » et « Berthaudière »,…

Un très grand merci à mon mari, Bastien, pour son soutien et son amour inconditionnel, pour m'avoir écoutée et m'avoir poussée à toujours donner le meilleur de moi-même. J'espère pouvoir te rendre ce que tu m'as apporté lorsque ce sera ton tour…

Je remercie également toute ma famille, en particulier mes parents, mon petit frère et ma grand-mère pour leurs présences, leurs soutiens et leurs confiances illimitées. Merci d'avoir toujours cru en moi tout au long de mes études. Merci de m'avoir laissé faire mes choix librement sans jamais me mettre la pression et de m'avoir donné touts les moyens pour réussir ce qui me permet d'en être là aujourd'hui…

TABLE DES MATIERES

Publications et communications **3**

Remerciements **9**

INTRODUCTION GENERALE **23**

CHAPITRE 1 : Etude bibliographique **29**

Partie 1 : Propriétés des polymères en solution et techniques de caractérisation **31**

1. Caractéristiques d'un polymère en solution 31

1.1. Masse molaire et distribution de masse molaire 31

1.2. Flexibilité 33

1.3. Rayons d'un polymère en solution 34

2. Organisation des polymères en solution 36

3. Techniques de caractérisation 37

3.1. Chromatographie d'exclusion stérique 39

3.2. Fractionnement par couplage flux-force hydrodynamique 41

Partie 2 : Les α-glucanes de l'étude **49**

1. Synthèse enzymatique des α-glucanes : les glucane-saccharases 50

2. Les dextranes 52

2.1. Obtention des dextranes 52

2.2. Structure des dextranes 55

2.2.1. Structure moléculaire et macromoléculaire 55

2.2.1.1. Détermination du pourcentage de liaisons glucosidiques par méthylation 55

2.2.1.2. Caractérisation par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) 56

2.2.1.3. Caractéristiques physico-chimiques 57

2.2.1.4. Détermination des caractéristiques moléculaires et macromoléculaires 57

2.2.2. Structure cristalline 59

2.3. Propriétés rhéologiques des dextranes 63

2.4. Propriétés thermiques des dextranes 67

2.5. Mise en forme et propriétés mécaniques des dextranes 68

2.6. Applications des dextranes 70

2.6.1. Applications cliniques et biomédicales 70

2.6.2. Applications en chromatographie 71

2.6.3. Applications en agroalimentaire 72

3. L'amylose 73
3.1. Obtention des amyloses 73
3.2. Structure des amyloses 75
3.2.1. Structure moléculaire et macromoléculaire 75
3.2.2. Structure cristalline 76
3.3. Formation de complexes avec l'amylose 77
3.4. Applications des amyloses 79
4. Les alternanes 79
4.1. Structure et obtention des alternanes 79
4.2. Propriétés rhéologiques des alternanes 81
4.3. Applications des alternanes 82
5. Les mutanes 82
5.1. Structure et obtention des mutanes 82
5.2. Propriétés des mutanes 84
5.3. Applications des mutanes 84
6. Les reutéranes 84
6.1. Structure et obtention des reutéranes 84
6.2. Applications des reutéranes 86
Partie 3 : Les copolymères à blocs à base de polysaccharides 87
1. Généralités sur les copolymères à blocs 87
1.1. Définition 87
1.2. Principe d'auto-organisation des copolymères à blocs 88
1.2.1. Thermodynamique des copolymères à blocs 88
1.2.2. Diagramme de phase ordre-désordre 90
1.2.3. Formation des domaines 92
1.3. Auto-assemblage en milieu aqueux 93
1.3.1. Influence du solvant dans un mélange de copolymères à blocs 93
1.3.2. Détermination des paramètres structuraux des systèmes micellaires et techniques de caractérisation 95
2. Obtention et propriétés de copolymères à blocs synthétiques/polysaccharidiques 96
3. Structure et propriétés de copolymères à blocs « tout » polysaccharides 98

CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes 103

1. Production enzymatique des polysaccharides et leurs caractéristiques réalisées au LISBP 105

1.1. Dextranes produits à partir de l'enzyme DSR-OK 105

1.2. Dextranes branchés à partir du dextrane commercial D500 105

1.3. Dextranes produits à partir de l'enzyme DSR-M 106

1.4. Alternane produit à partir de l'enzyme ASR 107

1.5. Polysaccharides produits à partir de GS-X 107

1.6. Mutanes produits par les enzymes GTF-J et GTF-Si 107

1.7. Synthèse d'oligosaccharides et de copolymères dibloc et tribloc 108

2. Caractérisation moléculaire et macromoléculaire 108

2.1. Détermination des liaisons inter-oses par la méthode de perméthylation des sucres 108

2.2. Détermination de la solubilité et des paramètres de structure 110

2.2.1. Etude de la solubilité dans divers solvants 110

2.2.2. Détermination de la concentration des solutions d'*α*-glucanes 110

2.2.3. AF4-UV-MALLS-DRI 111

2.2.4. HPSEC-MALLS-DRI 115

2.2.5. Détermination de la tailles des particules par diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS) 115

2.2.6. Complexation à l'iode de l'oligoamylose et du copolymère amylose-*b*-alternane 116

2.3. Comportement rhéologique des solutions d'*α*-glucanes en régime dynamique linéiaire 116

2.4. Caractérisation par microscopie 118

3. Détermination des propriétés physiques des poudres et matériaux 120

3.1. Etude par calorimétrie de la température de transition vitreuse et de la température de recristallisation 120

3.2. Dégradation des α-glucanes par ATG 122

3.3. Caractérisation structurale par diffraction des rayons X 122

3.4. Détermination de la cristallinité par résonance magnétique nucléaire (RMN) 124

3.5. Fabrication des matériaux 124

3.5.1. Fabrication de films obtenus par casting 124

3.5.2. Fabrication de fils 125

3.5.3. Thermomoulage 125

3.6. Analyse thermomécanique dynamique (DMA) en humidité contrôlée 126

3.7. Propriétés mécaniques aux grandes déformations 127

FICHE MÉMO : DIFFÉRENTES STRUCTURES DES POLYSACCHARIDES ÉTUDIÉS 129

CHAPITRE 3 : Caractérisation de nouveaux dextranes de très hautes masses molaires obtenus par synthèse enzymatique 131

Introduction..... 133

Publication 1..... 135

1. Abstract 135
2. Introduction 136
3. Materials and methods..... 137
   - 3.1. Enzyme Production and Enzymatic Assay 137
   - 3.2. Dextran Synthesis 138
   - 3.3. Quantification of Proteins, Glucose, Fructose and Leucrose in Purified Dextrans 138
   - 3.4. ^{1}H-NMR Analysis..... 139
   - 3.5. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Coupled with Multi-angle Laser Light Scattering and Differential Refractometric Detection (AF4-MALLS-DRI) 139
   - 3.6. Transmission Electron Microscopy (TEM) 140
   - 3.7. Differential Scanning Calorimetry (DSC) 140
   - 3.8. Film Preparation by casting..... 140
   - 3.9. Dynamic Mechanical Analysis 141
4. Results and discussion 141
   - 4.1. Macromolecular Characteristics of Dextrans in Solution..... 142
   - 4.2. Glass Transition and Crystallization of Dextran Films 148
   - 4.3. Mechanical Properties of Films as a Function of Humidity 150
5. Conclusion 152
6. Acknowledgements..... 152
7. Supplementary Data..... 154
   - 7.1. Solubility Assay..... 154
   - 7.2. Digestion by the proteinase K (*Tritirachium album*)..... 155
   - 7.3. X-ray diffraction..... 156

Résultats complémentaires à la publication 1..... 158

1. Détermination de la taille des dextranes par QELS 159
2. Comportement rhéologique des dextranes produits par l'enzyme DSR-OK..... 160
3. Impact du fructose sur les propriétés des dextranes 163
   - 2.1. Effet du fructose sur les propriétés rhéologiques 164
   - 2.2. Effet du fructose sur les propriétés thermiques..... 165

2.3. Effet du fructose sur les propriétés mécaniques 167

Conclusion 169

CHAPITRE 4 : Caractérisation de dextranes commerciaux branchés à l'aide d'enzymes spécifiques 173

1. Introduction 175

2. Structure macromoléculaire 176

3. Etude du comportement viscoélastique des dextranes en solution aqueuse 180

4. Propriétés thermiques 181

5. Propriétés de recristallisation 185

6. Influence du type de branchement sur les propriétés mécaniques des différents matériaux 187

7. Conclusion 191

CHAPITRE 5 : Caractérisation d'α-glucanes contenant différents types de liaisons osidiques 195

1. Introduction 197

2. Dextranes produits par l'enzyme DSR-M 199

2.1. Caractéristiques en solution 199

2.2. Structure cristalline 202

2.3. Propriétés thermiques et mécaniques 203

3. Alternane produit par l'enzyme ASR 205

3.1. Caractéristiques macromoléculaires de l'alternane en solution 205

3.1.1. AF4-UV-MALLS-DRI 206

3.1.2. Caractérisation par microscopie électronique en transmission 210

3.2. Propriétés rhéologiques de l'alternane 216

3.3. Structure cristalline de l'alternane 217

3.4. Propriétés thermiques de l'alternane 218

3.5. Propriétés mécaniques de l'alternane 219

4. *α*-glucanes produits par GS-X 219

4.1. Taille et conformation en solution des *α*-glucanes produits par GS-X 219

4.2. Propriétés rhéologiques des *α*-glucanes produits par GS-X 222

4.3. Structure cristalline des *α*-glucanes produits par GS-X 223

4.4. Propriétés thermiques des *α*-glucanes produits par GS-X 224

4.5. Propriétés mécaniques des *α*-glucanes produits par GS-X 225

5. Mutanes 226

DISCUSSION GENERALE 229

1. Conformation en solution et solubilité des α-glucanes 233
2. Impact du type/taux de liaisons osidiques et de la masse molaire sur les propriétés des polysaccharides 234
   - 2.1. Température de transition vitreuse 234
   - 2.2. Cristallinité 236
   - 2.3. Pouvoir filmogène 236
3. Impact des impuretés sur les propriétés 237
4. Choix des blocs d'intérêt pour la synthèse de copolymères à blocs 237
5. Complément : détermination des propriétés d'un mélange dextrane/alternane à 50/50 (p/p) . 238

CHAPITRE 6 : Synthèse et caractérisation du copolymère dextrane-b-alternane et amylose-b-alternane 243

Introduction 245

Publication 2 246

1. Abstract 246
2. Introduction 247
3. Experimental 250
   - 3.1. Enzyme Sources 250
   - 3.2. Enzyme activity assays 250
   - 3.3. Production of acceptors 251
   - 3.4. Oligosaccharide elongation and copolymer synthesis 251
   - 3.5. Copolymer purification 252
   - 3.6. α-Glucan structure analysis 252
4. Results and discussion 255
   - 4.1. Amylose block synthesis and elongation using ASR 257
   - 4.2. Alternan block synthesis and elongation using DSR-M 258
   - 4.3. Production, purification and analysis of a triblock copolymer. 260
   - 4.4. Copolymer conformation in solution 262
5. Conclusions 264
6. Acknowledgements 265

Résultats complémentaires à la publication 267

1. Propriétés d'organisation des échantillons du lot 2 267
   - 1.1. Copolymère alternane-*b*-dextrane 267
   - 1.2. Copolymère amylose-*b*-alternane 268

2. Propriétés thermiques des échantillons du lot 2 273

3. Compléments..... 273

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 279

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....283

Glossaire..... 307

Liste des tableaux 311

Liste des figures 313

INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, les polymères occupent une place majeure dans de nombreux secteurs d'activité : pharmaceutique, cosmétique, électronique, automobile, bâtiment… en tant que texturant, matériaux de structure ou additifs. Afin de développer de nouveaux matériaux d'intérêt pour remplacer les polymères à base de carbone fossile et étendre le panel de matériaux biosourcés, les polysaccharides font l'objet de nombreuses études. En effet, ils suscitent un vif intérêt depuis une cinquantaine d'année chez les scientifiques et notamment dans le secteur industriel tel que l'emballage, la santé, l'hygiène, la papeterie. Ces biopolymères sont issus de ressources renouvelables et abondantes telles que les micro-organismes (pullulane, dextrane…), les végétaux (cellulose, amidon, alginate), les animaux (chitine, acide hyaluronique…) et fournissent une alternative intéressante aux polymères d'origine pétrolière. Les polysaccharides peuvent être également synthétisés par voie enzymatique, ce qui permet de contrôler et de concevoir de nouvelles structures. Ces macromolécules sont biodégradables (par une voie hydrolytique, enzymatique ou par l'intermédiaire de microorganismes), biocompatibles, généralement très hydrophiles, et dans un certain nombre de cas, hydrosolubles. Bien que leurs propriétés mécaniques soient insuffisantes pour des applications dans le domaine des matériaux de structure, leur sensibilité naturelle à l'eau et leur biocompatibilité peuvent être mises à profit dans des applications à haute valeur ajoutée, par exemple des matériaux stimulables ou des matériaux à usage biomédical. Ainsi les polysaccharides ont pris une place importante dans le monde des polymères comme le prouve le nombre croissant d'études les concernant et qui touchent à des applications de plus en plus diversifiées.

L'optimisation des propriétés pour atteindre un cahier des charges est classiquement obtenue par mélange de composés, avec un résultat qui est souvent une moyenne des propriétés des composés isolés. Cela peut aboutir à la séparation de phase des composés, qui peut être souhaitée ou non. De façon analogue à ce qui est développé dans le monde des polymères synthétiques, on peut envisager d'obtenir de nouvelles propriétés par la synthèse de copolymères de polysaccharides. Cette approche qui a été très peu étudiée jusqu'à présent, consiste à lier de manière covalente deux polysaccharides aux propriétés contrastées (différence de transition vitreuse, de cristallinité, de solubilité...).

Cette thèse intitulée « Structure et propriétés de polysaccharides et copolymères biosourcés obtenus par synthèse enzymatique » a été réalisée dans le cadre du projet ASPiRe (**A**ssessing **S**tructure **P**roperty **Re**lationships of Biosourced Copolymers » financé par l'ANR. Ce projet implique deux laboratoires : l'équipe Catalyse et Ingénierie Moléculaire Enzymatique du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de Toulouse et l'équipe Matériaux, Création et Comportement (MC2) de l'unité de recherches Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) de l'INRA de Nantes. L'équipe de recherche MC2, au sein de laquelle est réalisée cette thèse, étudie depuis plusieurs années le comportement de matériaux agrosourcés et notamment l'amidon. Le projet ASPiRe a pour finalité de développer de nouveaux matériaux en utilisant des polymères issus de la biomasse. Il vise plus particulièrement à l'élaboration de nouveaux biocopolymères constitués uniquement de polysaccharides et obtenus par voie enzymatique en vue d'applications pharmaceutiques, biomédicales, cosmétiques, agroalimentaire…. En effet, leur production par fermentation ou par procédé enzymatique est efficace, non dépendante des conditions climatiques, peut être obtenue avec une régio- et stéréo-spécificité élevée dans des conditions douces et avec des réactions secondaires limitées, facilitant la récupération du polysaccharide (Kadokawa, 2011). La stratégie du projet consiste à étudier les relations structure/propriétés de différents polysaccharides obtenus par synthèse enzymatique afin de comprendre l'implication de chaque polysaccharide dans les propriétés des copolymères diblocs. La synthèse de copolymères à blocs constitués de deux polysaccharides est, elle aussi, réalisée par voie enzymatique et apparaît comme un challenge au vu de l'absence de publication les concernant. Cette synthèse allie d'une part un procédé totalement « vert » et d'autre part l'obtention de propriétés nouvelles grâce à l'assemblage par liaison covalente de deux blocs polysaccharidiques. Pour cela, l'étude des relations structure macromoléculaire/propriétés des matériaux issus des polysaccharides qui constitueront les éléments primaires des copolymères à blocs est indispensable et c'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse.

L'objectif principal de cette thèse a été de caractériser les « blocs » de polysaccharides, constitutifs des biocopolymères, afin d'étudier leurs propriétés en solution et les propriétés thermiques et mécaniques des matériaux formés afin de concevoir les assemblages de polysaccharides aux propriétés les plus contrastées possible.

Nous nous sommes intéressés tout particulièrement à la structure macromoléculaire de chaque polysaccharide en utilisant des techniques de caractérisation de la taille en solution comme le fractionnement par couplage flux-force hydrodynamique couplé à un détecteur de diffusion de la lumière et un détecteur réfractométrique (AF4-MALLS-DRI) et la chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC). Les propriétés physico-chimiques comme la température de transition vitreuse, la température de recristallisation, la solubilité, la filmabilité, la cristallinité ont été étudiés. Enfin, la mise en forme des matériaux de polysaccharides a été réalisée afin de déterminer les propriétés mécaniques aux petites et grandes déformations.

Ce manuscript de thèse s'articule en 6 chapitres :

Le *Chapitre 1* est consacré à un état de l'art concernant les grandeurs caractéristiques de polymère en solution, puis les structures et les propriétés des polysaccharides, et notamment des α-glucanes par la suite étudiés. Enfin, des généralités sur les copolymères à blocs y sont présentées, avec une attention particulière pour les propriétés de copolymères à bloc synthétiques et polysaccharidiques.

Le *Chapitre 2* recence l'ensemble du matériel et des méthodes utilisés tout au long de ce travail.

Le *Chapitre 3* fait l'objet d'une publication sur les structures et propriétés de différents dextranes de très hautes masses molaires obtenus par synthèse enzymatique. Grâce à l'ingénierie enzymatique, différents dextranes possédant divers branchements et taux de branchements ont été synthétisés et leurs propriétés déterminées. Une seconde partie (non publiée) présente des résultats complémentaires à la publication, notamment l'impact du fructose, impureté résiduelle de synthèse, sur les propriétés rhéologiques, thermiques et mécaniques de ces dextranes.

Le *quatrième Chapitre* est consacré à l'étude d'autres dextranes branchés obtenus cette fois-ci par greffage enzymatique de branchements sur un dextrane commercial de 500 000 $g.mol^{-1}$. Leurs différences en termes de structure et de propriétés y sont détaillées.

Le *Chapitre 5* aborde l'influence du type de liaisons osidiques dans une chaîne linéaire de polysaccharides sur la structure et sur les propriétés thermiques et mécaniques des matériaux

polysaccharidiques. Ici, différents polysaccharides comportant des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$, $\alpha(1\rightarrow4)$, et/ou $\alpha(1\rightarrow3)$ sont comparés.

Un bilan des résultats obtenus dans ces trois derniers chapitres est dressé ensuite dans une *discussion générale.* A partir de ces considérations, les assemblages de polysaccharides pouvant être envisagés au vu des propriétés déterminées sont proposés en vue de la réalisation de copolymères à blocs. Une étude préliminaire sur la réalisation de mélanges de polysaccharides est également présentée, montrant l'intérêt du choix de ces polysaccharides.

Le *Chapitre 6* fait l'objet d'une publication sur la synthèse et les propriétés de deux copolymères à blocs (alternane-*b*-dextrane et amylose-*b*-alternane) acceptée dans le journal Green Chemistry. Les caractéristiques de ces copolymères sont présentées en résultats complémentaires.

Enfin, nous tracerons les *perspectives* à court et long termes de ce travail.

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Propriétés des polymères en solution et techniques de caractérisation

1. Caractéristiques d'un polymère en solution

Les propriétés des polymères dépendent de leurs caractéristiques moléculaires. Afin de comprendre les relations entre la taille du polymère en solution et sa masse molaire, l'étude du comportement hydrodynamique est essentielle. Aussi, la conformation d'un polymère en solution peut être déduite des données thermodynamiques et géométriques. Les principales caractéristiques des polymères linéaires en solution diluée seront décrites en première partie : masses molaires, rayons de giration et hydrodynamique et conformation en solution. Une deuxième partie expliquera l'organisation des polymères en solution puis deux techniques de fractionnement utilisées pendant ce travail de thèse pour étudier ces caractéristiques seront détaillées en troisième partie.

1.1. Masse molaire et distribution de masse molaire

La masse molaire M est la caractéristique la plus commune pour définir un polymère. Elle est égale au produit de la masse M_0 du motif élémentaire par le degré de polymérisation DP selon :

$$M = M_0\, DP \qquad [1]$$

Or, la majorité des macromolécules consiste en un mélange de chaînes de nombre d'unités différent, donc de DP et de masse molaire différents. Au sein d'un même échantillon, celles-ci n'ont donc pas une masse molaire unique. Cette hétérogénéité est décrite par des fonctions de distribution en masse molaire. C'est pourquoi en science des polymères le concept de masse molaire moyenne est utilisé. Le degré de polymérisation moyen en nombre $\overline{DP_n}$ est défini comme la moyenne en nombre des degrés de polymérisation $\overline{DP_i}$ de chaque espèce i :

$$\overline{DP_n} = \frac{\sum_i N_i DP_i}{\sum_i N_i} \qquad [2]$$

où N_i est le nombre de macromolécules i.

Différentes méthodes de calcul ainsi que différentes grandeurs numériques définissent la masse molaire moyenne d'un polymère ($\overline{M}_n$ $\overline{M}_w$, $\overline{M}_z$, $\overline{M}_v$) variant généralement dans l'ordre suivant : $\overline{M}_n < \overline{M}_v < \overline{M}_w$

< $\bar{M}_z$. $\bar{M}_n$ correspond à la masse molaire moyenne en nombre d'un polymère polydisperse et la masse molaire moyenne en poids est définie par $\bar{M}_w$. Celle-ci est particulièrement sensible aux grosses molécules alors que $\bar{M}_n$ est sensible aux molécules les plus abondantes ; de ce fait $\bar{M}_w$ est toujours supérieure à $\bar{M}_n$. $\bar{M}_v$ correspond à la masse molaire moyenne viscosimétrique et dépend de la viscosité intrinsèque [η] de la molécule dans le solvant considéré. $\bar{M}_z$ définit la masse molaire moyenne en z. Elles sont définies comme suit, et dépendent des masses M_i de chaque espèce i (Figure 1) (Kasaai, 2017) :

$$\bar{M}_n = M_0 \overline{DP}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad [3]$$

$$\bar{M}_w = M_0 \overline{DP}_w = \frac{\sum_i N_i {M_i}^2}{\sum_i N_i M_i} \quad [4]$$

$$\bar{M}_z = \frac{\sum_i N_i {M_i}^3}{\sum_i N_i {M_i}^2} \quad [5]$$

$$\bar{M}_v = \left(\frac{\sum_i N_i {M_i}^{a+1}}{\sum_i N_i M_i}\right)^{1/a} \quad [6]$$

où a est une constante calculée pour un système polymère-solvant donné selon la relation de Mark-Houwink-Sakurada :

$$[\eta] = K_a \, {\bar{M}_v}^a \quad [7]$$

avec K_a une constante dépendant aussi d'un système polymère-solvant donné.

La dispersité du polymère, aussi appelée polydispersité est souvent calculée grâce au ratio $\bar{M}_w/\bar{M}_n$. Plus la valeur est proche de 1, plus l'échantillon tend vers la monodispersité. Cette valeur ne fournit toutefois aucune indication sur la dissymétrie de la distribution.

La fonction de distribution en poids W(M)dM représente la fraction en poids de l'échantillon apporté par les molécules de masse molaire allant de M à M + dM et est représentée sur la Figure 1.

Les méthodes expérimentales permettant d'obtenir des courbes de distribution sont basées sur le fractionnement du polymère étudié. On compte parmi ces techniques l'ultracentrifugation (UC), la chromatographie hydrodynamique (HDC), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et le fractionnement par couplage flux-force (FFF). Ces deux dernières techniques seront présentées par la suite.

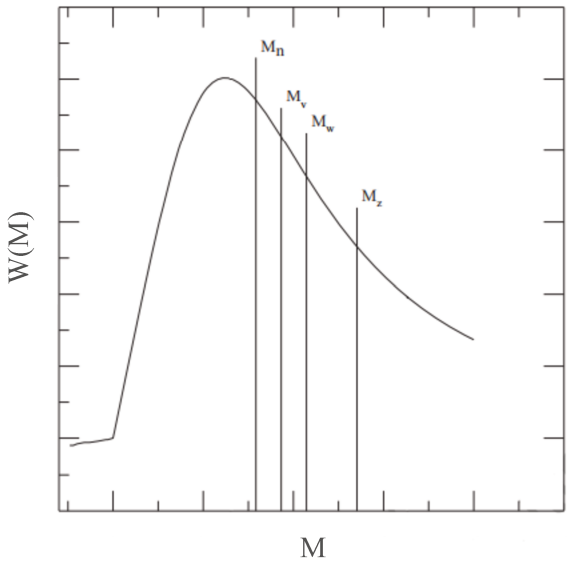


Figure 1 – Profil de distribution de masse molaire et comparaison des différentes grandeurs.

1.2. Flexibilité

Une chaîne est dite totalement flexible si les orientations des monomères successifs sont décorrélées. La distance quadratique $\vec{r}_0^2$ entre les deux extrémités d'une chaîne réelle constituée de n monomères de longueur l peut être assimilée à une chaîne à articulations libres (dite chaîne de Kuhn) constituée de N_k segments de longueur L_k faisant entre elles des angles aléatoires comme sur la Figure 2 (Kuhn, 1936 ; 1939). Pour une chaîne kuhnienne, on a :

$$\vec{r}_0^2 = N_K L_K^2 = nl^2$$

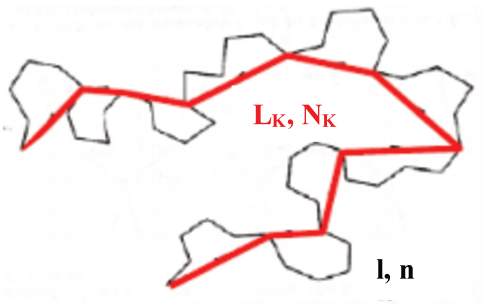


Figure 2 - Schéma d'une chaîne Kuhnienne

Un des paramètres permettant de déterminer la conformation d'une chaîne de polymère est la longueur de persistance L_p. Cette grandeur reflète la rigidité dans le cas d'une chaîne flexible et mesure la distance sur laquelle une chaîne de polymère suit la même direction. Pour un polymère linéaire, L_p est relié à C_∞

(Flory, 1969) où C_∞ caractérise l'effet des interactions à courtes distances sur les restrictions de rotation d'angle selon $C_\infty = \lim_{n\to\infty} \vec{r}_0^2/nl^2$:

$$C_\infty = \frac{2L_P}{l} - l \qquad [8]$$

avec l la projection moyenne d'un monomère le long de la chaîne.

1.3. Rayons d'un polymère en solution

Soit une chaîne formée de n segments identiques, pouvant prendre toutes les orientations les uns par rapport aux autres, limitée par les points $\vec{r}_j$ (j = 0, 1, …, n). En solution, la distance moyenne est caractérisée par la moyenne du carré de la distance entre les extrémités de la chaîne $\vec{r}^2$:

$$\vec{r}^2 = < r^2 > = < (\vec{r}_0 - \vec{r}_n)^2 > \qquad [9]$$

Le rayon de giration $\bar{R}_G$ est défini géométriquement comme la racine de la moyenne du carré des distances des segments de la macromolécule par rapport à son centre de gravité et suit la relation suivante :

$$\bar{R}_G{}^2 = \frac{1}{2(n+1)^2} \sum_{ij}^{n+1} (\vec{r}_i - \vec{r}_j)^2 \qquad [10]$$

Expérimentalement, $\bar{R}_G$ peut être déterminé par diffusion statique de la lumière (SLS) et par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Dans le cas d'une pelote statistique, $\bar{R}_G$ est proportionnel à la racine carrée de $< r^2 >$:

$$\bar{R}_G = \left(\frac{\vec{r}^2}{6}\right)^{0,5} \qquad [11]$$

$\bar{R}_H$ et $\bar{R}_\eta$ correspondant respectivement aux rayons moyens hydrodynamiques et viscosimétriques résultent d'interactions entre le polymère et le solvant (Smith *et al.*, 2007). Ils peuvent être obtenus par diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS) et par SLS combinée à la viscosimétrie. En solution, les molécules sont soumises à une diffusion constante qui résulte de fluctuations thermiques dans la suspension, appelé le mouvement Brownien. Le rayon hydrodynamique R_H est la taille effective de la molécule détectée à partir de son mouvement brownien. Le coefficient de diffusion translationnel D d'une particule sphérique est lié à la taille de l'objet de rayon R_H dans un milieu de viscosité η, à une

température T par la relation de Stockes-Einstein. Cette relation fait intervenir la constante de Boltzmann k_B et peut s'écrire de la façon suivante :

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad [12]$$

Le rayon viscosimétrique R_η suit la relation ci-après :

$$R_\eta = \left(\frac{3[\eta]_w M_w}{10\pi N_A}\right)^{1/3} \quad [13]$$

où $[\eta]_w$ est la viscosité intrinsèque moyenne en poids et N_A le nombre d'Avogadro.

Le rayon thermodynamique $\bar{R}_T$ est défini quant à lui par les domaines d'interaction entre 2 macromolécules et peut être mesuré par SLS. Il dépend du second coefficient du Viriel A_2 quantifiant la qualité du solvant par rapport au polymère. En « bon » solvant, les interactions polymère-solvant sont dominantes par rapport aux interactions polymère-polymère et $A_2 > 0$. En « mauvais » solvant, les interactions polymère-polymère sont majoritaires conduisant à l'agrégation des chaînes et $A_2 < 0$. Le rayon thermodynamique $\bar{R}_T$ suit la relation ci-après :

$$R_T = \left(\frac{3A_2 {M_w}^2}{16\pi N_A}\right)^{1/3} \quad [14]$$

Il est possible d'obtenir des informations sur la conformation en solution et la forme du polymère grâce au paramètre de structure ρ défini par le rapport $\bar{R}_G/\bar{R}_H$ (Burchard, 1977 ; 1983 ; 1999). Ce ratio varie selon la forme de la macromolécule et prend notamment les valeurs de 0,778 pour une sphère compacte et 2,050 pour des pelotes statistiques polydisperses (Tableau 1). Lorsque le nombre de ramifications augmente, cette valeur diminue ; elle croît lorsque la dispersité de l'échantillon augmente.

Tableau 1 – Valeurs du paramètre de structure ρ pour différentes conformations d'une macromolécule en bon solvant (Burchard, 1999).

Structure	**$\rho = \bar{R}_G/\bar{R}_H$**
Sphère dure homogène	0,778
Pelote statistique, linéaire, monodisperse	1,780
Pelote statistique, linéaire, polydisperse	2,050
Batônnet rigide (N>3)	$\lim_{k\to\infty}(1/3\ ln\ N)^{1/k}$
Microgels	0,300-0,600

2. Organisation des polymères en solution

Il existe trois régimes de concentration à savoir le régime dilué, le régime critique et le régime semi-dilué décrivant les solutions de polymère neutre en « bon » solvant. Lorsque la concentration des chaînes de polymères est suffisamment faible, c'est-à-dire que les chaînes sont éloignées et isolées les unes par rapport aux autres, les solutions sont dites diluées. Lorsque la concentration augmente, les chaînes se rapprochent jusqu'à atteindre une concentration critique de recouvrement C*, concentration à partir de laquelle les chaînes s'enchevêtrent (appelée aussi concentration d'enchevêtrement).

Le régime est dit semi-dilué lorsque la concentration est supérieure à C*. Dans ce régime, les chaînes s'interpénètrent pour former un réseau. La distance moyenne entre deux contacts successifs d'une chaîne avec les autres chaînes est représentée par la longueur de corrélation ξ. Les différents régimes sont représentés sur la Figure 3.

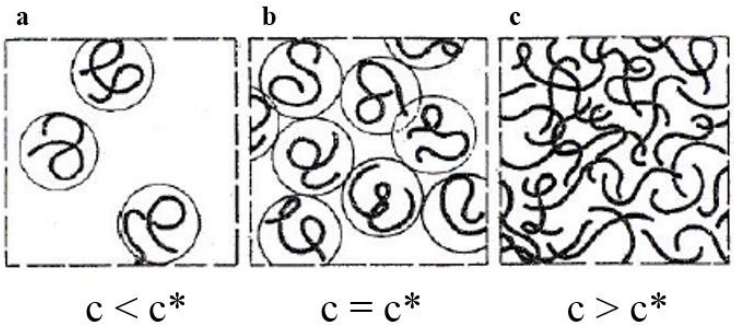


Figure 3 - Recouvrement des chaînes lorsque la concentration c augmente. a. Solution diluée. **b.** Concentration critique de recouvrement**. c.** Solution semi-diluée (la solution concentrée est obtenue lorsque c >> c*).

C* peut être définie de quatre manières différentes :

$$C^*_{RG} = \frac{M_w}{N_A \times \frac{4\pi}{3} \times {R_G}^3} \quad [15]$$

$$C^*_{RH} = \frac{M_w}{N_A \times \frac{4\pi}{3} \times {R_H}^3} \quad [16]$$

$$C^*_{A2} = \frac{1}{A_2 \times M_w} \quad [17]$$

$$C^*_{\eta} = \frac{1}{[\eta]} \quad [18]$$

En milieu semi-dilué, les chaînes de polymère enchevêtrées forment des sous-unités appelées « blobs » de diamètre ξ, suivant le modèle de De Gennes (1979). ξ représente la portée des interactions de type volume exclu ainsi que la maille du réseau, définie comme la distance entre deux points de contact de deux chaînes distinctes. La valeur de ξ dépend essentiellement de la concentration (Brown & Nicolai, 1993). Ces blobs, contenant chacun g segments qui ne sont pas en interaction avec les segments des autres chaînes peuvent être définis de deux façons :

- les g segments situés à l'intérieur des blobs obéissent à une statistique de type volume exclu c'est-à-dire en bon solvant : $\xi \alpha g^{3/5}$
- les N/g blobs suivent, une statistique gaussienne et la distance quadratique moyenne entre les extrémités de la chaîne s'exprime par : $\langle R^2 \rangle \alpha (N/g) \xi^2$, N représentant le nombre de monomères.

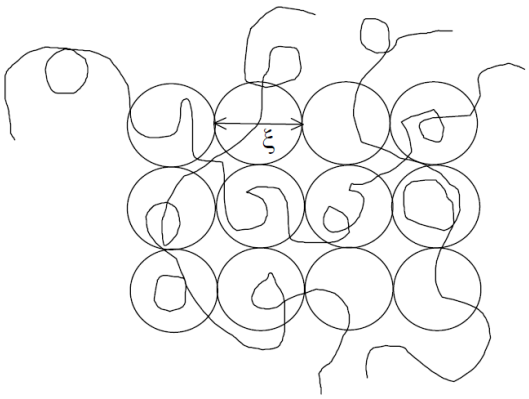


Figure 4 - Représentation schématique d'une solution semi-diluée de polymère. Les cercles représentent les unités "blobs" de taille ξ.

3. Techniques de caractérisation

Les propriétés des polymères sont fonction de leurs caractéristiques moléculaires. L'étude du comportement hydrodynamique d'un polymère est basée sur l'analyse des relations entre la taille du polymère en solution et sa masse molaire. La conformation d'un polymère en solution peut ainsi être déduite des critères thermodynamiques et géométriques. Dans cette partie, les techniques disponibles pour étudier ces caractéristiques seront détaillées. Il existe différentes techniques pour caractériser/séparer un échantillon par la taille (Tableau 2). La ***chromatographie d'exclusion stérique*** et le ***fractionnement par couplage flux-force hydrodynamique*** couplé à la ***diffusion de la lumière multi-angle*** ont été largement utilisés durant cette thèse et sont détaillés ci-après.

Néanmoins, on peut citer *l'ultra-filtration* ou *l'ultra-centrifugation* qui permettent de fractionner des macromolécules ou des particules en solution. Cette dernière est particulièrement utilisée dans le cas des protéines, des polysaccharides et des polymères de fortes masses molaires et permet d'obtenir les différentes masses molaires moyennes ainsi que les distributions en masse molaire et la conformation de la molécule en solution (Harding *et al*., 2010 ; Scott *et al.,* 2005). Il existe deux types d'expérimentations complémentaires appelées respectivement vitesse de sédimentation et équilibre de sédimentation.

Les techniques d'imagerie par *microscopie électronique* permettent d'accéder à la taille et à la forme des particules d'un échantillon. Elles offrent également des informations relatives à la composition chimique et à la structure (de l'échelle nanométrique à l'échelle atomique) de l'ensemble de la particule (TEM) et de sa surface (SEM, AFM), ainsi qu'à ses propriétés de surface (AFM).

La *diffusion dynamique de la lumière* (Dynamic Light Scattering, DLS) repose sur l'analyse de la diffusion quasi-statique de la lumière diffusée par des particules browniennes alors que la *diffusion statique et angulaire de la lumière* (Static Light Scattering, SLS) repose sur l'analyse de l'intensité diffusée par les particules et la dépendance de cette dernière à l'angle de diffusion. La *diffusion des rayons X aux petits angles* (SAXS) est une technique non intrusive conceptuellement analogue à la technique SLS mais qui utilise un faisceau de rayons X à la place de la lumière visible. C'est une diffusion élastique. Les très faibles longueurs d'ondes permettent d'accéder à des informations sur la taille et la structure de particules sur des échelles inférieures au SLS (<100 nm) avec un angle de collection bien inférieur, et sans nécessité de connaître les propriétés optiques des particules. La *diffusion des rayons X aux grands angles* (WAXS) est bien adaptée à l'étude de nanoparticules et de matériaux peu crisallisés, voire amorphes. C'est une technique statistique qui ne fournit qu'une structure moyenne d'un échantillon, s'il existe des inhomogénéités de taille ou de structure celles-ci ne seront pas déterminées avec certitude.

Tableau 2 - Différentes techniques pour caractériser et/ou séparer un échantillon par la taille : analyse dimensionnelle (taille, distribution en taille et/ou forme).

Type	Technique		Informations
Séparation en batch	Ultra-centrifugation Filtration		Distribution en taille
Séparation en ligne (ou couplée)	***Chromatographie***	***Exclusion stérique (SEC)***	Distribution en taille (R_H, …)
		Hydrodynamique (HDC)	
		Capillary hydrodynamic fractionation (CHDF)	
	Electrophorèse capillaire (CE)		
	Fractionnement Flux-Force (FFF)	***Force hydrodynamique (AF4, A4F, Fl-FFF)*** Sedimentation (Sd-FFF)	Distribution en taille et masse
Imagerie	Microscopies électroniques	Balayage (SEM) Transmission (TEM) Force atomique (AFM)	Distribution en taille, nombre de particules, forme
Spectroscopie	***Diffusion de la lumière (Light scattering)***	Dynamique (DLS), statique (SLS), ***multi-angle (MALS)***	Taille, distribution en taille
	Diffusion des rayons X	Petits angles (SAXS)	
		Grands angles (WAXS)	

3.1. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique SEC (et HPSEC High-Performance Size-Exclusion Chromatography) est largement utilisée pour la détermination de la distribution de masse molaire ou de taille des polymères et biopolymères. Cette technique de chromatographie liquide permet le fractionnement des molécules selon leur volume hydrodynamique à l'aide d'une colonne remplie d'une phase stationnaire poreuse. Durant l'élution, les molécules trop grandes pour entrer dans les pores de la phase stationnaire sont éluées dans le volume d'exclusion totale de la colonne (V_0) alors que les molécules suffisamment petites pour diffuser dans et hors des pores sont éluées dans le volume total de la colonne (V_T). Les petites molécules pénètrent dans les pores et sont ainsi séparées par ordre décroissant de taille (Figure 5). Le volume d'élution d'une molécule peut s'écrire comme suit :

$$V_i = V_0 + K_{SEC} V_p \quad [19]$$

$$K_{SEC} = \frac{c_p}{c_0} \quad [20]$$

où V_p est le volume accessible à la molécule, K_{SEC} est le coefficient de distribution, c_p la concentration moyenne du polymère dans le volume des pores et c_0 le volume interstitiel.

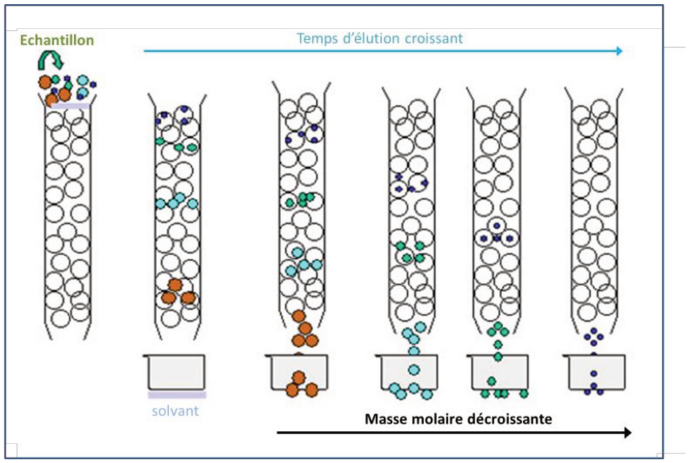


Figure 5 - Principe de la chromatographie d'exclusion stérique.

Une colonne de SEC est définie suivant plusieurs paramètres : ses dimensions (longueur et diamètre interne), la nature de la phase stationnaire (particules poreuses, gel semi-rigide, type de matériau), ses propriétés physiques (taille des pores, diamètre des particules, limites d'exclusion, …). Il faut noter que l'échantillon doit être solubilisé entièrement dans un solvant adapté et qu'il est préférable que ce solvant soit utilisé comme phase mobile.

Les colonnes de SEC peuvent être calibrées pour obtenir la relation entre le volume d'élution et la masse molaire (ou la taille) de l'échantillon. La calibration de la colonne doit être faite dans les mêmes conditions chromatographiques que l'échantillon : éluant, température, vitesse d'élution, concentration et volume de la solution injectée. Il existe deux méthodes d'étalonnage :

- *Méthode d'étalonnage classique :* cette technique est basée sur l'analyse d'une série de standards monodisperses ayant une masse molaire moyenne connue. Pour une calibration en masse molaire il est indispensable qu'ils soient de même nature chimique et de même structure moléculaire que l'échantillon à analyser car le rayon hydro dynamique dépend de la longueur des chaînes, de la structure du polymère, de la conformation, de la température et du solvant. Il est ainsi possible de tracer la courbe de calibration log (M) = f (V_i) pour une gamme étalon. Cette courbe doit couvrir toute la gamme de séparation du système et elle est valable pour un polymère de structure et de composition chimique donnée, à une température et dans un solvant donnés.
- *Méthode d'étalonnage universel :* cette méthode a été introduite par Benoit (Benoit *et al.*, 1966) et utilise le volume hydrodynamique V_η :

$$V_\eta \propto [\eta]\, M \qquad [21]$$

où $[\eta]$ est la viscosité intrinsèque et M la masse molaire. La courbe d'étalonnage est obtenue en traçant $\log([\eta]\, M)$ en fonction du volume d'élution de différents étalons monodisperses, de viscosité intrinsèque et de masse molaire connues. La masse molaire est ainsi calculée avec la relation de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) qui peut s'écrire :

$$M = \left(\frac{V_\eta}{K_a}\right)^{1/a+1} \qquad [22]$$

où a et K_a sont les paramètres de Mark-Houwink. Dans ce cas, des étalons de nature chimique différente de l'échantillon peuvent être utilisés. Il faut tout de même s'assurer qu'il n'y a pas d'interactions avec le support de la colonne et que les paramètres de Mark-Houwink sont connus pour le polymère en question.

Des effets secondaires entraînant un fractionnement de l'échantillon selon des mécanismes différents de l'exclusion stérique peuvent être dus à la taille et à la structure de la molécule, aux interactions avec la phase stationnaire ou à la concentration de l'échantillon. Ces trois effets sont très bien détaillés par Rolland-Sabaté (Rolland-Sabaté, 2017). Les détecteurs pouvant être associés à la SEC ainsi que les paramètres structuraux pouvant en découler sont les mêmes que dans le cas d'un fractionnement par couplage flux-force hydrodynamique et sont détaillés dans la partie suivante.

3.2. Fractionnement par couplage flux-force hydrodynamique

Le fractionnement par couplage flux-force (ou field flow fractionation, FFF) fait partie des techniques de chromatographie liquide et fût inventée par Giddings en 1966 (Giddings, 1966). Le principe de séparation est basé sur les interactions entre l'échantillon et une force physique externe. Il n'y a pas de phase stationnaire dans ce système, la sélectivité dépend du coefficient de diffusion des particules (Martin, 1998). Le fractionnement par couplage flux-force est utilisé pour la séparation de macromolécules telles que les polysaccharides, les protéines, les polymères synthétiques mais aussi les nanoparticules, les polymersomes, les colloïdes, les bactéries ou encore les virus (Till *et al.*, 2014 ; Tügel *et al.*, 2015 ; Ulmius *et al.*, 2012 ; Ulrich *et al.*, 2012 ; Wagner *et al.*, 2014, Yohannes *et al.*, 2011). En FFF, un champ est appliqué perpendiculairement au flux d'élution de l'échantillon et peut être de différentes natures : gradient de température (ThFFF), flux d'écoulement (AF4, A4F ou FlFFF), force gravitationnelle (SdFFF, GrFFF), gradient électrique (electrical FFF), gradient acoustique (acoustic

FFF). Seule la méthode faisant intervenir un flux d'écoulement ou force hydrodynamique sera détaillée dans cette partie.

Depuis une quinzaine d'années, le fractionnement par couplage flux-force hydrodynamique avec un canal asymétrique, inventé par Wahlund et Giddings en 1987 (Walhund & Giddings, 1987) est très utilisé comme une alternative à la chromatographie d'exclusion stérique pour fractionner des colloïdes, des protéines, des polymères hydrosolubles et des particules sur une gamme de taille extrêmement large allant de 1 nm à 50 µm environ (Cölfen & Antonietti, 2000). La séparation s'effectue uniquement par la différence de coefficients de diffusion du centre de masse de la particule, directement liés à la taille de la particule. L'avantage majeur des techniques FFF est de permettre un fractionnement sans utiliser de phase stationnaire ce qui limite les problèmes liés aux interactions molécule-support. Ce système est composé d'un canal de séparation asymétrique formé d'une paroi solide et d'une paroi d'accumulation perméable (fritté, membrane poreuse, avec un seuil de coupure de 10 kDa en général) séparées par un espaceur (appelé « spacer ») formant ainsi le canal d'élution (Figure 6a, b). Il existe différents types de membrane (cellulose régénérée, polyethersulfone) de différentes porosités. Il est important de bien la sélectionner afin de limiter toute interaction avec celle-ci au risque de perdre l'échantillon (Kavurt *et al.*, 2015).

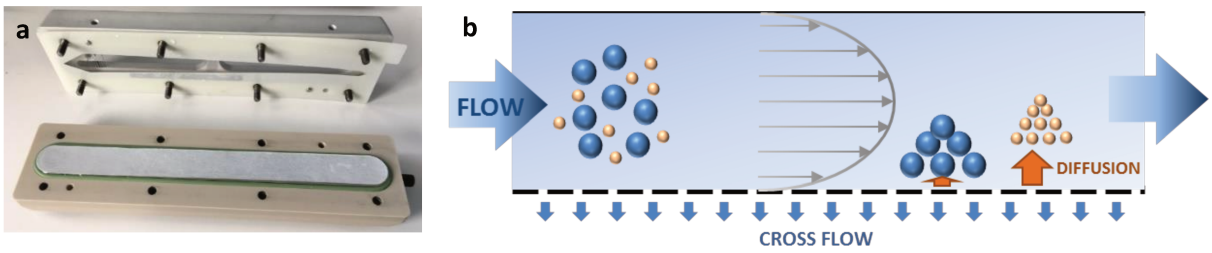


Figure 6 – a. Photo d'un canal AF4 ouvert avec un spacer de 350 µm et une membrance de cellulose 10 kDa. b. Représentation schématique du principe de fractionnement par AF4.

La première phase du fractionnement inclut une étape de focalisation de l'échantillon durant laquelle le flux est dirigé vers l'intérieur du canal de fractionnement en passant par l'entrée du canal, la seule sortie de flux se faisant à travers la membrane semi-perméable. L'échantillon est introduit dans le canal dans cette configuration de flux et focalisé à une position déterminée au début du canal, proche du point d'injection, grâce à un équilibre de flux contraires (la vitesse axiale au point de focalisation étant nulle) (Figure 7a). On peut noter qu'il existe une méthode alternative pour séparer en AF4 sans focalisation, il s'agit de la technique du Frit-Inlet AF4 (FI-AF4). Cette méthode permet une introduction de l'échantillon dans le canal plus douce afin d'éviter l'agrégation de l'échantillon. La relaxation est

accomplie pendant que l'échantillon est transporté sur la première section du canal AF4, un flux passant par le fritté placé au-dessus (Figure 7b).

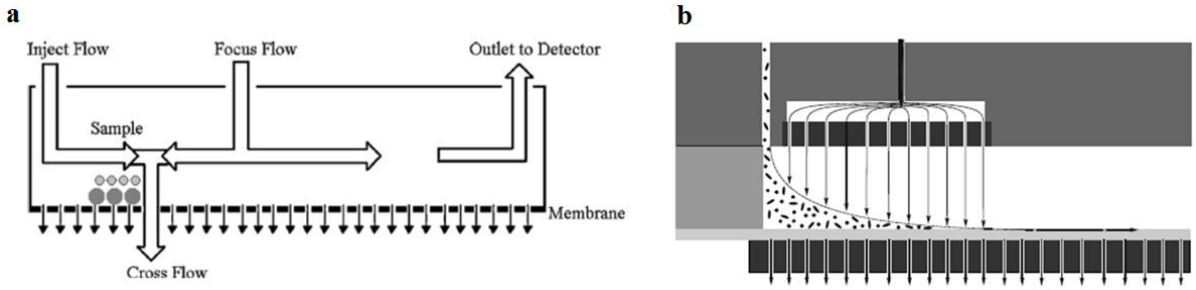


Figure 7 - a. Schéma du système Fl-FFF pendant l'étape de focalisation (Messaud *et al.*, 2009). b. Etape de relaxation de l'échantillon dans le cas du FI-AF4 (Wyatt Courtesy).

Le champ (ici un flux-croisé) est appliqué pendant un temps suffisant pour permettre la relaxation des molécules (c'est-à-dire leur positionnement d'équilibre à une certaine distance de la paroi d'accumulation). Les composants de l'échantillon forment alors un nuage : les plus grosses molécules se retrouvent ainsi proches de la paroi d'accumulation et les plus petites sont plus éloignées. Cette distance entre la paroi d'accumulation et le centre de gravité de chaque macromolécule dépend de leur coefficient de diffusion. Ainsi, en mode normal, les petites molécules sont plus rapidement éluées, grâce au profil parabolique du flux axial dans l'épaisseur du canal qui s'écrit :

$$v\,(x) = 6 < v > \left[\frac{x}{w} - \left(\frac{x}{w}\right)^2\right] \qquad [23]$$

avec $< v >$ la vitesse moyenne du liquide dans l'épaisseur du canal, w et x la distance à la paroi d'accumulation (x = 0 au niveau de la paroi d'accumulation).

Il existe 2 modes différents d'élution déterminant l'ordre d'élution des analytes mais aussi la résolution de la séparation. Ces deux mécanismes de fractionnement sont détaillés ci-dessous et représentés sur la Figure 8 :

- *Mode normal ou brownien* : C'est le mode de fractionnement le plus courant et il est utilisé pour des particules de taille inférieure au micron. Les petites particules de l'échantillon se positionnent dans les régions où le flux est plus important et sont donc éluées plus rapidement que les grosses particules.
- *Mode lift ou hyperlayer :* Ce mode est applicable à des particules de plus de 1 µm et lorsque de forts flux d'élution sont utilisés. L'ordre d'élution est identique au mode hyperlayer est inversé par rapport au mode normal : les grosses particules sont éluées avant les plus petites. Ce mode

fait apparaître des forces de lévitation conduisant les particules à une distance supérieure à la valeur de leurs rayons.

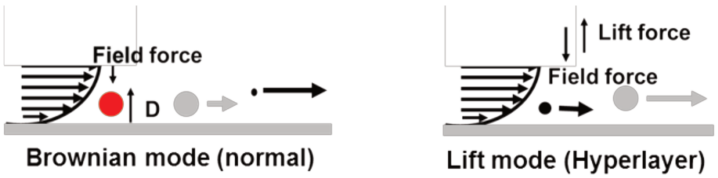


Figure 8 - Modes de fractionnement en AF4 (Rolland-Sabaté *et al.*, 2017).

En AF4, pour des forts temps de rétention, une approximation du temps de rétention t_R s'écrit en fonction du coefficient de diffusion comme suit (Litzen & Wahlund, 1991) :

$$t_R = \frac{t_0 . F_C . w^2}{6 . V_0 . D} \qquad [24]$$

avec t_0 le temps de rétention d'un composé non retenu, V_0 le volume du canal, w l'épaisseur du canal, F_C le flux croisé volumétrique et D le coefficient de diffusion. En utilisant la relation de Stockes-Einstein, le rayon hydrodynamique peut s'exprimer comme suit :

$$R_H = \frac{V_0 . k_B . T}{t_0 . F_C . w^2 . \pi . \eta} t_R \qquad [25]$$

et il est ainsi possible de calculer directement le rayon hydrodynamique à partir des données expérimentales.

Les détections en couplage les plus utilisées avec les méthodes de fractionnement sont les détecteurs en concentration. Les ***réfractomètres différentiels*** (DRI) mesurent la différence d'indice de réfraction entre le solvant et le soluté. Les ***détecteurs UV*** sont sensibles aux groupements chimiques absorbant la lumière à une longueur d'onde donnée. Ils permettent notamment de détecter les protéines et les aromatiques.

Pour déterminer les distributions en masses molaires et en rayon de giration des macromolécules, le système AF4 doit être couplé à de la ***diffusion multi-angulaire de la lumière*** (multi-angle laser light scattering, MALLS). La molécule se polarise et diffuse la lumière lorsqu'elle est soumise à un rayonnement électromagnétique compris entre 400 et 700 nm. L'intensité de la lumière diffusée est mesurée à différentes concentrations et différents angles fixes placés autour de la cellule de mesure dans laquelle passe l'échantillon (Figure 9). Typiquement, un tel détecteur possède des limites de détection :

la gamme de détection est comprise entre 10 nm (soit une masse molaire d'une centaine de $g.mol^{-1}$) et 500-600 nm de rayon de giration.

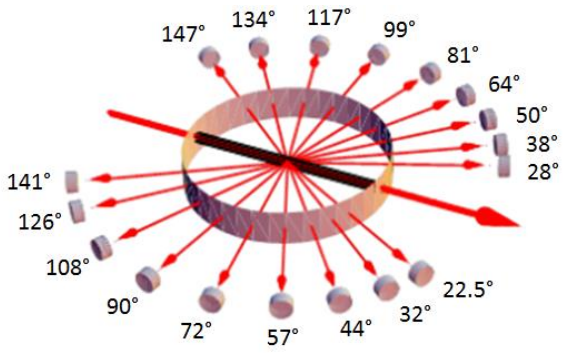


Figure 9 - Détecteur de diffusion de la lumière à 18 photodiodes et la valeur des angles associée (MALLS) (Wyatt®, Heleos II).

Le rapport de Rayleigh ΔR_θ est utilisé de préférence à l'intensité diffusée pour s'affranchir de la distance d'observation R, distance entre le point de diffusion et le point d'observation :

$$\Delta R_\theta = \frac{(I_0 - I_S)\, R^2}{I_0} \qquad [26]$$

avec I_θ l'intensité diffusée à l'angle θ d'observation, I_S l'intensité diffusée par le solvant et I_0 l'intensité lumineuse incidente.

L'équation générale de la diffusion de la lumière s'écrit alors (Zimm, 1948) :

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M\ P(\theta)} + 2\ A_2 c \qquad [27]$$

avec K la constante optique, c la concentration de l'échantillon, M la masse molaire, $P(\theta)$ le facteur de forme de la molécule et A_2 le second coefficient du Viriel.

Le facteur de forme $P(\theta)$ dépend de la taille et de la conformation de la molécule et décrit la dépendance angulaire de l'intensité de la lumière diffusée :

$$P(\theta) = \frac{1}{1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2}\langle {R_G}^2 \rangle \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)} \qquad [28]$$

La constante optique ou contraste est donnée par :

$$K = \frac{4\pi^2}{{\lambda^4}_0 N_A}\, n^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \qquad [29]$$

où $\frac{dn}{dc}$ est l'incrément d'indice de réfraction de la solution, n l'indice de réfraction de la solution et N_A le nombre d'Avogadro.

La masse molaire moyenne en poids $\bar{M}_w$, le rayon de giration moyen en z $\bar{R}_G$, ainsi que le second coefficient du viriel A_2 sont déterminées en effectuant une double extrapolation à angle et concentration nuls. Le choix du diagramme dépend de la nature du polymère à caractériser.

Le **diagramme de Zimm** (Zimm, 1948) consiste à tracer ($Kc/\Delta R_\theta$) en fonction de ($\sin^2(\theta/2)+bc$). La pente de la droite obtenue à concentration nulle permet de calculer $\bar{R}_G^2$, la pente de la droite obtenue à angle nul permet de calculer A_2 et l'intersection de ces deux droites avec l'axe des ordonnées donne $1/\bar{M}_w$.

Le **diagramme de Berry** (Berry, 1966) consiste à tracer $\sqrt{Kc/\Delta R_\theta}$ en fonction de ($\sin^2(\theta/2)+bc$). Les caractéristiques sont calculées de la même façon qu'avec le diagramme de Zimm et l'intersection des deux droites avec l'axe des ordonnées donne $\sqrt{1/\bar{M}w}$.

Le **diagramme de Debye** (Debye, 1947) consiste à tracer ($\Delta R_\theta/Kc$) en fonction de ($\sin^2(\theta/2)+bc$). Le calcul de $\bar{R}_G^2$ se fait de la même façon qu'avec le diagramme de Zimm alors que l'intersection des deux droites avec l'axe des ordonnées donne $\bar{M}_w$.

Le diagramme de Zimm est utilisé pour la détermination de ces caractéristiques pour des polymères de faibles et moyennes masses molaires alors que le diagramme de Berry est préconisé pour les molécules de fortes masses molaires. Le diagramme de Debye est utilisé pour la caractérisation des protéines de faibles rayons de giration.

Pour un système de diffusion de la lumière couplé à un système de fractionnement, l'équation générale de diffusion de la lumière s'écrit pour chaque fraction i de concentration c_i :

$$\frac{Kc_i}{\Delta R_{\theta i}} = \frac{1}{M_i P_i(\theta)} + 2\,A_2 c_i \qquad [30]$$

avec $\Delta R_{\theta i}$ le rapport de Rayleigh, M_i la masse molaire et $P_i(\theta)$ le facteur de forme de la molécule pour chaque fraction i.

La dilution apportée par le fractionnement rend le terme $2A_2c_i$ négligeable et l'équation précédente devient :

$$\frac{Kc_i}{\Delta R_{\theta i}} = \frac{1}{M_i P_i(\theta)} \quad [31]$$

c_i est calculé à partir de la réponse du détecteur de concentration. Il est important de connaitre la valeur d'incrément de l'indice de réfraction dn/dc ou de la déterminer si elle n'est pas connue car la valeur de concentration a un impact sur la détermination de la masse molaire. En général, pour des glucanes, la valeur utilisée pour le dn/dc est 0,146 mL.g^{-1}.

En pratique, la masse molaire moyenne en poids $\bar{M}_w$ et en nombre $\bar{M}_n$, la polydispersité $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ et le rayon de giration moyen en z $\bar{R}_G$ pour chaque pic de l'élugramme sont calculés comme suit :

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i} \quad [32]$$

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i c_i}{\sum_i c_i / M_i} \quad [33]$$

$$\bar{R}_G = \frac{\sum_i c_i M_i {R_{Gi}}^2}{\sum_i c_i M_i} \quad [34]$$

La conformation du polymère peut aussi être déterminée en AF4-MALLS en utilisant des lois de puissance. Les lois de puissance qui décrivent la dépendance du rayon de giration et du rayon hydrodynamique à la masse molaire sont les suivantes :

$$\bar{R}_G = K_G {\bar{M}_w}^{\nu_G} \quad [35]$$

$$\bar{R}_H = K_H {\bar{M}_w}^{\nu_H} \quad [36]$$

Les valeurs de ν_G et ν_H dépendent de la conformation du polymère, de la température et des interactions polymère-solvant (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008). Ainsi, pour une **sphère** : $\nu_G = \nu_H = 0{,}33$, pour une **pelote statistique** : $\nu_G = \nu_H = 0{,}5 - 0{,}6$ et pour un **bâtonnet** : $\nu_G = \nu_H = 1$.

Il est aussi possible d'obtenir d'autres informations en combinant les résultats de diffusion de la lumière dynamique et statique. Le paramètre ρ ($\rho_i = R_{Gi}/R_{Hi}$) dépend de la structure du polymère (cf la partie sur le comportement des polymères en solution) et donne des informations sur la forme de la macromolécule tout au long de la distribution de taille (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008). La densité apparente de la particule tout au long de la distribution de taille peut permettre de comprendre les variations de valeurs de ρ_i

(Rolland-Sabaté *et al.*, 2008). Cette densité apparente est calculée sur la base d'une densité uniforme de la particule et peut s'écrire :

$$d_{Gappi} = M_i / N_A (\frac{4\pi}{3}) {R_{Gi}}^3 \quad [37]$$

Partie 2 : Les *α*-glucanes de l'étude

Les *α*-glucanes sont produits à partir du saccharose formant une chaîne d'unité glucosyle et principalement synthétisés par les bactéries lactiques du genre *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus, Exiguobacterium* et *Weissella* et aussi par des bactéries du genre *Neisseria, Deinococcus radiodurans* et *Alteromonas*. Les *α*-glucanes sont opposés aux β-glucanes : les liaisons glucosidiques en alpha sont formées en position axiale alors que les liaisons en bêta se forment en position équatoriale (Figure 10). Ces *α*-glucanes sont synthétisés grâce aux enzymes appelées glucane-saccharases et sont constitués uniquement d'unité D-glucose.

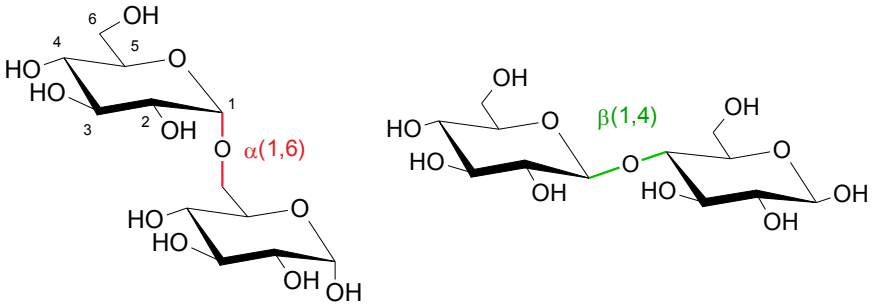


Figure 10 - Représentation de la liaison glucosidique alpha et bêta entre deux unités de D-glucose.

Ces polysaccharides sont différenciés en fonction du type de liaisons osidiques constituant la chaîne principale (*α*(1→6), *α*(1→3), *α*(1→4) ou *α*(1→2). On retrouve ainsi différents polysaccharides tel que le dextrane, polysaccharide abondant de la plaque dentaire et qui joue un rôle important dans la formation et la conservation des sols. L'amidon, qui est constitué d'amylose et d'amylopectine, est un glucide de réserve pour les végétaux supérieurs et est l'un des principaux constituants de l'alimentation humaine. Le glycogène sert de réserve énergétique pour les animaux et permet de libérer du glucose rapidement (dans le foie et les cellules musculaires). Le pullulane est, quant à lui, obtenu par fermentation microbienne et est utilisé dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. Le mutane a lui aussi été retrouvé dans la plaque dentaire, favorisant les lésions dentaires comme les caries. L'alternane et le reutérane sont deux *α*-glucanes très peu étudiés. A l'heure actuelle, la caractérisation structurale des *α*-glucanes produits par les glucane-saccharases concerne principalement les dextranes.

1. Synthèse enzymatique des *α*-glucanes : les glucane-saccharases

Les glucane-saccharases sont des enymes bactériennes extracellulaires qui catalysent la synthèse de glucanes à partir d'un même substrat, le saccharose. Ces enzymes sont aussi capables de catalyser le transfert d'unités D-glucosyle du saccharose vers un accepteur exogène tel que le dextrane. Elles n'ont besoin que de l'énergie du clivage de la liaison osidique du saccharose (27,6 $kJ.mol^{-1}$) pour fonctionner (André *et al.*, 2010) et sont capables de synthétiser une large gamme de biopolymères, de tailles et de structures différentes jouant sur le type de liaisons présentes $\alpha(1\rightarrow6)$, $\alpha(1\rightarrow3)$, $\alpha(1\rightarrow4)$ ou $\alpha(1\rightarrow2)$ au sein du polysaccharide. Ces enzymes voient un fort intérêt dans la bioconversion et la valorisation du saccharose qui est une agro-ressource abondante (173 millions de tonnes pour l'année 2012).

Aussi appelées transglucosidases, les glucane-saccharases font partie de la famille des glycosyltransférases, selon l'Enzyme Commission. Dans la classification CAZy, les modules catalytiques des enzymes sur les sucres et les modules de liaison aux glucides sont répartis selon leurs homologies de séquence (Cantarel *et al.*, 2009). Il existe 4 catégories : les ***glycoside-hydrolases*** (GHs), les ***glycosyltransferases*** (GTs), les ***polysaccharides-lyases*** (PLs) et les ***carbohydrate-esterases*** (CEs).

Selon cette classification, la grande majorité des glucane-saccharases appartiennent à la famille 70 des glycoside-hydrolases, aussi appelée GH70. Cette famille comprend des enzymes de masses molaires élevées variant de 130 à 313 kDa produites par des bactéries lactiques gram positif des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Weisella* et *Exiguobacterium* (Leemhuis *et al.*, 2013a). Les amylosaccharases, quant à elles, sont classées dans la famille GH13 et catalysent la synthèse d'*α*-glucanes composés de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ à partir du saccharose.

Les glucanes-saccharases des familles GH13 et GH70 catalysent le transfert d'unités glucosyles provenant du clivage du saccharose, vers une molécule acceptrice présente dans le milieu réactionnel. La réaction commence par la formation d'un intermédiaire covalent β-D-glucosyl-enzyme accompagnée d'une libération simultanée d'une molécule de fructose. Dans un second temps, la synthèse d'un polymère de haute masse molaire se produit par des transferts successifs d'unités glucosyles sur l'extrémité non-réductrice (Figure 11) (Vuillemin *et al.*, 2016). L'intermédiaire peut aussi être intercepté par :

- un groupement hydroxyle d'un accepteur donnant lieu à une transglucosylation,
- une molécule d'eau donnant lieu à une hydrolyse,

- une molécule de fructose libéré donnant lieu à une hydrolyse ou une synthèse du saccharose (échange isotopique) et/ou d'isomères de saccharose comme le leucrose (isomérisation).

La spécificité de liaison des glucane-saccharases est conservée entre la réaction de polymérisation et la synthèse d'oligosaccharides par réaction d'accepteur (Remaud-Siméon *et al.*, 2000).

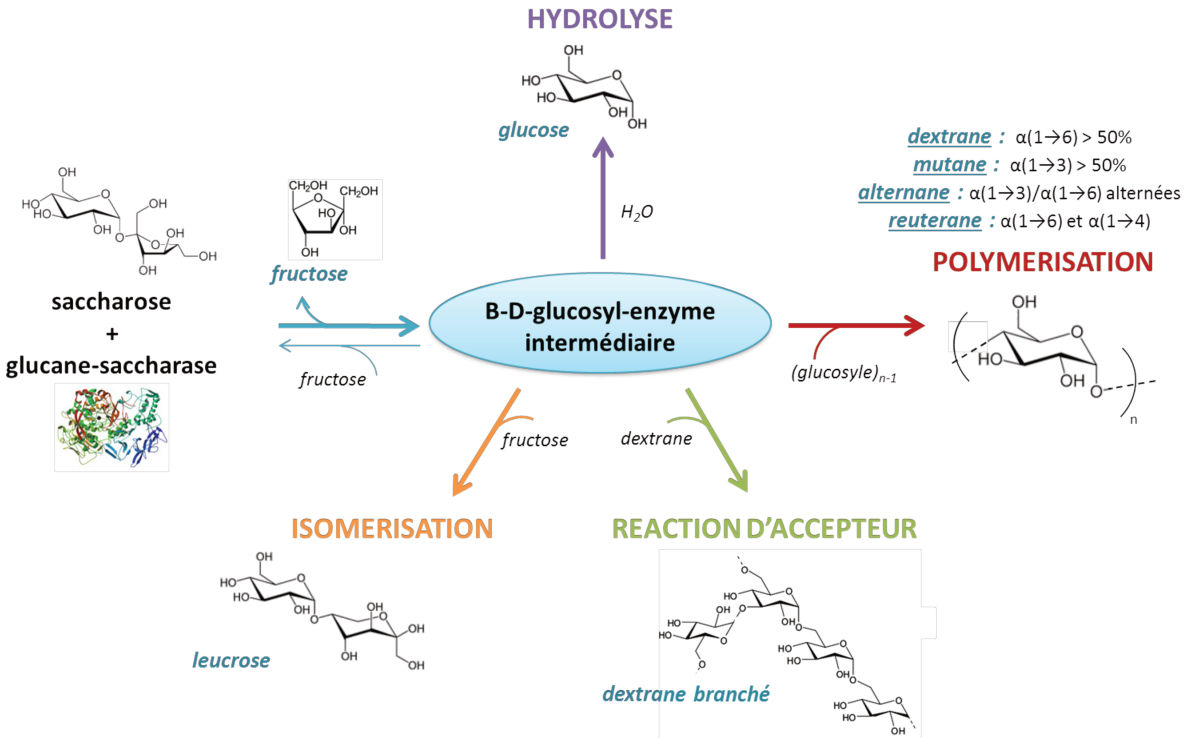


Figure 11 - Réactions catalysées par les enzymes glucane-saccharases GH70 actives au saccharose (adaptée de Vuillemin *et al.*, 2016).

Les glucane-saccharases présentent des spécificités variées et catalysent la formation de polysaccharides variant par la nature, le nombre et l'organisation des liaisons osidiques selon l'enzyme considérée. On distingue ainsi :

- Les ***dextrane-saccharases*** (GH70) qui sont principalement produites par des bactéries du genre *Leuconostoc* et à moindre mesure par des bactéries des genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*, elles synthétisent des dextranes, dont la chaîne principale contient plus de 50% de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$. Des ramifications de type $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow4)$ sont également présentes à des taux variables selon l'enzyme considérée.
- Les ***mutane-saccharases*** (GH70), produites par des bactéries du genre *Streptococcus*, elles synthétisent des mutanes constitués majoritairement de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ consécutives dans la chaîne principale et pouvant présenter des ramifications en position $\alpha(1\rightarrow6)$.

- Les ***alternane-saccharases*** (GH70) qui synthétisent un glucane, appelé alternane, avec une alternance de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$ dans la chaîne principale et pouvant présenter des ramifications. On les retrouve chez 3 souches de *Leuconostoc citreum*, à savoir NRRL-1355, NRRL B-1498 et NRRL B-1501.
- Les ***reutérane-saccharases*** (GH70) que l'on retrouve chez *Lactobacillus* spp. et qui produisent un polymère appelé reutérane, formé à plus de 50% d'unités glucosyles liées en $\alpha(1\rightarrow4)$. On retrouve également des ramifications de type $\alpha(1\rightarrow6)$.
- Les ***amylosaccharases*** (GH13) qui synthétisent un polymère linéaire, l'amylose, composé de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ que l'on retrouve chez des bactéries des genres *Neisseria*, *Deinococcus* et *Alteromonas*.

2. Les dextranes

2.1. Obtention des dextranes

Les dextranes sont des polysaccharides bactériens neutres. Il s'agit d'exopolysaccharides, c'est-à-dire de polysaccharides excrétés à l'extérieur de la paroi cellulaire de la bactérie, constitués d'enchaînements d'unités glucosyles.

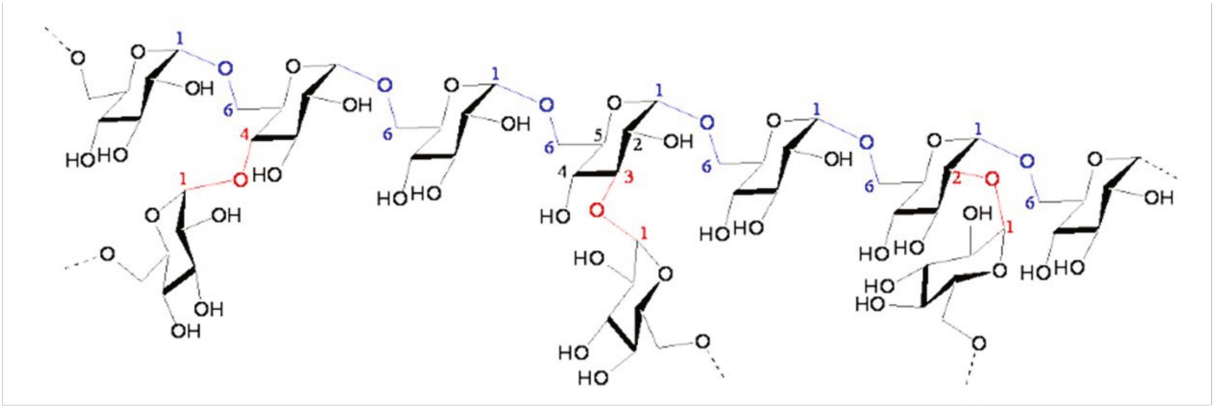


Figure 12 - Structure chimique des dextranes (chaîne principale constituée de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et pouvant présenter une ou plusieurs ramifications en position $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$).

Un minimum de 50% des liaisons osidiques sont de type $\alpha(1\rightarrow6)$ et constituent la chaîne principale. Les dextranes peuvent présenter, en plus des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$, des taux variables de branchements de type $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$, ou $\alpha(1\rightarrow4)$ (Figure 12). La présence et le type de ces différentes ramifications dépendent de la souche bactérienne utilisée (Monsan *et al.*, 2001).

Les dextranes sont produits industriellement par la fermentation d'un substrat spécifique, le saccharose, catalysé par la dextrane-saccharase (Figure 13). Les masses molaires des chaînes de dextrane obtenues peuvent varier de quelques centaines à plusieurs dizaines millions de $g.mol^{-1}$ impliquant une large distribution massique.

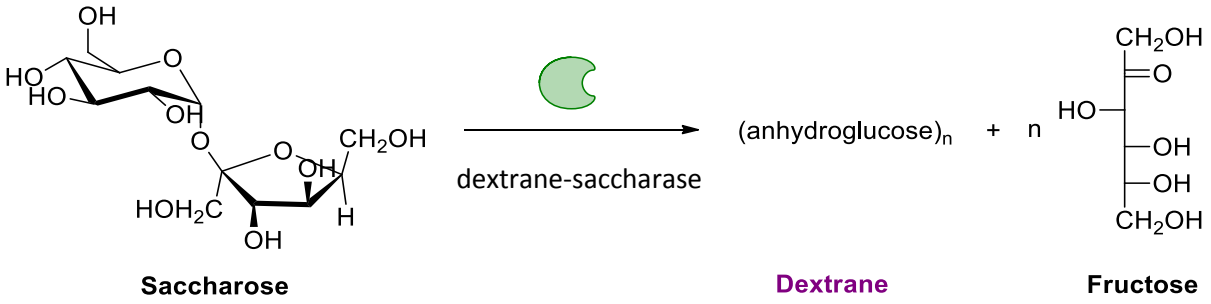


Figure 13 - Conversion du saccharose en dextrane.

En général, les espèces de bactéries « gram positif » sont les plus connues pour former du dextrane et appartiennent aux genres *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* (Kralj *et al.*, 2004). *Leuconostoc mesenteroides* est fréquemment utilisée pour la production des dextranes, notamment dans les secteurs pharmaceutiques, cosmétique et alimentaire. D'autres bactéries telles que *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 et *Ln. citreum* NRRL B-742 fraction 2, produisent un dextrane présentant des ramifications en $\alpha(1\rightarrow2)$ à 30% ou en $\alpha(1\rightarrow4)$, respectivement (Jeanes *et al.*, 1954 ; Takahashi *et al.*, 1992). Des souches de Streptocoques, comme *Streptococcus sobrinus* 6715, et plus récemment les souches *Lactobacillus reuteri* 180, *Lb. fermentum* Kg3, *Lb. paraburchnei* 33 et *Lb. Sakei* Kg15 sont également productrices de dextrane (Kralj *et al.*, 2004). La souche *Weissella confusa* synthétise aussi des dextranes avec des ramifications en position $\alpha(1\rightarrow3)$ (Maina *et al.*, 2011). Il est possible à partir de maltodextrines de produire des dextranes avec des ramifications en $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$ à l'aide de *Gluconobacter oxydans* (Naessens *et al.*, 2005a). Dernièrement, des chercheurs ont séquencé le génome de *Ln. citreum* NRRL B-1299 et ont identifié trois nouveaux gènes (BRS-A, DSR-M et DSR-DP), codant des enzymes GH70. DSR-M et DSR-DP sont des dextrane-saccharases spécifiques de la formation de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et produisent des dextranes de faibles masses molaires allant de 580 à 27 000 $g.mol^{-1}$ (Passerini *et al.*, 2015 ; Claverie *et al.,* 2017). La « branching-sucrase » A (BRS-A) peut greffer des unités glucosyle en position $\alpha(1\rightarrow2)$ sur des dextranes linéaires constitués d'unités glucosyles reliées en $\alpha(1\rightarrow6)$. Peu après, il a été montré qu'une autre enzyme (appelée BRS-B provenant de la souche *Ln. citreum* NRRL B-742) pouvait transférer efficacement un résidu glucosyle du saccharose vers une chaîne linéaire de dextrane par la formation d'une liaison spécifique en position $\alpha(1\rightarrow3)$. En contrôlant le rapport saccharose/dextrane, il est possible d'obtenir un dextrane en forme de peigne comprenant 50% de

liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ (Vuillemin *et al.*, 2016). Grâce à ces deux enzymes, un large panel de dextranes présentant une taille, des liaisons osidiques et un taux de ramification variés peut être synthétisé en modifiant les conditions de synthèse. Dernièrement, une enzyme recombinante originaire de *Oenococcus kitaharae* DSM 17330 a été démontrée comme l'une des plus efficaces dextrane-saccharase existante à ce jour. Elle a la particularité de produire des dextranes quasi-linéaires, de très hautes masses molaires ($>10^9$ g.mol^{-1}) ce qui leur confère un comportement de type gel, jamais observé pour d'autres dextranes (Vuillemin *et al*., 2018). Les enzymes existantes à ce jour opérant la synthèse de dextranes ainsi que les caractéristiques des dextranes produits sont répertoriées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 - Pourcentage des liaisons glucosidiques, déterminé par RMN ^{1}H, de dextranes produits à partir de différentes souches bactériennes (adapté de Irague, 2011).

Organisme	Enzyme	Liaisons osidiques				Références
		$\alpha(1\rightarrow6)$	$\alpha(1\rightarrow2)$	$\alpha(1\rightarrow3)$	$\alpha(1\rightarrow4)$	
***Lm.* B-512-F**	DSR-S	95		5		Monchois *et al.*, 1997
***Lm.* B-512-F**	DSR-T			n.d.		Funane *et al.*, 2000
***Lm.* B-512-F**	DSR-T5	60		40		Funane *et al.*, 2000
***Lm.* B-1299CB4**	DSR-BCB4	100				Kang *et al.*, 2008
***Lm.* Lcc4**	DSR-D	Maj.				Neubauer *et al.*, 2003
***Lm.* IBT-QP**	DSR-P			n.d.		Olvera *et al.*, 2007
***Lm.* L039**	DSR-X			n.d.		Yalin *et al.*, 2008
***Lm.* 0326**	DexYG			n.d.		Zhang *et al.*, 2008
***Lm.* NRRL B-640**				n.d.		Purama, 2009
***Ln. citreum* B-1299**	DSR-E	68	29	3		Dols *et al.*, 1997
***Ln. citreum* B-1299**	DSR-A	85		15		Monchois *et al.*, 1996a
***Ln. citreum* B-1299**	DSR-B	95				Monchois *et al.*, 1996b
***Ln. citreum* B-1299**	DSR-M	100				Passerini *et al.,* 2015
***Ln. citreum* B-1299**	DSR-DP					Passerini *et al.,* 2015
***Ln. citreum* B-1355**	DSR-C	96				Argüello-Morales *et al.*, 2000
***Ln. citreum* E497**		85,5	11	3,5		Maina *et al.,* 2008
***Ln. citreum* HJP4**	LcDS			n.d.		Yi *et al.*, 2009
***S. downei* Mfe 28**	GTF-S	90		10		Gilmore *et al.*, 1990
***S. gordonii* CH1**	GTF-G	75		23		Vickerman *et al.*, 1997
***S. mutans* GS 5**	GTF-D	70		30		Honda *et al.*, 1990
***S. mutans* 6715 f$_1$**		64		36		Hare *et al.*, 1978
S. oralis ATCC10557	GTF-R	86				Fujiwara *et al.,* 2000
S. salivarus ATCC25975	GTF-K	100				Simpson *et al.*, 1995
S. salivarus ATCC25975	GTF-M	95				Simpson *et al.*, 1995
S. sobrinus OMZ176	GTF-T	79		21		Hanada *et al.,* 1993
S. sobrinus B13N	GTF-U	69		31		Hanada *et al.,* 2002
Lb. reuteri 180	GTF-180	61		39		Kralj *et al.*, 2004
***Lb. fermentum* Kg3**	GTF-Kg3	92		8		Kralj *et al.*, 2004
***Lb. parabuchnei* 33**	GTF-33	81		19		Kralj *et al.*, 2004
***Lb. sakei* Kg15**	GTF-Kg15	90		10		Kralj *et al.*, 2004
Oenococcus kitaharae	DSR-OK	98,2		1,8		Vuillemin *et al.*, 2018
Weissella cibaria	rDSRWC	Maj.				Kang *et al.,* 2009
***Weissella confusa* E392**		97,3		2,7		Maina *et al.*, 2008

2.2. Structure des dextranes

2.2.1. Structure moléculaire et macromoléculaire

2.2.1.1. Détermination du pourcentage de liaisons glucosidiques par méthylation

Les premières examinations de la structure de ces dextranes ont été réalisées en 1954 par rotation optique, infra-rouge ainsi que par réaction d'oxydation au périodate pour mettre en évidence la diversité des structures de ces polymères et notamment pour déterminer les natures des liaisons osidiques formées (Jeanes *et al.*, 1954). Par la suite, d'autres techniques d'analyse structurale comme la méthylation, l'acétolyse partielle, la dégradation de Smith, l'hydrolyse enzymatique, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone ont permis d'avoir des informations plus précises sur la distribution ou la longueur des ramifications (Figure 15) (Larm *et al.*, 1971 ; Harris *et al.*, 1984 ; van Leeuwen *et al.*, 2008a). La réaction de méthylation est basée sur la méthylation des groupements hydroxyles libres avec de l'iodométhane et le carbanion méthylsulfinylsodium. Le dextrane méthylé est ensuite hydrolysé obtenant ainsi différents monosaccharides méthylés qui sont ensuite réduits et peracétylés. La chromatographie en phase gazeuse permet ensuite d'identifier chaque monosaccharide par leur temps de rétention (Heinze *et al*., 2006) (Figure 14).

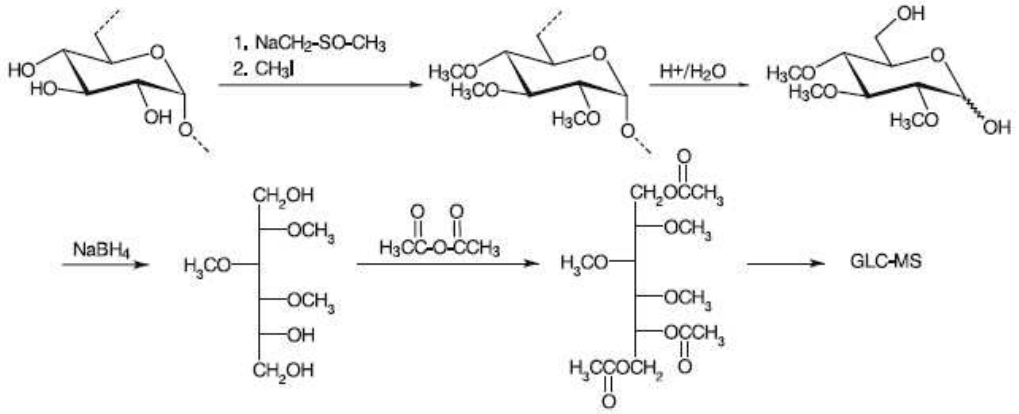


Figure 14 - Détermination d'une liaison *α*(1→6) du dextrane par la méthode de méthylation avec une séparation/détection GLC-MS (Heinze *et al.*, 2006).

Notamment grâce à la méthode de méthylation, les différentes structures de dextranes obtenues suivant la souche utilisée ont été répertoriées par Naessens *et al.*, 2005b et sont présentées sur la Figure 15.

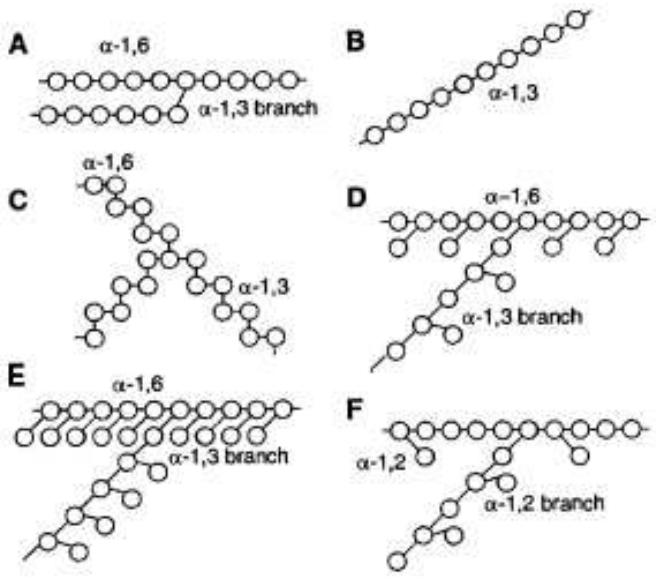


Figure 15 - Représentation de différentes structures d'α-glucanes obtenus à l'aide de diverses glucane-saccharases des souches *Ln. mesenteroides* et *Streptococcus mutans*. (A*) Ln. mesenteroides* B-512F (dextrane soluble) ; (B) *S. mutans* (mutane insoluble) ; (C) *Ln. mesenteroides* B-1355 (alternane) ; (D) *S. mutans* (dextrane soluble) ; (E) *Ln. mesenteroides* B-742S (dextrane) ; (F*) Ln. mesenteroides* B-1299 (dextrane) (Naessens *et al.*, 2005b).

2.2.1.2. Caractérisation par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN, qui permet de caractériser les polysaccharides sans modification chimique ou dégradation des chaînes, est l'une des méthodes les plus importantes pour obtenir des informations détaillées sur la structure des dextranes (Usui *et al.*, 1973 ; Cheetham *et al.*, 1991). Les dextranes commerciaux produits par la souche *Lm.* NRRL B512F, ont été caractérisés en détail et notamment par RMN. Ils contiennent plus de 95% de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et des branchement liés en $\alpha(1\rightarrow3)$. Selon Larm *et al.* (1971), environ 40% de ces ramifications sont composées d'une seule unité glucose et 45% de deux unités glucose. Les autres branchements (environ 15%) seraient formés de plusieurs dizaines d'unités glucosyle. Ioan *et al.* (2001) ont montré, par des analyses de diffusion de la lumière, que la longueur des ramifications pouvait atteindre 179 unités glucose. Robyt *et al.* (2008) suggèrent qu'il y a des longueurs variées de ramification. Les travaux de van Leeuwen *et al.* (2008a) ont permis d'attribuer les déplacements chimiques obtenus par RMN du proton (Tableau 4) des α-glucanes produits par les glucane-saccharases GTF180 et GTFA.

Tableau 4 - Déplacements chimiques obtenus par RMN ^{1}H pour différents di- et trisaccharides solubilisés dans du D_2O à 27 °C (van Leeuwen *et al.*, 2008a).

	Glucane	H1	H2	H3	H4	H5	H6
disaccharide	[α-D-Glcp-(1→2)-]	5,084	3,550	3,78	3,450	3,932	3,84/3,77
	[α-D-Glcp-(1→3)-]	5,359	3,562	3,76	3,431	4,010	3,87/3,80
	[α-D-Glcp-(1→4)-]	5,399	3,590	3,67	3,418	3,720	3,84/3,74
	[α-D-Glcp-(1→6)-]	4,961	3,550	3,72	3,422	3,720	3,84/3,78
trisaccharide	[α-D-Glcp-(1→3)-]	5,386/5,371	3,68	3,90	3,66	4,03	3,85/3,74
	[α-D-Glcp-(1→4)-]	5,399	3,63	3,96	3,65	3,85	3,85/3,82
	[α-D-Glcp-(1→6)-]	4,961/4,969	3,57	3,72	3,49	3,93	3,78/3,983

2.2.1.3. Caractéristiques physico-chimiques

Les dextranes sont des polysaccharides très hydrophiles et hydrosolubles, par rapport aux autres glucanes, du fait de leur très forte teneur en liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$. Ils sont donc solubles dans l'eau et aussi dans divers solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le formamide et l'éthylène glycol. La présence de chlorure de lithium (LiCl) permet de solubiliser le dextrane dans le N,N-diméthylformamide (DMF) ou le N,N-diméthylacétamide (DMAc) (Heinze *et al.*, 2006) (Tableau 5).

Tableau 5 - Solubilité de quelques polysaccharides utilisés dans le projet ASPIRE (+ : soluble ; - insoluble ; n.d. : non déterminé).

	H_2O	DMSO	DMF	THF	Références
Dextrane	+	+ (40°C)	+ (LiCl)	-	Heinze *et al.*, 2006
Amylose	+ (alcalin)	+	n.d.	n.d.	Han *et al.*, 2004
Alternane	-	+ (50°C)	n.d.	n.d.	Striegel *et al.*, 2009
Mutane	-	+	n.d.	n.d.	Puanglek *et al.*, 2016
Reutérane	+	n.d.	n.d.	n.d.	Patel *et al.*, 2012

2.2.1.4. Détermination des caractéristiques moléculaires et macromoléculaires

Le polymère natif de dextrane est généralement polydisperse et de haute masse molaire, variant entre 10^6 et 10^9 g.mol^{-1} selon les auteurs (Leathers, 2005). Pour caractériser ces dextranes, l'estimation de la taille et de la conformation en solution est essentielle. La masse molaire peut être déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à un détecteur de diffusion de la lumière. Cette technique est adaptée au dextrane natif ayant une masse molaire < 10^6 g.mol^{-1} puisqu'au-delà, la limite supérieure de masses séparables par HPSEC est atteinte. Le dextrane natif a généralement une masse

molaire comprise entre 9.10^6 et 5.10^8 g.mol^{-1} et présente une grande dispersité. Cette dispersité augmente avec la masse molaire. De plus, les conditions de synthèse (pH, température, concentration en saccharose) des dextranes ont un effet sur la taille et le degré de branchement (Falconer *et al*., 2011). Les dextranes ont tendance à s'agréger en solution aqueuse pouvent donc boucher les colonnes de chromatographie. Du fait des limites de l'HPSEC, une alternative peut être l'utilisation d'un système de fractionnement flux-force avec flux asymétrique (AF4). Un élugramme obtenu avec cette technique représentant l'évolution de la masse molaire en fonction du volume d'élution ainsi que les signaux de diffusion de la lumière multi-angulaire (MALLS) et réfractométrique (DRI) est représenté sur la Figure 16.

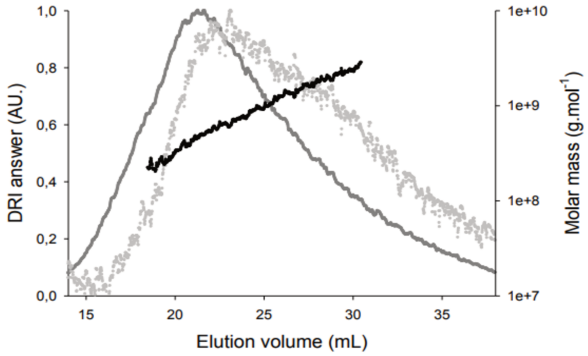


Figure 16 - Elugramme d'une solution de dextrane obtenu par AF4-MALLS-DRI. Dextrane ~ 10^9 g.mol^{-1} obtenu avec l'enzyme DSR-OK (trait pointillé gris : Signal d'indice de réfraction, Trait plein gris : Signal de diffusion de lumière à l'angle à 90° (LS90), trait plein noir masses molaires en fonction du temps d'élution) (Vuillemin *et al*., 2018).

Tableau 6 - Masse molaire moyenne en poids $\bar{M}_W$, rayon de giration moyen en z $\bar{R}_G$ et coefficient hydrodynamique ν_G des dextranes recensés dans la littérature.

Souche bactérienne	Enzyme	Solvant	$\bar{M}_W$(g.mol^{-1})	$\bar{R}_G$ (nm)	ν_G	Références
Dextranes commerciaux		H_2O	8.10^4-1.10^8	8,6-160,6	0,42	Nordmeier, 1993
Dextrane commercial		$NaNO_3$ 0,1M	$2,73.10^6$	47	0,5	Roessner & Kulicke, 1994
Dextranes commerciaux		H_2O	6-400.10^4		0,43	Ioan *et al*, 2000b
Lb. reuteri 180	GTF180	Na_2SO_4 0,1M	$3,2.10^7$	-	-	Kralj *et al*., 2004
Lb. parabuchnerii 33	GTF-33		2.10^5	-	-	
Lb. sakei Kg15	GTF-kg15		$2,7.10^7$	-	-	
Ln. mesenteroides NRRL B-512F	DSR-S	NaN_3 3mM	$5,95.10^8$ $3,4.10^8$ $1,16.10^8$	210,0 133,7 67,0	0,5 0,6 0,43	Moulis *et al.*, 2006 Irague *et al*., 2012
Dextranes commerciaux		NaN_3 3mM	$4,831.10^5$ $2,906.10^6$	19,2 47,7	0,61-0,37 0,13-0,36	Rolland-Sabaté *et al.*, 2008
Dextranes commerciaux		D_2O	$1,2.10^4$ $1,19.10^7$	2,1 ($\bar{R}_H$) 51,1 ($\bar{R}_H$)	- -	Maina *et al*., 2014
Dextranes commerciaux		NaN_3 3mM	$5,42.10^4$ $3,76.10^6$	6 ($\bar{R}_H$) 30 ($\bar{R}_H$)	- -	Pitkänen *et al*., 2015
Oenococcus kitaharae DSM17330	DSR-OK	NaN_3 3mM	$1,09.10^9$ $1,77.10^9$	380 522	0,46 0,42	Vuillemin *et al*., 2018

Le Tableau 6 recense les masses molaires, les rayons de giration et les conformations en solution des dextranes obtenus à l'aide de différentes souches bactériennes ou de dextranes commerciaux déterminées par HPSEC-MALLS ou AF4-MALLS trouvée dans la littérature la plus récente.

La diffusion statique et dynamique de la lumière ont été utilisées pour montrer que le dextrane était très flexible en solution et que la ramification augmentait avec l'augmentation de masse molaire du polysaccharide (Nordmeier, 1993). Ces informations (Tableau 6 et Figure 17) témoignent qu'un dextrane en solution a plutôt une conformation entre la sphère, avec des valeurs de ν_G proches de 0,33, et la pelote statistique, avec des $\nu_G \sim 0,5\text{-}0,6$.

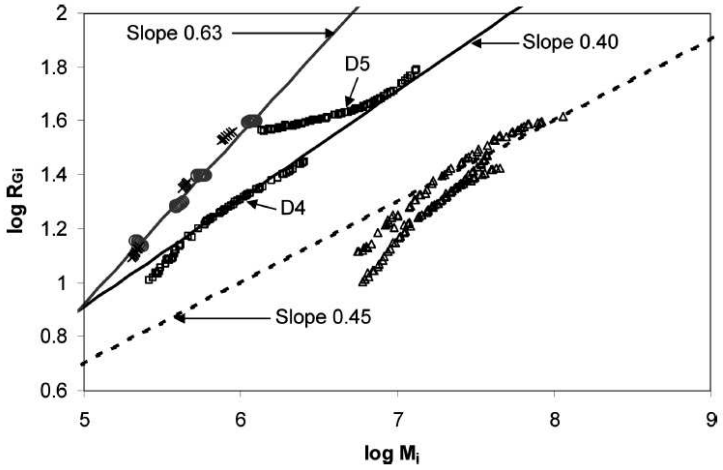


Figure 17 - Courbes logarithmiques représentant le rayon de giration R_{Gi} en fonction de la masse molaire M_i (□) de dextranes commerciaux D4 ($4,85.10^5$ g.mol^{-1})et D5 ($2,91.10^6$ g.mol^{-1}), (○) d'amyloses, (×) de pullulanes et (Δ) de glycogènes et phytoglycogène obtenues dans une solution aqueuse à 0,2 g.L^{-1} NaN_3 à 40 °C (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008) (inversion des pentes 0.40 et 0.45).

Des études par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont également démontré que le dextrane adopte, en solution aqueuse et à de faibles concentrations, une conformation de type pelote statistique (Hirata *et al.*, 1999 et 2003), en dehors des conditions extrêmes de pH (pH < 2), où la chaîne macromoléculaire de dextrane est sensible à l'hydrolyse. Le dextrane est plus stable dans des conditions basiques mais une légère dégradation est observée après 24h à pH 14.

2.2.2. Structure cristalline

Chanzy *et al.* (Chanzy *et al.*, 1980 ; Chanzy *et al.*, 1981) ont obtenus différentes géométries et tailles de cristaux de dextrane en fonction de la méthode de cristallisation et ont permis de caractériser deux types de polymorphes à différentes températures : le polymorphe haute température (HT) et le polymorphe basse température (BT). La structure tridimensionnelle de dextranes de faibles masses molaires a donc pu être élucidée (DP60 et DP120 respectivement). Le polymorphisme est un phénomène fréquemment

observé dans la cristallisation des polysaccharides. Une chaîne de polysaccharide, dans une conformation donnée, a plusieurs façons de s'associer avec les chaînes voisines à travers des liaisons hydrogène. On retrouve ce type de polymorphisme dans le cas de la cellulose (Sarko, 1976 et 1978) ou de l'amylose (Marchessault & Sarko, 1967 ; French & Murphy, 1977). Grâce à sa chaîne principale constituée de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$, le dextrane est un candidat approprié pour le polymorphisme, en raison à la fois de la flexibilité des chaînes ainsi que du potentiel multiple pour les liaisons hydrogène intramoléculaires dans les cristaux.

Les cristaux de dextrane aboutissant à la forme HT sont préparés entre 120 et 200 °C dans un mélange polyéthylèneglycol (PEG)/eau. Ces cristaux lamellaires mesurent plusieurs microns de longueur et environ 1 µm de largeur avec une épaisseur de 7 nm (Figure 18a).

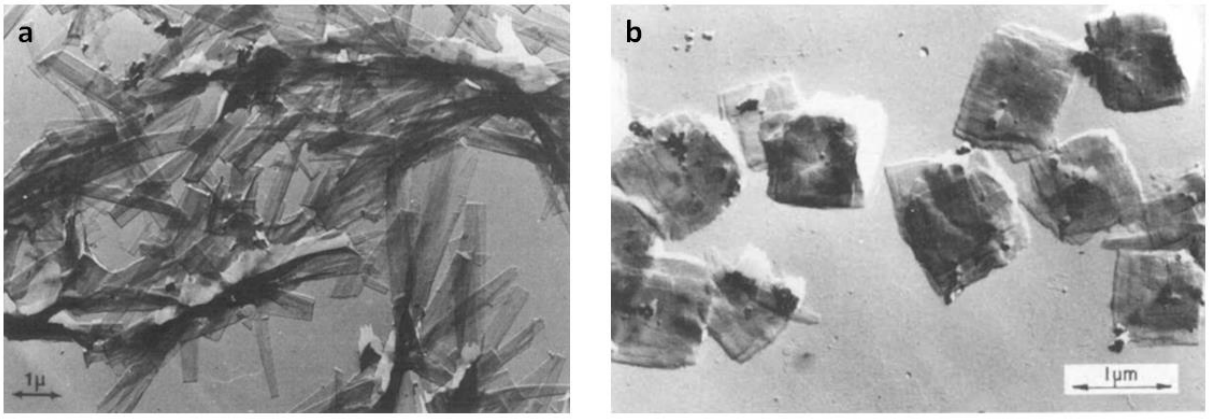


Figure 18 - a. Cristaux de dextrane DP60 obtenus à 160 °C en solution dans un mélange PEG/eau 65/35 (v/v), b. Cristaux de dextrane DP120 obtenus à 95 °C en solution dans un mélange PEG/eau 45/55 (Chanzy *et al.*, 1980 et 1981).

Les paramètres de maille ont été déterminés comme suit : a = b = 0,922 nm, c (axe de la chaîne) = 0,78 nm, $\alpha = \gamma = 90°$ et $\beta = 91{,}3°$. L'espace groupe est $P2_1$* avec b comme axe unique monoclinique. Quelques années plus tard, Guizard *et al.* (1984) ont mis en évidence la conformation des chaînes dans la maille (Figure 19a). Deux chaînes moléculaires anti-parallèles traversent la maille. Celles-ci sont relativement étendues et en forme de ruban. La conformation de la chaîne est stabilisée par une liaison hydrogène intramoléculaire par résidu de glucose ainsi que par des liaisons hydrogène intermoléculaires (Guizard *et al.*, 1984).

La forme BT correspond à des monocristaux lamellaires obtenus entre la température ambiante et 95 °C à l'aide d'un mélange PEG/eau. Ces cristaux sont de forme carrée, d'environ 1 µm de côté et 6 à 7 nm

* D'après le réseau de Bravais : P = maille simple, non cubique, 2 = maille monoclinique, et 1 caractérise un axe de symétrie dans un plan perpendiculaire à l'axe principal.

d'épaisseur (Figure 18b). Les paramètres de maille ont été déterminés par diffraction des électrons (a = 2,563 nm, b = 1,021 nm, c = 1,616 nm et β = 91,3°). L'espace groupe est aussi $P2_1$ avec b comme axe unique monoclinique. La maille contient 6 chaînes ainsi que 8 molécules d'eau. La conformation des chaînes est très similaire au polymorphe HT cependant les positions de rotations des chaînes sont considérablement différentes (Figure 19b) (Guizard *et al.*, 1985). Lorsque des cristaux sont obtenus à des températures entre 90 et 120 °C, un mélange des deux polymorphes en résulte. Les distances interplannaires des deux polymorphes obtenues par diffraction des rayons X sont représentées dans le Tableau 7.

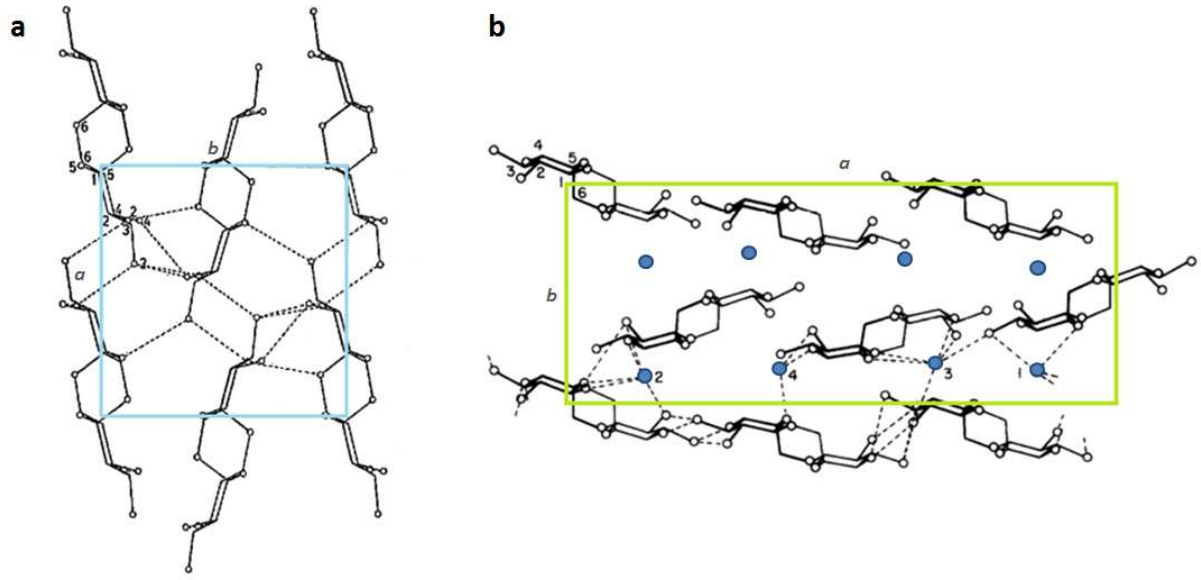


Figure 19 - a. Modèle structural des chaînes de dextrane anhydre du polymorphe haute température. b. Structure des chaînes de dextrane du polymorphe basse température contenant 8 molécules d'eau (cercles bleus) dans la maille. Les liaisons hydrogène sont représentées en trait pointillé (adapté de Guizard *et al.*, 1984 et 1985).

Les données des diagrammes de diffraction d'électrons ont été confirmées avec les données obtenues par diffraction des rayons X à partir de cristaux HT et BT. Seules les données obtenues par diffraction des rayons X sont référencées dans le Tableau 7. Néanmoins, il n'existe pas à l'heure actuelle de caractérisation à l'échelle atomique d'α-glucanes de très hautes masses molaires synthétisés par voie enzymatique.

Tableau 7 – Distances interplannaires obtenues par diffraction des rayons X du dextrane haute température et basse température (adapté selon Chanzy *et al.*, 1980 et 1981).

Polymorphe Haute Température

Espace-d observé (nm)	h	k	l	Intensité[a]
0.651	1	1	0	F
0.595	1	0	1	m
0.501	1	1	1	F
0.461	2 0	0 2	0 0	TF
0.411	2 1	1 2	0 0	m
0.391	2 0 2	0 2 0	1 1 1	m
0.364	2 1 1 2	1 2 2 1	1 1 11	m
0.325	2	2	0	F
0.303	3 2 2	0 2 0	0 1 2	f
0.292	2 0 3 1	2 2 1 3	1 2 0 0	f
0.280	1 1	2 3	2 1	tf
0.256	3 2	2 3	0 0	tf
0.242	2 2	3 3	1 1	tf
0.228	4 0	0 4	0 0	tf
0.222	4 1	1 4	0 0	tf
0.204	4 2	2 4	0 0	tf
0.193	4 1 1	0 3 3	2 3 3	tf
0.185	5 4 3	0 3 4	0 0 0	tf
0.170	5 2	2 5	0 0	tf

Polymorphe Basse Température

Espace-d observé (nm)	h	k	l	Intensité[a]
1.300	2	0	0	m
0.862	0	1	1	tf
0.806	2	1	0	tf
0.656	3	1	0	m
0.592	3	0	2	F
0.557	4	1	0	tf
0.514	0	2	0	F
0.474	2	2	0	F
0.440	3 0 6	2 2 0	0 2 0	TF
0.397	0	0	4	f
0.359	5	2	0	f
0.336	1 2	3 3	0 0	f
0.319	3	3	0	tf
0.306	8 4	1 3	0 0	F
0.279	5	3	1	tf
0.256	0	4	0	tf
0.240	2	4	2	tf
0.229	10 5 11	2 4 1	0 0 0	tf
0.211	12 11 12	0 2 1	0 0 0	tf
0.193	12 11	2 3	0 0	tf
0.181	14 12 14	0 3 1	0 0 0	Tf

[a] TF = Très fort, F = fort, m = moyen, f = faible, tf = très faible.

2.3. Propriétés rhéologiques des dextranes

A faible concentration dans l'eau, les solutions de dextranes ont un comportement rhéologique de type Newtonien, c'est-à-dire que leurs viscosités ne dépendent pas de la vitesse de cisaillement (de Belder, 1990). Lorsque la concentration en dextrane augmente, les interactions chaîne-chaîne sont favorisées aux dépens des interactions chaîne-solvant. Il y a formation d'un réseau de chaînes enchevêtrées conduisant à un comportement rhéofluidifiant, c'est-à-dire que la viscosité diminue avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement (Ioan *et al.*, 2000a ; McCurdy *et al.*, 1994). La viscosité obtenue dépend de la concentration en dextrane, de la température et de la masse molaire du polysaccharide. A 25 °C, une solution de dextrane ayant une masse molaire de 2.10^6 g.mol^{-1} à 10% (m/v) dans l'eau a une viscosité de l'ordre de 50 Pa.s (Granath, 1958 ; Sabatié *et al.*, 1988 ; Carrasco *et al.*, 1989). L'évolution de la viscosité en fonction de la concentration est donnée pour différentes tailles de dextranes (Figure 3).

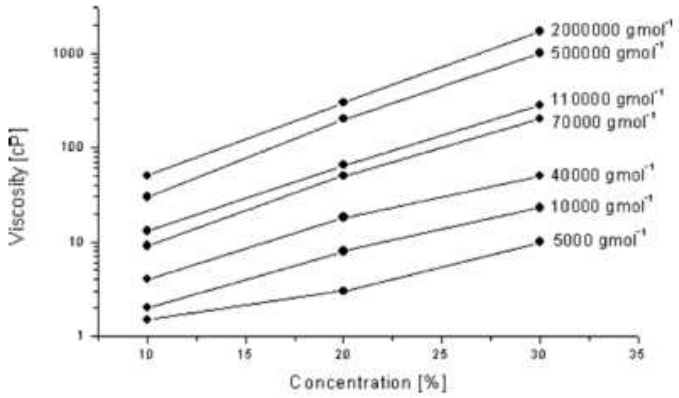


Figure 20 - Représentation de la viscosité en fonction de la concentration pour des dextranes de différentes masses molaires, à 25 °C (Heinze *et al.*, 2006).

Les propriétés viscoélastiques d'une solution de dextrane commercial de 500 000 g.mol^{-1} dans l'eau ont été étudiées par une technique de spectroscopie par ondes diffusantes (DWS) qui est une technique non intrusive basée sur la diffusion de la lumière (Pinder *et al.*, 2006). Les données obtenues sont représentées dans la Figure 21 ci-dessous.

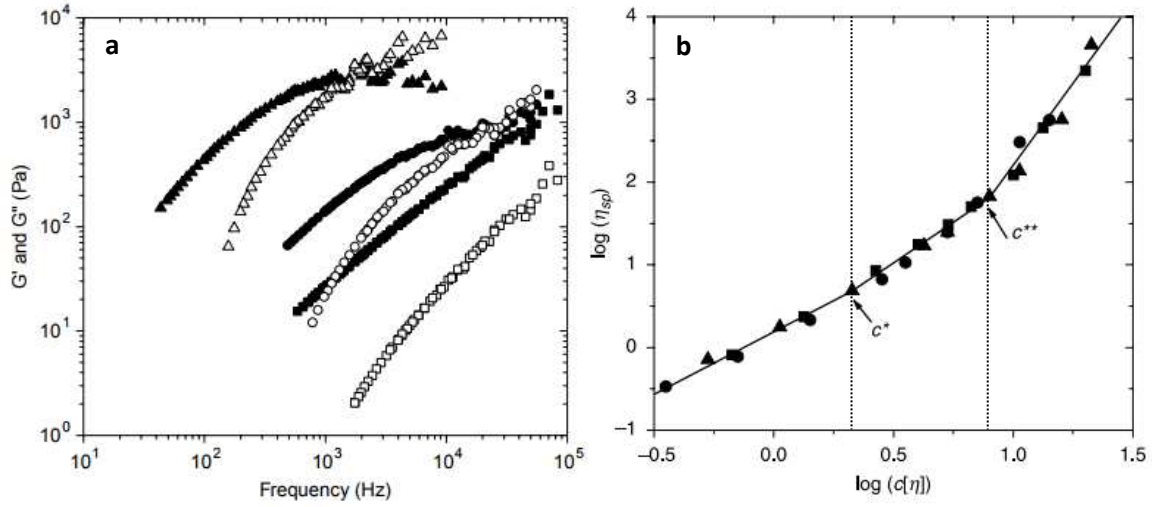


Figure 21 – Propriétés rhéologiques d'une solution de dextrane de 500 000 g.mol^{-1}. a. Module conservatif G' (symbole vide) et module dissipatif G'' (symbole creux) de solutions de dextrane à 10% (■), 20% (●) et 40% (▲) en fontion de la fréquence. **b.** Viscosité spécifique η_{sp} en fonction de la concentration réduite c(η) avec (▲) 5.10^5 g.mol^{-1} ((■) 2.10^6 g.mol^{-1} (●) 2.10^5 g.mol^{-1}) (Pinder *et al*., 2006).

La Figure 21a représente les modules conservatifs G' et dissipatifs G'' de solutions du dextrane à 500 000 g.mol^{-1} en fonction de la fréquence et montre qu'à basses fréquences G'' > G', indiquant le caractère visqueux des solutions. Lorsque la concentration augmente, et à des fréquences élevées, un croisement des courbes est observé, signifiant la transition du régime visqueux vers le régime élastique. La Figure 21b représente la viscosité spécifique de solutions de dextranes en fonction de la concentration de la solution. Trois pentes sont observées correspondant aux trois domaines : dilué, semi-dilué et concentré qui sont délimités par les concentrations critiques C* et C**. Lorsque C < C* il s'agit du régime dilué dans lequel les chaînes de dextranes sont séparées les unes des autres et la viscosité varie selon $\eta = C^{1,4}$. Le régime semi-dilué est délimité par les deux concentrations critiques correspondant aux pelotes qui s'enchevêtrent et se contractent lorsque la concentration augmente jusqu'à C = C** et la viscosité varie selon $\eta = C^2$. Lorsque C > C** alors la viscosité varie selon $\eta = C^{3,8}$.

Les caractérisations physico-chimiques de solutions de dextranes à 5% (p/v) produits par des mutants de dextrane-saccharase DSR-S d'une part, et à partir de l'enzyme DSR-OK d'autre part, ont été déterminées et sont représentées sur la Figure 22 (Irague *et al*., 2012 ; Vuillemin *et al*., 2018). Toutes les courbes d'écoulement de cisaillement pour les dextranes produits à partir de mutants de DSR-S présentent un caractère non-Newtonien car la viscosité apparente diminue avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement (Figure 22a). En revanche, un dextrane (Gcn5) présente deux régions distinctes avec un plateau newtonien à de faibles taux de cisaillement et une région de rhéofluidification à des taux de cisaillement plus élevés, c'est-à-dire le comportement classique de solutions macromoléculaires dont

les propriétés proviennent d'un réseau d'enchevêtrement. Le dextrane produit à partir de l'enzyme DSR-OK a aussi un comportement non-Newtonien et a une viscosité apparente plus élevée que ceux produits à partir de l'enzyme DSR-S (2 030 Pa.s pour DSR-OK, 429 Pa.s pour DSR-S vardel Δ4N et 0,19 Pa.s pour un dextrane commercial de $\bar{M}_W$ = 5-40.10^6 g.mol^{-1} à 1,93.10^{-2} s^{-1}) (Figure 22b). On remarque ici qu'à ces concentrations, le dextrane commercial et le dextrane produit à partir de DSR-S ont un comportement Newtonien. Dans ces deux études, les auteurs ont montré un comportement non-thixotropique de ces dextranes. Dans le cas du dextrane obtenu à partir de DSR-OK, les auteurs ont déterminé une limite d'élasticité de 10 Pa et de 2 Pa pour des solutions de dextrane à 5% et 3% respectivement, premier dextrane pour lequel une limite d'élasticité est décrite.

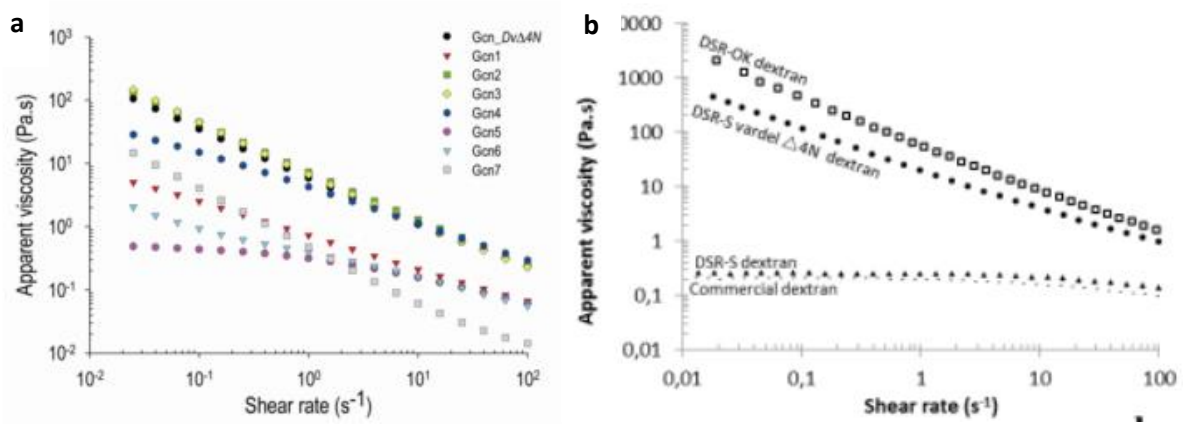


Figure 22 – Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement de différents dextranes produits par synthèse enzymatique. a. dextranes produits à partir de mutants de DSR-S (Irague *et al*., 2012). **b.** dextrane produit à partir de l'enzyme DSR-OK et comparaison avec d'autres dextranes (Vuillemin *et al.,* 2018).

Les spectres mécaniques de ces différents dextranes sont représentés dans la Figure 23 (dans un domaine de viscoélasticité linéaire). Les modules conservatifs G' sont toujours supérieurs aux modules dissipatifs G'' qualifiant un fort comportement élastique (Figure 23a et Figure 23c (DSR-OK)). De plus, la faible dépendance de G'' sur la fréquence et la valeur de tan δ = G''/G' > 0,3 est typique des gels dits faibles (Tokita *et al*., 2009). Les valeurs des modules pour le dextrane obtenu avec DSR-OK sont jusqu'à maintenant les valeurs les plus élevées obtenues pour un dextrane et montrent une meilleure structuration qui est sans doute dû à sa masse molaire > 10^9 g.mol^{-1}. Les spectres mécaniques Figure 23c sont typiques de solutions de polymères enchevêtrés car les modules G' et G'' augmentent avec la fréquence et en dépendent fortement. A basses fréquences, G'' > G', le comportement est de type liquide ; puis lorsque la fréquence augmente, le point de croisement est atteint, et à hautes fréquences le comportement est de type solide (G' > G'').

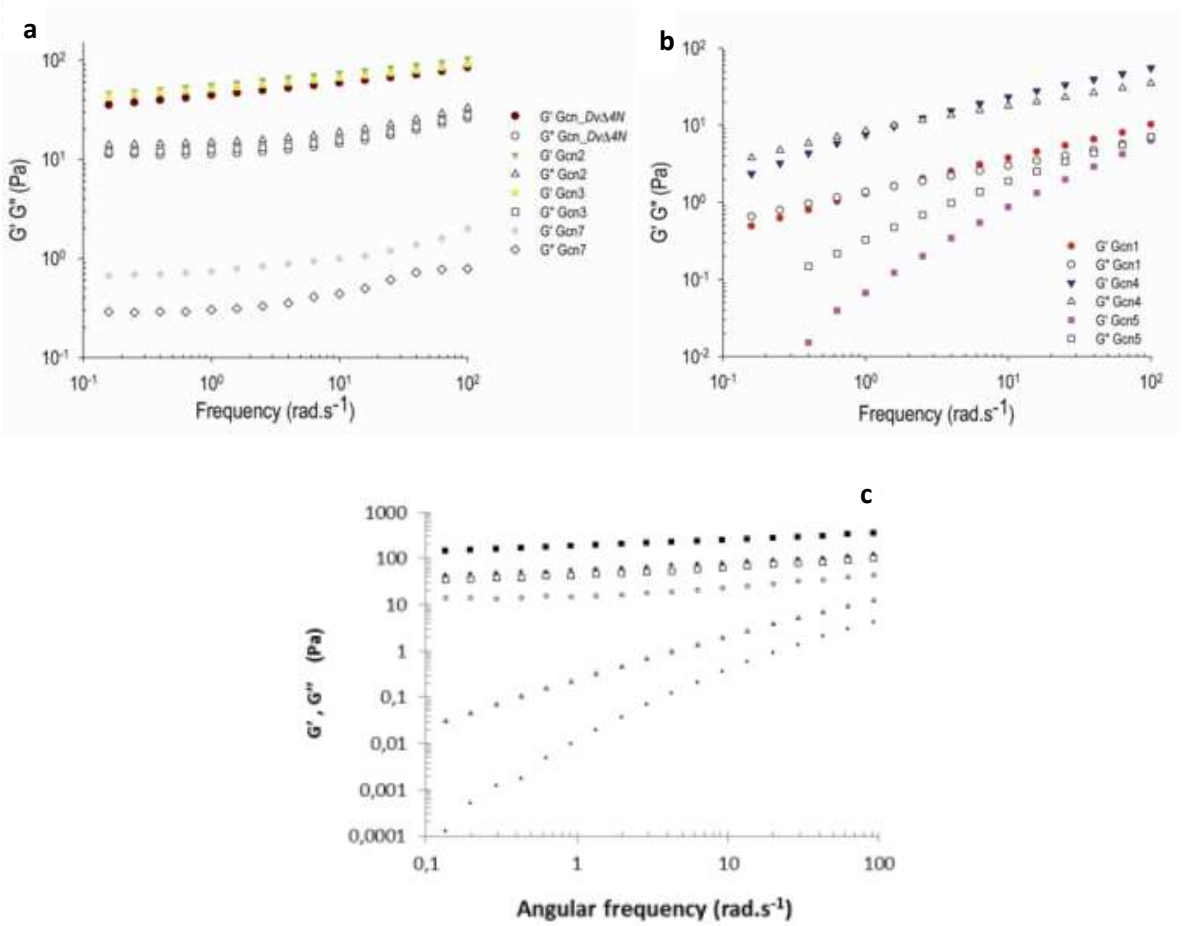


Figure 23 – Modules conservatifs G' et modules dissipatifs G'' en fonction de la fréquence angulaire pour des solutions de dextranes à 5% (p/v) obtenus par synthèse enzymatique. a. et b. dextranes produits à partir de mutants de DSR-S (Irague *et al*., 2012). c. dextrane produit à partir de l'enzyme DSR-OK (■) et comparaison avec d'autres dextranes (●) DSR-S vardel Δ4N dextran, (▲) DRS-S dextran (Vuillemin *et al.,* 2018).

Il est important de noter que le traitement subit par ces dextranes lors des étapes de purification, et notamment à l'étape de précipitation, peut affecter les propriétés viscoélastiques du polymère (Sabatié *et al.,* 1986).

Pour conclure cette partie rhéologie des dextranes, de récents travaux ont montré que les dextranes pouvaient avoir un comportement non-Newtonien. Des propriétés rhéologiques inhabituelles ont été observées pour un dextrane quasi-linéaire, d'une masse molaire > 10^9 g.mol^{-1} (Vuillemin *et al.,* 2018) qui présenterait une structure de type gel, avec une limite d'élasticité ainsi qu'une viscosité plus élevée que celle des huiles les plus utilisées industriellement, laissant entrevoir des applications potentielles comme agent texturant.

2.4. Propriétés thermiques des dextranes

La *température de transition vitreuse* T_g, c'est-à-dire le passage d'un état vitreux à un état caoutchoutique d'un polymère amorphe ou semi-cristallin donné, est influencée par la structure moléculaire des polysaccharides. La T_g augmente lorsque la masse molaire du polymère linéaire augmente. D'après l'étude faite par Icoz *et al.* (2005), aux faibles masses molaires, la T_g augmente avec la masse molaire ce qui peut s'expliquer par une diminution du volume libre limitant la mobilité des chaînes jusqu'à l'obtention d'un plateau. Aux fortes masses molaires, la T_g est constante et il y a formation d'enchevêtrements entre les chaînes à partir d'une masse molaire comprise entre $2{,}3.10^4$ et 3.10^4 g.mol^{-1} (Figure 24a) (Slade & Levine, 1991 ; Icoz *et al.*, 2005). Pour observer la T_g des polysaccharides, il est nécessaire de les hydrater. Dans leur étude, les auteurs ont aussi fait varier la teneur en eau dans chaque échantillon en les conditionnant à diverses humidités. En effet, l'eau est un excellent plastifiant des α-glucanes dont la T_g dépend ainsi fortement de la teneur en eau et s'étend sur des gammes de températures pouvant aller de 400 °C à l'état sec jusqu'à des valeurs négatives à forte teneur en eau pour le dextrane commercial de 500 000 g.mol^{-1} (T500). L'eau améliore ainsi la flexibilité du polymère en augmentant le volume libre autour des chaînes et diminue la valeur de T_g (Figure 24b) (Bizot *et al.*, 1997).

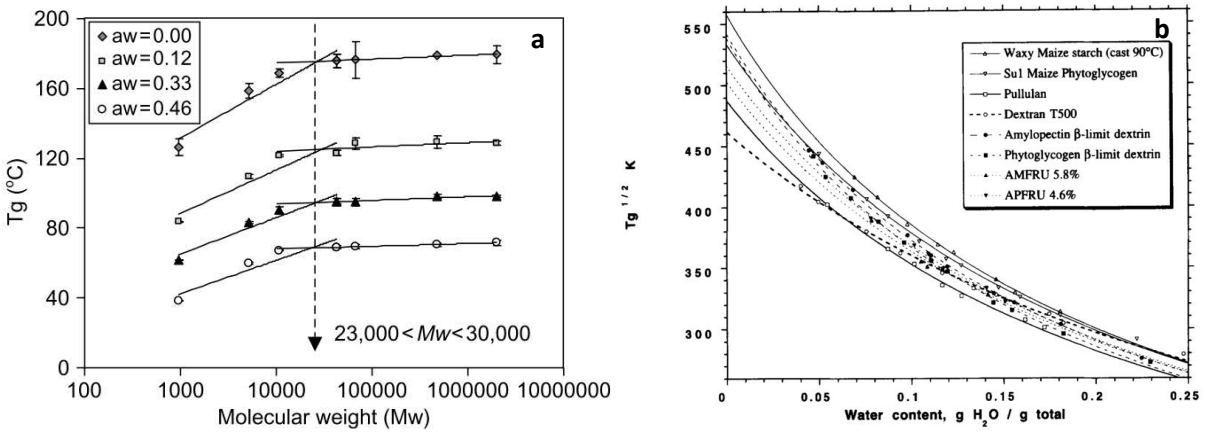


Figure 24 – a. Effet de la masse molaire (M_w) et de l'activité de l'eau (a_w) sur la T_g (°C) de dextranes commerciaux (Icoz *et al.*, 2005). b. Evolution de la T_g (K) de divers polysaccharides ((○) dextrane T500 ; (□) pullulane ; (■) phytoglycogène ; (●) amylopectine) en fonction de la teneur en eau (g H_2O / g total) (Bizot *et al.*, 1997).

Lorsque l'on a un mélange de deux composés, c'est le cas pour un dextrane contenant une certaine quantité d'eau, la valeur de température de transition vitreuse du mélange se situe entre celles des deux composés purs. L'équation de Gordon-Taylor (Gordon & Taylor, 1952) permet de prédire l'évolution de la température de transition vitreuse du mélange avec sa composition et s'écrit comme suit :

$$T_{g\ (mélange)} = \frac{w_1 T_{g1} + k w_2 T_{g2}}{w_1 + k w_2} \quad [38]$$

où $T_{g\ (mélange)}$ représente la température de transition vitreuse du mélange amorphe et homogène, T_{g1} et T_{g2} les températures de transition vitreuse des composés purs, w_1 et w_2 les fractions volumiques des composés 1 et 2, et k un coefficient relié aux amplitudes des sauts de chaleur spécifique à la transition vitreuse ΔC_p des composés purs : $k = \frac{\Delta Cp_2}{\Delta Cp_1}$.

Ainsi, il est possible de prédire les valeurs de température de transition vitreuse de polysaccharides secs en traçant la T_g en fonction de la teneur en eau (Figure 24b) (Bizot *et al.*, 1997). Les auteurs ont pu estimer une température de transition vitreuse pour le dextrane T500 sec de 189 °C et une valeur de k = 0,246. Ils ont comparé cette valeur à d'autres polysaccharides tels que l'amidon plus ou moins riche en amylose ou en amylopectine, le pullulane ou le glycogène. Il s'avère que la T_g du T500 sec est la plus basse. Ceci est dû à la forte présence de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ (> 95%) dans le dextrane ce qui rendrait la chaîne plus flexible grâce à ses trois degrés de liberté de rotation et conduit à une T_g plus basse qu'une chaîne constituée de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ comme l'amylose ou l'amylopectine (Figure 24b). Il est observé que la nature des liaisons osidiques de la chaîne principale et la présence de branchements jouent un rôle sur la T_g. La présence de branchements plus ou moins longs en position $\alpha(1\rightarrow6)$ diminue aussi la T_g mais de façon limitée, ce qui pourrait être dû à la formation de doubles hélices par les chaînes pendantes de l'amylopectine (Bizot *et al.*, 1997). En revanche, l'effet de branchements courts ou longs, liés notamment par des liaisons de type $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$ n'est pas connu pour les dextranes.

Le dextrane est en général amorphe lorsqu'il ne subit aucun traitement. Comme vu précédemment, il peut recristalliser. La *recristallisation exothermique* a été détectée au-dessus de 100 °C pour un dextrane T500 contenant 11,5% d'eau ce qui va entraîner un décalage de la transition vitreuse à une température plus basse ainsi qu'une diminution de la capacité calorifique lors d'un second scan (Bizot *et al.*, 1997). Gekko (1978) a déterminé la *température de fusion* T_f et de *dégradation* T_d par ATG de dextrane de faible masse molaire (1 550 < M_n < 32 100). Il montre qu'au-delà de $M_n > 4.10^3$ g.mol^{-1}, T_f n'est plus dépendant de la masse molaire et est d'environ 220 °C et T_d est compris entre 260 et 300 °C.

2.5. Mise en forme et propriétés mécaniques des dextranes

Pour la première fois en 2012, des films de dextrane ont été obtenus (Irague *et al.*, 2012). Ceux-ci étaient tous transparents, certains étaient rigides et cassants, d'autres étaient flexibles. L'un d'entre eux notamment a montré des propriétés mécaniques remarquables : un comportement ductile accompagné

d'une rupture dans le domaine plastique avec un module d'Young (E) de 0,019 GPa, une contrainte à la rupture (σ) de 3,55 MPa ainsi qu'un allongement à la rupture (ε) de 193,2%. Ces caractéristiques indiquent qu'il s'agit d'un matériau avec une grande élasticité jamais rencontrée avec d'autres polysaccharides tels que le pululllane, l'amidon, le chitosane ou le carraghénane dans lesquels souvent est ajouté un plastifiant (Irague, 2011). Mais ces propriétés mécaniques restent encore faibles comparativement à celles des polymères synthétiques qui peuvent afficher une déformation 3 à 5 fois plus grande ainsi qu'une rupture 6 à 13 fois plus élevée (Gorna *et al.*, 2008).

Les travaux de Frampton *et al.* (2015) ont permis d'obtenir des fibres de dextranes à partir de solutions très concentrées. Les fibres obtenues mesurent 10 µm de diamètre et ont pu être étirées puis tissées en plusieurs couches pour produire des tissus avec diverses orientations aux propriétés mécaniques variées (Figure 25). Les contraintes à la rupture varient entre 1 et 3 MPa suivant l'orientation des fibres dans le tissu. Des essais ont montré qu'un tissu contenant de la thrombine est capable de coaguler le plasma pauvre en plaquettes humaines. Si ce tissu contient un antibiotique, il est aussi capable de supprimer la croissance bactérienne. Les résultats obtenus suggèrent que ce nouveau matériau composé uniquement de dextrane est prometteur pour la délivrance de médicaments dans les pansements.

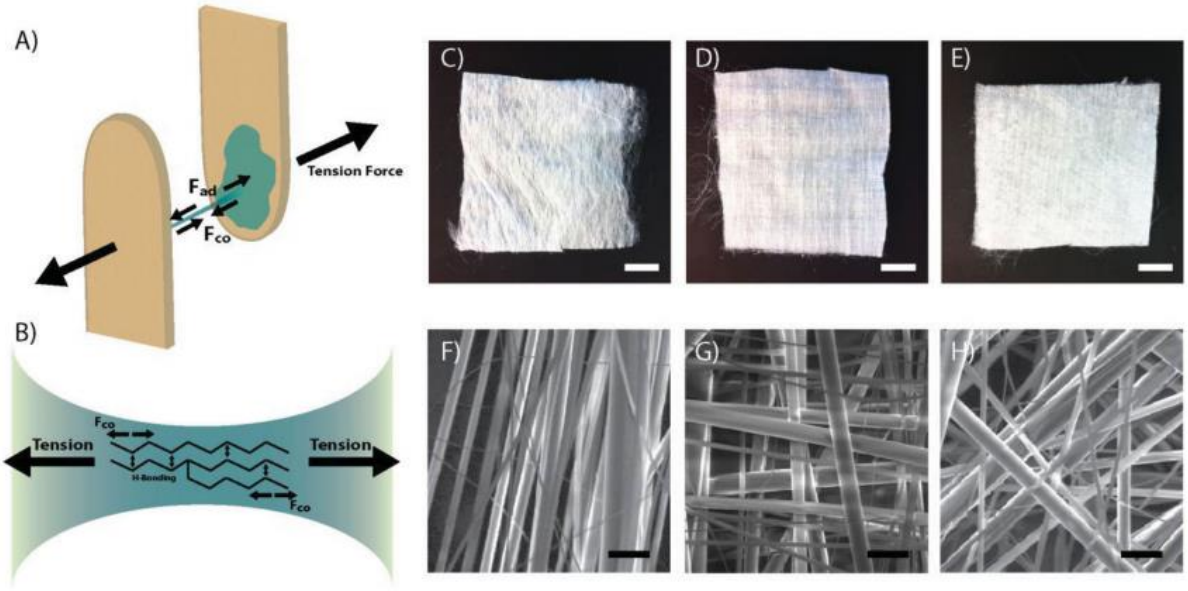


Figure 25 - Formation des fibres de dextranes par étirage. A) Solution de dextrane hautement visqueuse placée entre deux « palettes », F_{ad} montrant les forces d'adhésion et F_{co} les forces de cohésion. B) Au niveau moléculaire, F_{co} résultent des enchevêtrements de chaînes de dextrane grâce aux liaisons hydrogène intermoléculaires. C-E) Les fibres peuvent être allongées formant des tissus multicouches orientées à une direction (180°), deux directions (90°) et plusieurs directions (45°) respectivement. F-H) Images SEM des différents tissus orientés (échelle 50 µm). (Frampton *et al.*, 2015).

2.6. Applications des dextranes

2.6.1. Applications cliniques et biomédicales

Les dextranes sont totalement biocompatibles, faiblement antigéniques, biodégradables et bioéliminables. Toutes ces qualités permettent d'utiliser les dextranes pour des applications *in vivo*. Les dextranes sont hémocompatibles et possèdent des effets anti-thrombiques (empêchent la formation de caillots sanguins) et activateurs de flux sanguin (dilution et diminution de la viscosité du sang, diminution de l'agrégation des plaquettes). Ceci a permis de les utiliser comme substituts du plasma sanguin (Thoren, 1978 ; Dellacherie, 1996). En France, ces substituts sont commercialisés sous les noms de Rhémacrodex® et Macrodex® dont les masses molaires moyennes sont respectivement de 40 000 $g.mol^{-1}$ et 70 000 $g.mol^{-1}$ et plus couramment appelés dextranes T_{40} et T_{70}. Les dextranes-sulfates de faibles masses molaires ont aussi des propriétés d'anticoagulation et sont utilisés en substituts de l'héparine (Heinze *et al.*, 2006). Ces dérivés ont également été étudiés comme agents antiviraux (traitement contre le virus de l'immunodéficience humaine VIH) ou le virus de l'herpès (Piret *et al.*, 2000 ; Hershline, 2004). La masse molaire optimale pour des dextranes à usage clinique est de l'ordre de 40 000 à 100 000 $g.mol^{-1}$. En effet, les dextranes de masses molaires inférieures à 7000 $g.mol^{-1}$ sont éliminés par l'organisme par le système de filtration rénale et sont donc inefficaces (Dellacherie, 1996 ; Mehvar, 2000) alors que les dextranes de fortes masses molaires peuvent entraîner la coagulation du sang et se révéler dangereux (Naessens *et al.*, 2005b). L'intérêt des dextranes cliniques est leur capacité de rétention d'eau (~20 mL d'eau par g de dextrane). Par ailleurs, quelle que soit leur masse molaire, les dextranes sont entièrement dégradés en glucose par la dextranase (α-1 glucosidase). Cette enzyme est présente dans les organes du système des phagocytes mononuclés (foie, rate et rein) (Mehvar, 2000 ; Tsuchiya *et al.*, 1952 ; Rozenfel'd & Senko, 1964). Le glucose est totalement hydrolysé en CO_2 et en H_2O.

Outre leur emploi comme substituts du plasma sanguin, les dextranes présentent la faculté de complexer différents métaux lourds ou certaines lectines afin d'en assurer le transport (Molteni, 1979 ; Rebizak *et al.*, 1997). Le mercaptodextrane est reconnu pour avoir une forte affinité pour les ions métalliques lourds comme l'argent ou le mercure. Sa faible toxicité suggère une possible utilisation lors d'intoxications aux métaux lourds (Jellum *et al.*, 1973). Dans le domaine de la vectorisation de principes actifs, les dextranes peuvent être couplés à un principe actif. On parle alors de vecteurs macromoléculaires ou de prodrogues. Ceci peut se faire grâce aux trois fonctions hydroxyle portées par les unités glucose des dextranes sur lesquelles il est possible de fixer un principe actif de façon covalente. Le dextrane assure

ainsi le transport du médicament (solubilisation accrue des principes actifs faiblement solubles en milieu sanguin) et prolonge la circulation de ce dernier dans le sang, limite sa dispersion hors des vaisseaux sanguins et le protège contre les dégradations chimiques ou biologiques (Yamaoka *et al.*, 1995 ; Elmalak *et al.*, 2000). La libération du principe actif est observée après hydrolyse ultérieure de la liaison le reliant au dextrane. L'insuline fut l'un des premiers principes actifs étudiés et par la suite d'autres agents thérapeutiques (antibiotiques, peptides, enzymes…) ont été fixés au dextrane (Mehvar, 2000 ; Cassano, *et al.*, 2009 ; Zhang & Mehvar, 2001 ; Derkaoui *et al.*, 2010). Aucune réduction de la biodisponibilité du principe actif n'a été observée (dans certains cas une augmentation a été observée).

Lorsque que l'on injecte du dextrane par voie sanguine, un risque d'hypersensibilité immunitaire (réaction anaphylactique) est présent pour 20% de la population et est lié à la structure du polymère (Naessens *et al.*, 2005b). Ce risque peut néanmoins être réduit d'un facteur 35 en injectant un dextrane de faible masse molaire (10 000 $g.mol^{-1}$) comme haptène monovalent (Messmer *et al.*, 1980).

La possibilité d'utiliser les dextranes comme constituant d'hydrogels pour l'encapsulation et la libération contrôlée de peptides ou de protéines a également été étudiée. Ces hydrogels sont généralement obtenus par polymérisation radicalaire de groupements méthacrylate greffés sur les dextranes. Il est important de contrôler le taux de réticulation de ces réseaux afin de moduler leurs vitesses de dégradation ainsi que celle de la libération de la protéine (Hennink *et al.*, 1997, Franssen *et al.*, 1999 ; Casadei *et al.*, 2006). Plus récemment, des applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire pour maintenir, réparer et/ou reconstruire des tissus ou des organes endommagés ont été répertoriées (Sun *et al.*, 2010).

2.6.2. Applications en chromatographie

Grâce aux groupements hydroxyles libres, les dextranes peuvent être fonctionnalisés. Ces dérivés de dextranes sont très utilisés comme gels hydrophiles insolubles dans des supports chromatographiques commercialisés depuis 1961 sous la marque Sephadex® (nom dérivé de : SEparation PHArmacia DEXtran) (Flodin & Porath, 1961). Ces gels sont obtenus par co-réticulation des dextranes avec l'épichlorhydrine et possèdent des pores de tailles variées et contrôlées permettant de balayer un large spectre de limite d'exclusion stérique. Ils sont généralement utilisés pour la séparation et/ou la purification de polysaccharides, protéines et acides nucléiques. D'autres dérivés des dextranes ont également été développés afin de permettre d'autres techniques de séparation comme l'échange d'ions ou les interactions hydrophobes (Leathers, 2005). On retrouve les carboxymethyl (CM) Sephadex®,

diethylamnoethyl (DEAE) Sephadex®, diethyl (2-hydroxypropyl) aminoethyl® (QAE) Sephadex, sulfopropyl (SP) Sephadex®, Sephacryl® ou encore Superdex®.

Les dextranes peuvent être utilisés comme références standards en chromatographie. Dans un système AF4 ou HPSEC, le « blue dextran » d'une masse molaire de 2.10^6 g.mol^{-1} permet de vérifier visuellement ou spectrophotométriquement (280 nm) qu'aucun dysfonctionnement n'est présent par vérification de son temps de rétention. Il existe aussi un certain nombre de dextranes standards (allant de 1 000 à 1 100 000 g.mol^{-1} vendus par Merck) permettant de calibrer les colonnes. Ils sont purifiés par chromatographie afin d'avoir une distribution relativement monodisperse.

2.6.3. Applications en agroalimentaire

Les dextranes sont aussi exploités pour leur pouvoir gélifiant, texturant, stabilisant et épaississant dans le secteur de l'agroalimentaire comme d'autres polysaccharides extraits de plantes (amidon, carraghénanes, alginates…) ou d'origine microbienne (xanthane). En 2001, l'Union Européenne a autorisé l'addition du dextrane produit par *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F (composé à plus de 95% de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ avec une masse molaire supérieure à 2.10^6 g.mol^{-1}) dans les produits boulangers, les confiseries et les crèmes glacées comme agent texturant, et ce à raison de moins de 5% en masse sur le produit fini (Scientific Committee On Food, 2000). Des études menées sur les pâtes à pains ont montré que l'incorporation de dextrane produit par la souche *Ln. mesenteroides* LMGP-16878 à la pâte permettait d'améliorer l'effet croustillant ainsi que le volume et la douceur des pains. Il peut donc remplacer les agents chimiques utilisés en panification comme le bromate de potassium ou l'acide ascorbique par exemple. L'effet texturant obtenu par l'ajout de dextrane serait de meilleure qualité que celui obtenu par addition de xanthane ou de gomme de guar (Vandamme *et al.,* 2002).

Dans l'industrie agroalimentaire, la présence de dextranes, dûe aux micro-organismes *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, dans la canne à sucre ou la betterave contribue à la détérioration post-récolte de la plante ou du légume. Les dextranes insolubles favorisent le colmatage des filtres, des canalisations et des réservoirs et peuvent entraver l'élimination des matières en suspension au stade de la clarification pendant la fabrication du sucre brut, notamment dans l'industrie du rhum. Les micro-organismes *Glucunobacter* peuvent détériorer la bière en produisant du dextrane à partir de maltodextrines rendant la bière visqueuse (Naessens *et al.*, 2005b).

Les dextranes de faible degré de polymérisation (composés de 2 à 10 unités glucosyle) attirent de plus en plus l'attention du fait de leurs propriétés prébiotiques[†] à l'interface entre le domaine pharmaceutique et alimentaire. Notamment, les liaisons en $\alpha(1\rightarrow2)$ sont très rares dans la nature et confèrent aux produits synthétisés une activité prébiotique incontestable (Valette *et al.*, 1993).

3. L'amylose

3.1. Obtention des amyloses

L'amylose est un polymère de structure principalement linéaire et est, avec l'amylopectine, un des polysaccharides constitutifs de l'amidon. L'amylose peut être extraite de l'amidon ou produite *in vitro* par synthèse enzymatique grâce à l'amylosaccharase ou la phosphorylase (Buléon *et al.*, 2007). L'amylose est retrouvée à différentes proportions dans l'amidon, variant de 20 à 30% pour les variétés « normales », selon l'origine botanique (pomme de terre, pois, maïs). Quelques amidons peuvent en contenir moins de 1% (maïs cireux ou waxy) ou entre 45 et 80% (amylomaïs) (Zobel, 1984). L'amylose est constitué d'unités glucosyles reliées par des liaisons de type $\alpha(1\rightarrow4)$ (Figure 26). Les chaînes d'amylose ont un degré de polymérisation variable en fonction de l'origine botanique, entre 500 et 6000 unités glucose, correspondant à une masse molaire entre 10^5 et 10^6 $g.mol^{-1}$ (Buléon *et al.,* 1990). La présence de quelques molécules ramifiées présentant quelques chaînes linéaires reliées à la chaîne principale par des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ de manière aléatoire est désormais reconnue (Svihus *et al.*, 2005 ; Lehmann & Robin, 2007).

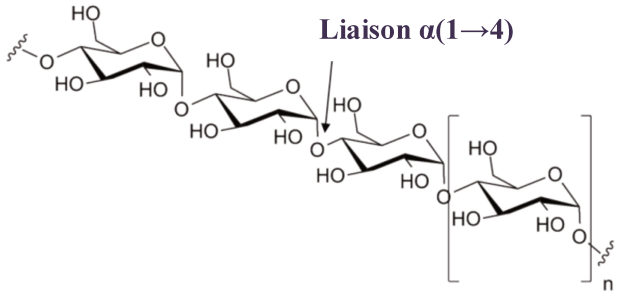


Figure 26 – Structure chimique de l'amylose (chaîne principale constituée de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$.

Deux souches bactériennes responsables de la synthèse d'$\alpha(1\rightarrow4)$ glucanes sont à ce jour référencées : *Neisseria polysaccharea* et *Deinococcus radiodurans.* L'amylosaccharase produite à partir de *Neisseria*

[†] Un prébiotique est un composé alimentaire non digestible, généralement constitué de 2 à 20 unités d'oses, qui affecte l'hôte de façon bénéfique en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une ou plusieurs espèces bactériennes dans le côlon.

polysaccharea permet d'obtenir une amylose insoluble à partir du glucose sans nécessité de donneur de glucosyles (Potocki de Montalk *et al.*, 2000). Lorsqu'une longueur et une concentration critique des chaînes sont atteintes, les chaînes d'amylose précipitent (Albenne *et al.*, 2004 ; Potocki-Véronèse *et al.*, 2005). La morphologie et la structure du précipité dépendent de la concentration en sucrose de départ. En utilisant une forte concentration en sucrose, l'amylosaccharase va produire une forte concentration de chaînes d'amylose qui vont précipiter à un faible degré de polymérisation. A l'inverse, avec une faible concentration en sucrose, les chaînes d'amylose auront plus de temps pour croître avant la précipitation et présenteront un degré de polymérisation (DP) plus important. De manière générale, le degré de polymérisation moyen de ces amyloses est compris entre 30 et 60 et ces amyloses sont plutôt polydispersées (Potocki-Véronèse *et al.*, 2005). Ces amyloses obtenues par synthèse *in vitro* sont hautement cristallines, de type cristallin B, quelque soit la longueur de la chaîne. En revanche, les longues chaînes d'amylose vont précipiter en formant un réseau alors que les courtes chaînes précipiteront sous forme d'agrégats polycristallins (sphérolites, axialites) (Buléon *et al.*, 2007).

La phosphorylase permet aussi de synthétiser *in vitro* l'amylose mais il est nécessaire d'utiliser un substrat glucose 1-phoshate (G1P) activé pour transférer un glucose à l'extrémité non-réductrice d'une molécule acceptrice présentant des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ avec un DP de 4 minimum. La longueur des chaînes d'amylose synthétisées dépend du rapport G1P/molécule acceptrice. Le DP peut varier de 25 à 14 000 suivant si ce rapport est faible ou élevé respectivement. Les amyloses synthétisées par cette voie ne conduisent pas à des produits hautement cristallins. Il est possible d'obtenir des fractions monodispersées d'amylose de faible DP en utilisant une chaîne d'acide gras de longueur connue lors de la synthèse afin de complexer l'amylose. La structure de ces complexes varie en fonction de la température à laquelle la complexation a lieu (Gelders *et al.*, 2005).

Tableau 8 – Provenance de l'amylosaccharase et pourcentage liaisons osidiques présentes dans les amyloses synthétisées.

Organisme	Liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow4)$	Références
Alteromonas addita	100	Ha *et al.*, 2009
Alteromonas macleodii	100	Ha *et al.*, 2009
Deinococcus geothermalis	100	Emond *et al.*, 2008
Deinococcus radiodurans	100	Pizzut-Serin *et al.*, 2005
Neisseria polysaccharea	100	Potocki de Montalk *et al.*, 2000

3.2. Structure des amyloses

3.2.1. Structure moléculaire et macromoléculaire

Les caractéristiques macromoléculaires en solution de l'amylose extraite de l'amidon sont répertoriées dans la littérature (I'anson *et al.*, 1985 ; Roger & Colonna, 1996 ; Roger *et al.*, 2000). Celles des amyloses obtenues par synthèses enzymatiques seront détaillées. A l'aide d'un fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique et d'une détection par diffusion de la lumière, la conformation en solution d'amyloses de synthèse a pu être déterminée en milieu aqueux alcalin et en milieu organique (DMSO). Les coefficients a, υ_G et υ_H dans les relations taille-masse sont respectivement de 0,61-0,68, 0,52 et 0,57 dans le DMSO, tandis que les coefficients υ_G sont respectivement de 0,62 et 0,52 dans KOH 0,1N et dans l'eau. Ces valeurs ainsi que les valeurs de ρ ($=\overline{R_G}/\overline{R_H}$) situées entre 1,5 et 2,2 traduisent un comportement de type pelote statistique en bon solvant dans les cas du DMSO et de KOH 0,1N, et de type pelote statistique en solvant θ, dans le cas de l'eau. La longueur de persistance des chaînes d'amylose en milieux aqueux est de 1,5 nm (Roger *et al.*, 2000). L'amylose est donc une molécule très flexible en solution.

Tableau 9 - Comportement moléculaire en solution d'amyloses naturelles et d'amyloses de synthèse (Rolland-Sabaté *et al.*, 2011).

Amylose	Références	Solvant	Intervalle de masses molaires $\bar{M}_w \times 10^3$ g.mol^{-1}	υ_H	υ_G	a	ρ
Amylose de synthèse	Roger *et al.*, 2000	H_20	240 – 1200	-	0,52	-	-
	Radosta *et al.*, 2001	DMSO	237 – 1000	0,57	0,52	-	1,5 – 2,2
Amyloses naturelles	Roger *et al.*, 1996	KOH 0,1N	340 - 1050	-	-	0,61 – 0,68	2,54 – 3,81

Il est possible d'étudier les ramifications de l'amylose en utilisant une β-amylase. Cette enzyme hydrolyse seulement les liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ pour former du maltose, son activité est alors stoppée lorsqu'elle rencontre une liaison $\alpha(1\rightarrow6)$. Les taux de β-amylolyse généralement reportés se situent entre 70% et 100% (lorsqu'aucune ramification n'est présente).

3.2.2. Structure cristalline

Bien que faiblement impliqué dans la structure cristalline de l'amidon, l'amylose peut être recristallisée en différents allomorphes, comme ceux rencontrés dans l'amidon natif (types A, B et V) (Buléon *et al.,* 2007). Les diffractogrammes des différents allomorphes sont représentés sur la Figure 27a. Les chaînes d'amylose s'organisent en double hélices gauche à 6 monomères par tour. Chaque double hélice est disposée parallèlement à sa voisine avec un décalage d'un demi-pas selon l'axe de la double hélice. Cette structure est stabilisée par un réseau d'interactions de type Van der Waals et de liaisons hydrogènes. L'empilement de ces doubles hélices dans la maille cristalline dépend du type cristallin : le type A correspond à une maille cristalline de type monoclinique (a = 2,124 nm, b = 1,172 nm, c = 1,069 nm, et γ = 123,5°) peu hydratée contenant 4 molécules d'eau formant ainsi une structure dense (Popov *et al.*, 2006), tandis que le type B, correspond à une maille hexagonale (a = b = 1,85 nm, c = 1,04 nm et γ = 120°) constituée d'une structure hydratée contenant 36 molécules d'eau au centre (Figure 27b) (Imberty & Perez, 1988 ; Takahashi *et al.*, 2004). Le type V est caractéristique des formes cristallines complexées de l'amylose. Lorsque l'amylose est complexée par l'iode ou par des alcools, ces complexes peuvent s'associer pour former des cristaux hydratés de type V_H. Suivant l'état d'hydratation de l'amylose complexée il est aussi possible de rencontrer le type cristallin anhydre, V_A.

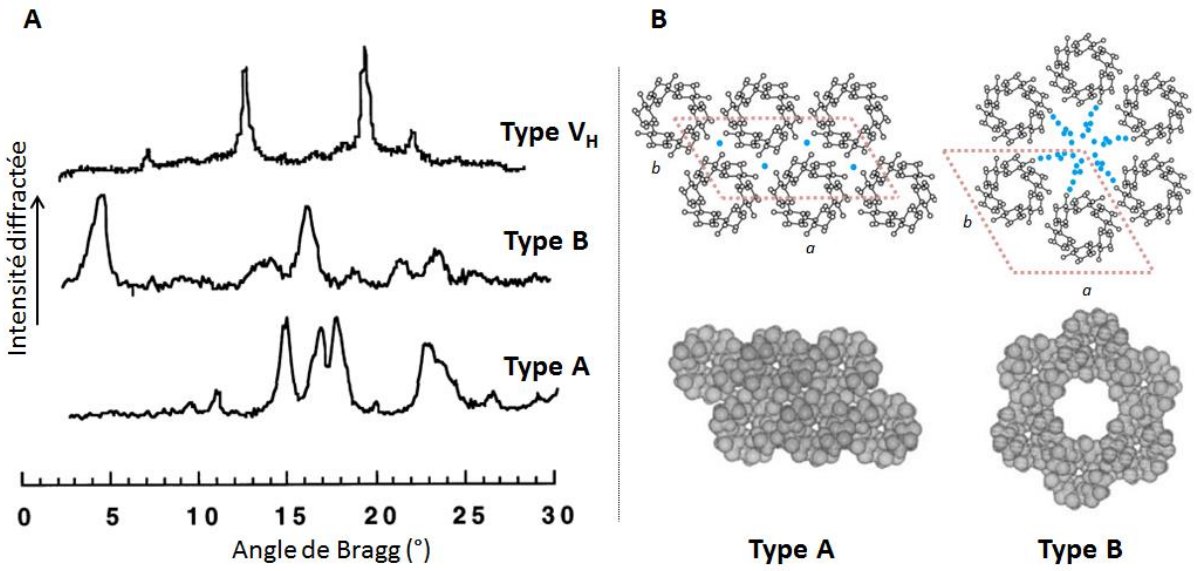


Figure 27 – Diagramme de diffraction des rayons X de l'amylose de type A, B et V_H (A) et projection des mailles cristallines selon le plan (a,b) des doubles hélices de l'amylose de type A et B (en bleu, molécules d'eau).

La recristallisation et l'auto-association de l'amylose dans des solutions aqueuses ont été largement étudiées pour comprendre la cristallisation de l'amidon. L'amylose peut être cristallisé à partir de solution par refroidissement (Gidley, 1989 ; Leloup *et al.*, 1992) ou par addition de précipitant (Buléon

et al., 1984 ; Brisson *et al.*, 1991). Selon la longueur de la chaîne, la concentration et la température, des gels, des sphérolites ou des cristaux peuvent être formés avec un type allomorphe A ou B. D'autres allomorphes (différents types V) dépendant du ligand sont obtenus lorsque l'amylose est complexée avec des molécules telles que des alcools, des lipides ou des arômes. L'amylose s'associe également dans des réseaux, des sphérolites ou des axélites pendant la synthèse enzymatique *in vitro* par l'amylosaccharase (Buléon *et al*., 2007).

Dans la plupart des cas, des hautes températures, des faibles longueurs de chaîne ou des conditions hydrophobes favorisent une cristallisation de type A alors que le type B est généralement formé à faible température avec de plus grandes longueurs de chaîne.

3.3. Formation de complexes avec l'amylose

Du fait de sa linéarité et de la présence de liaisons de type $\alpha(1\rightarrow4)$, l'amylose peut complexer de nombreuses molécules organiques (arômes) ou inorganiques, comme l'iode, des molécules hydrophobes telles que les acides gras libres ou les lipides monoacylés. Ces complexes adoptent une conformation hélicoïdale de type V_H avec 6 unités glucose par tour présentant un pas de 8 Å, dans laquelle les groupements hydrophiles sont orientés vers l'extérieur formant ainsi une cavité hydrophobe d'un diamètre de 4,5 Å accueillant les agents complexants (Rundle & French, 1943 ; Buléon *et al.,* 1998). La Figure 28 montre l'inclusion de la chaîne aliphatique de l'acide gras ou de l'iode à l'intérieur de la cavité de l'hélice d'amylose.

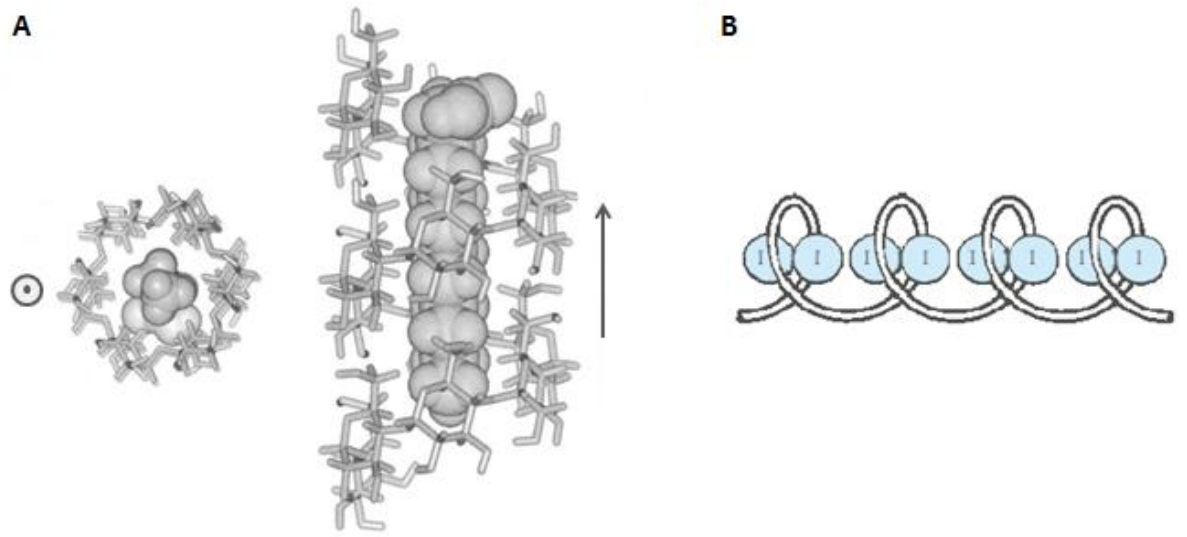


Figure 28 – Représentation du complexe amylose-acide gras avec inclusion d'une chaîne aliphatique en C12 dans une simple hélice d'amylose de type V_H (Buléon *et al.*, 1998) (A) et du complexe amylose-iode (B).

A partir du complexe amylose-acide gras, le dosage de l'amylose peut être réalisé par analyse enthalpique différentielle (DSC, differential scanning calorimetry) (Mestres *et al.*, 1996). Dans le cas de l'iode, la formation de ce complexe conduit au développement d'une couleur bleue caractéristique dont la longueur d'onde au maximum d'absorption varie de 620 à 640 nm. La formation du complexe amylose-iode est probablement initiée par la liaison de I_3^- à l'amylose pouvant se réarranger en I_2, I^-, I_5^- et la distance entre atomes d'iode est de 3,1 Å (Saenger, 1984). La couleur du complexe dépendra du nombre d'ions inclus. Cette réaction est à la base de certaines caractérisations analytiques de l'amylose permettant de déterminer son degré de polymérisation (Figure 29) (John *et al.*, 1983) ou sa teneur. Les auteurs précisent que d'après leurs résultats expérimentaux, aucune couleur n'est observée jusqu'à un DP ~ 20.

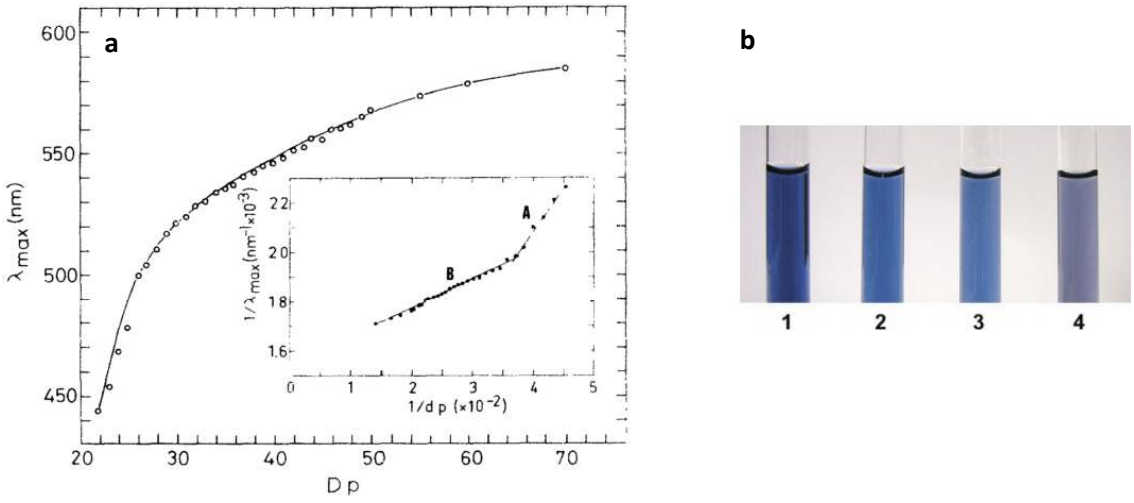


Figure 29 – a. Relation entre le λ_{max} de complexe maltosaccharide-iode et le DP (John *et al.*, 1983). b. Couleurs de différents complexe I_3^-amylose 1. Amylose de pomme de terre linéaire 2. Amylose de pomme de terre soluble. 3. Amylose de riz soluble. 4. Amylose de blé soluble. (Mukerjea & Robyt, 2010).

Il est ainsi possible de quantifier l'amylose par mesure de la capacité de liaison à l'iode (IBC, iodine binding capacity) qui est de 20 mg d'iode pour 100 mg d'amylose (Larson *et al.*, 1953). Dans le cas de l'amidon, la formation de ces complexes avec des lipides peut modifier certaines propriétés, notamment la résistance à l'hydrolyse enzymatique et l'aptitude des grains au gonflement. Le piégeage de molécules actives dans des substrats d'amylose montre un potentiel intéressant pour la vectorisation et la libération contrôlée.

Les solutions d'amylose ne sont pas très stables en raison de la forte tendance à former des liaisons hydrogène intramoléculaires, donnant lieu à une transition pelote statistique-double hélice, et à une forte tendance à la cristallisation par entassement de chaînes (première étape du phénomène appelé "rétrogradation") (Eliasson *et al.*, 1993 ; Buléon *et al.*, 1990).

3.4. Applications des amyloses

Elles sont largement utilisées en agroalimentaire pour leurs pouvoirs texturants, leurs propriétés de complexation d'arôme et comme prébiotiques (« amidon résistant »). Les amyloses pourraient aussi être utilisées pour la complexation de principes actifs. L'amylosaccharase bactérienne présente donc un intérêt pour la synthèse *in vitro* d'amyloses, et ce pour des applications potentielles dans ces mêmes domaines (Rolland-Sabaté *et al.*, 2004 ; Potocki-Véronèse *et al.*, 2005). La capacité des amyloses à former des films a conduit à une étude approfondie de leurs utilisations dans les produits industriels des plastiques dégradables. Les amyloses modifiées chimiquement trouvent des applications dans l'industrie du papier en tant qu'additif humide, agent de colle, liant d'enrobage et adhésifs (BeMiller & Whistler, 2009). Récemment, une étude a montré le développement d'un matériau biosourcé à base d'amylose formant un hydrogel par inclusion d'une chaîne synthétique hydrophobe (Figure 30) (Kadokawa, 2012).

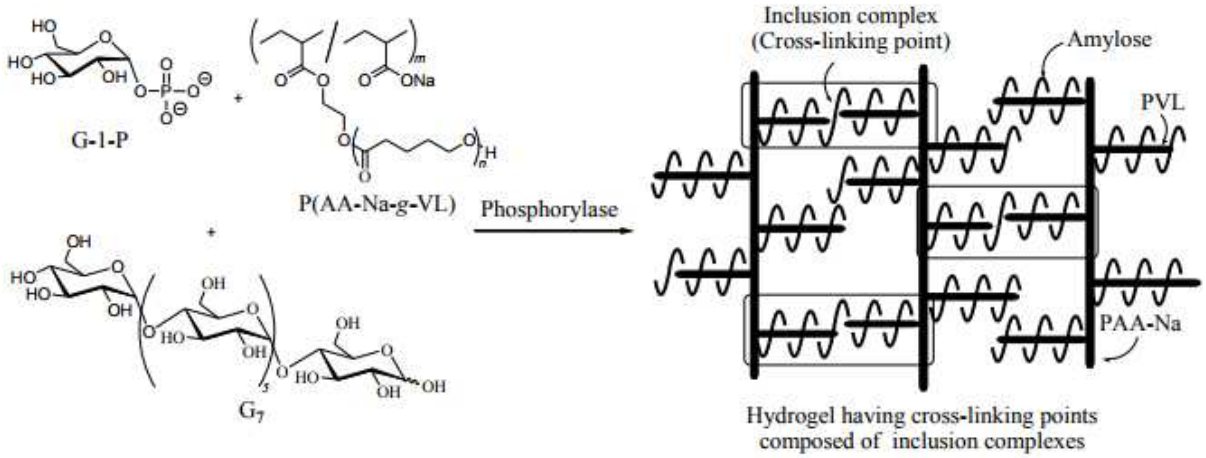


Figure 30 – Réaction enzymatique permettant la formation de l'hydrogel à base d'amylose (Kadokawa, 2012).

4. Les alternanes

4.1. Structure et obtention des alternanes

L'alternane est un polymère de glucose associé par des liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ alternées possédant de longs branchements en position $\alpha(1\rightarrow6)$ (Striegel *et al.*, 2009) (Figure 31). Celui-ci est obtenu par l'action d'une saccharase, l'alternane-saccharase ASR, excrétée par des souches de *Ln. mesenteroides* ou encore *Penicillium* sp. (Jeanes *et al.*, 1954 ; Seymour & Knapp, 1980 ; Kim & Robyt, 1994 ; Leathers *et al.*, 2003). Les alternanes sont solubles dans le DMSO et tendent à s'agréger dans

l'eau (Striegel *et al.*, 2009). Leur structure leur confère une résistance aux glycoside-hydrolases humaines (dextranases, amylases).

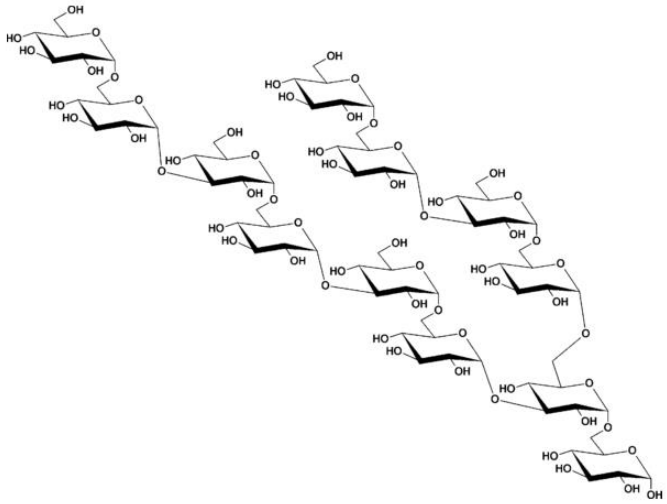


Figure 31 – Structure chimique de l'alternane proposée par Côté (2002) : chaîne principale constituée d'une alternance de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)/\alpha(1\rightarrow3)$ avec des ramifications en $\alpha(1\rightarrow6)$.

Les alternanes ont une masse molaire moyenne en poids de 10^6-10^7g.mol^{-1}. Une étude a montré que l'étude de la structure des alternanes par SEC-MALLS-DRI pouvait s'avérer compliquée du fait de la dégradation du polysaccharide dû au cisaillement dans la colonne de chromatographie, ainsi que de phénomènes d'agrégation de l'alternane dans l'eau (Striegel *et al.*, 2009). Cette dégradation est représentée sur la Figure 32.

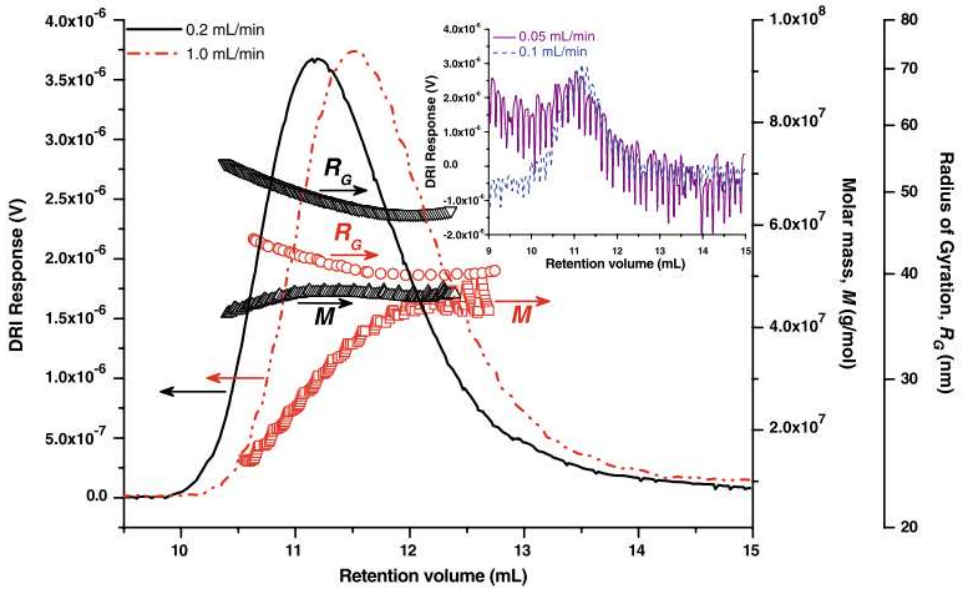


Figure 32 - Dégradation de l'alternane pendant une analyse par SEC à 50 °C dans le DMSO à deux débits : 0,2 mL.min^{-1} et 1,0 mL.min^{-1} (Striegel *et al.*, 2009).

Les valeurs obtenues pour l'alternane à des débits de 0,2 et 1,0 mL.min^{-1} sont respectivement de 4,395.10^7 g.mol^{-1} et de 3,546.10^7 g.mol^{-1} pour les masses molaires moyennes et de 49 nm et 43 nm pour les rayons de giration moyens. La dégradation est mise en évidence par la diminution de la masse molaire et du rayon de giration avec l'augmentation du débit. Pour contourner les problèmes rencontrés avec l'analyse de l'alternane par SEC-MALLS, les techniques de chromatographie hydrodynamique (HDC-MALLS) et de MALLS hors-ligne ont été investiguées par Isenberg *et al.* (2010) sur deux alternanes produits avec deux enzymes différentes B-1355 et B-21297. Les valeurs de dn/dc de ces alternanes produits avec l'enzyme B-1355 et l'enzyme B-21297 dans le DMSO à 50 °C sont de 0,072 mL.g^{-1} et de 0,066 mL.g^{-1} respectivement. Les résultats sont résumés dans le Tableau 10.

Tableau 10 – Masses molaires et rayons de giration de deux alternanes mesurés par MALLS hors-ligne, HDC/MALLS et SEC/MALLS (Isenberg *et al.*, 2010).

	B-1355			B-21297		
	MALLS hors ligne	SEC/MALLS /DRI	HDC/MALLS /DRI	MALLS hors ligne	SEC/MALLS /DRI	HDC/MALLS /DRI
$\bar{M}_w$ (×10^7 g.mol^{-1})	4,95	4,41	4,85	5,98	4,86	5,08
$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	-	1,06	1,19	-	1,02	1,61
$\bar{R}_{Gz}$ (nm)	57	47	59	63	45	57

Ces données mettent en évidence la dégradation du polysaccharide dans les colonnes SEC étant donné que la masse molaire et le rayon de giration sont inférieurs à ceux trouvés par MALLS hors-ligne et HDC/MALLS. L'HDC/MALLS a permis de limiter cette dégradation. Une légère dégradation des très hautes masses molaires est cependant observée pour l'alternane B21297 en HDC/MALLS ; ceci pourrait être évité en utilisant un fractionnement par couplage flux-force compatible avec le DMSO (Isenberg *et al.*, 2010).

4.2. Propriétés rhéologiques des alternanes

Des solutions concentrées à 5% (p/v) d'alternane natif de *Ln. citreum* B-1355 présentent une viscosité ~ 100 fois moins élevée comparativement à celles du dextrane natif produit par *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F. Des alternanes de masses molaires moyennes en poids <10^6 g.mol^{-1} peuvent être obtenus par ultrasonication ; les propriétés rhéologiques sont alors modifiées et se rapprochent de celles de la gomme arabique. Les viscosités intrinsèques des alternanes produits avec B-1355 et B-21297 sont de 11,4 et 14,3 mL.g^{-1} respectivement dans le DMSO à 50 °C. A titre de comparaison, un pullulane de masse molaire à 1,6.10^6 g.mol^{-1} a une viscosité intrinsèque de 352 mL.g^{-1} dans les mêmes conditions. En extrapolant à une masse molaire semblable à celles des alternanes trouvée précédemment (M_w ~ 5,5.10^7

g.mol^{-1}) et en utilisant la relation de Mark-Houwink-Sakurada, la viscosité intrinsèque du pullulane serait de ~ 4300 mL.g^{-1} soit 300 fois supérieure à celles des alternanes (Isenberg *et al.*, 2010). Les alternanes ont donc une conformation très compacte en solution avec un impact conséquent sur la viscosité intrinsèque des solutions.

4.3. Applications des alternanes

Les alternanes sont aussi de très bons prébiotiques du fait de l'alternance des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ (Côté *et al.*, 2003). Cette structure particulière confère à ce polymère une résistance aux glycoside-hydrolases humaines et favorise la croissance et l'activité de Bifidobactéries au détriment de bactéries pathogènes et coliformes (Holt *et al.*, 2005 ; Holt *et al.*, 2008). Un brevet sur la synthèse d'alternanes de faibles masses molaires, obtenus à partir de l'alternane produit par fermentation couplée à *Ln. citreum* B-1355 et à diverses souches de *Penicillium* sp. met en évidence de potentielles applications comme agents texturants (Leathers *et al.*, 2002a ; Leathers *et al.*, 2002b ; Leathers *et al.*, 2003). L'alternane n'est, à ce jour, pas commercialisé. Cependant, du fait de leur faible viscosité et de leur grande solubilité dans l'eau, les alternanes pourraient être utilisés dans le domaine agroalimentaire comme agents de charge digestibles ou faiblement caloriques (Côté, 1992). Ces polysaccharides pourraient aussi être utilisés comme agents dilatateurs de vaisseaux sanguins, comme transporteurs de composés actifs ou bien comme additifs dans l'industrie du textile ou de la cosmétique (Leathers *et al.*, 1995 ; Leathers *et al.,* 1997; López-Munguía *et al.*, 1993). Ils auraient un fort potentiel à remplacer la gomme arabique dans des applications allant de l'alimentaire à la peinture en passant par le domaine pharmaceutique avec des enrobages pour la libération contrôlée (Côté, 2002 ; Leathers *et al*., 2002b ; Busetti & Crimella, 2001).

5. Les mutanes

5.1. Structure et obtention des mutanes

Les mutanes sont des polymères de glucose comprenant plus de 50% de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ dans la chaîne principale, et possèdant des ramifications en $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow4)$ et/ou $\alpha(1\rightarrow6)$. Il s'agit de polysaccharides insolubles dans l'eau du fait de leur forte teneur en liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$.

Les glucanes $\alpha(1\rightarrow3)$ se trouve principalement dans la paroi cellulaire de champignons non-pathogènes et pathogènes tels que *Penicillium* spp., *Eupenicillium* spp. ou *Aspergillus* spp. (Wang *et al*., 2007 ;

Choma *et al*., 2013). Ils sont aussi produits par *Streptococcus* spp. présent sur la plaque dentaire de la cavité buccale et contiennent différents taux de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$ (Tableau 11).

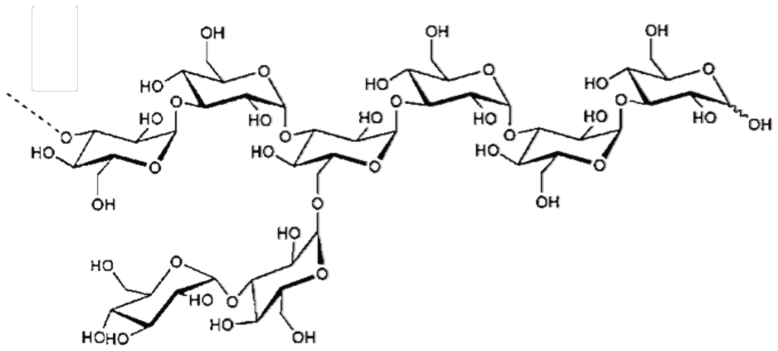


Figure 33 - Structure chimique des mutanes (chaîne principale constituée principalement de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ présentant des ramifications en $\alpha(1\rightarrow6)$).

Tableau 11 - Provenance des mutane-saccharases et pourcentage liaisons osidiques présentes dans les mutanes synthétisés.

Organisme	Enzyme	Liaisons osidiques		Références
		$\alpha(1\rightarrow6)$	$\alpha(1\rightarrow3)$	
***Lb. reuteri* ML1**	GTF-ML1	35	65	Kralj *et al.*, 2004
***S. downei* MFe 28**	GTF-I	12	88	Russell *et al.*, 1987
***S. mutans* GS 5**	GTF-B	12	88	Shiroza *et al.*, 1987
***S. mutans* GS5**	GTF-C	15	85	Ueda *et al.*, 1988
***S. salivarus* ATCC25975**	GTF-L	50	50	Simpson *et al.*, 1995
***S. salivarus* ATCC25975**	GTF-J	-	90	Simpson *et al.*, 1995
***S. sobrinus* 6714**	GTF-I	-	93	Fukui *et al.*, 1982
***S. sobrinus* 6715**	GTF-Ia	-	Maj.	Konishi *et al.*, 1999

Selon Simpson *et al.* (1995), la présence d'une petite quantité de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ dans le glucane produit par une glycosyltransférase, GTF-J, a lieu lorsque du dextrane est rajouté au milieu de synthèse. Quelques années plus tard, le mutane synthétisé *in vitro* par l'enzyme GTF-J (sans ajout de dextrane au milieu) a été étudié en détails et les auteurs ont montré qu'il avait une structure linéaire, composé uniquement de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ pour une masse molaire de 7.10^5 g.mol^{-1} (obtenue par SEC) (Puanglek *et al.*, 2016). Ce mutane était insoluble dans l'eau mais soluble dans le DMSO. Les déplacements chimiques obtenus par RMN ont pu être attribués dans le DMSO-d6 comme le montre le Tableau 12.

Tableau 12 - Déplacements chimiques δ (ppm) du mutane déterminés par RMN ^{1}H et RMN ^{13}C dans le DMSO-d6 (Puanglek *et al.*, 2016).

RMN ^{1}H	**H1**	**H2**	**H3**	**H4**	**H5**	**H6**

δ (ppm)	5.06	3.41	3.62	3.41	3.82	3.51/3.62
RMN ^{13}C	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**
δ (ppm)	99.9	70.9	82.9	69.5	72.0	60.2

5.2. Propriétés des mutanes

Les propriétés thermiques de ces polyssaccharides peuvent être considérablement améliorées lorsque l'on a à faire à des esters de mutanes. Ainsi, la température de dégradation des esters de mutane est d'environ 350 °C, soit 120 °C au-dessus du mutane correspondant, augmentant ainsi sa stabilité thermique (Puanglek *et al*., 2016). Leurs températures de fusion se situaient entre 299 et 339 °C, donc étaient supérieures aux températures de fusion de polymères semi-cristallins tels que le PET (245-265 °C) par exemple (Jamshidian *et al.*, 2010).

5.3. Applications des mutanes

Ces polysaccharides constituent une plaque dentaire qui adhère à l'émail des dents. Les mutanes et les enzymes responsables de leur synthèse ont surtout été étudiés pour des raisons sanitaires. En effet, ces derniers sont impliqués dans les phénomènes de cariogenèse. Ils contribuent ainsi à la formation de la plaque dentaire, formant un environnement adapté à la prolifération de bactéries cariogène sur la surface de la dent (Leach & Hayes, 1968 ; Koga *et al.*, 2002). Il pourrait aussi jouer un rôle protecteur contre la dessiccation ou l'attaque par d'autres organismes.

Plusieurs études appliquées ont révélé des propriétés fibrinolytiques, anti-inflammatoire et antimicrobiens d'un dérivé sulfaté de mutane ou encore une activité antitumorale avec un dérivé phosphaté de mutane.

6. Les reutéranes

6.1. Structure et obtention des reutéranes

La découverte des reutéranes est très récente (Kralj *et al.,* 2005 et 2006). Ils sont constitués d'unités glucosyles reliées entre elles par plus de 50% de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ dans la chaîne principale, les 50% restants étant représentés par des liaisons de type $\alpha(1\rightarrow6)$ situées à la fois sur la chaîne principale et au niveau de ramifications.

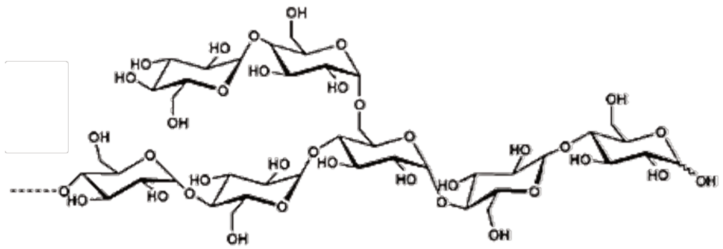


Figure 34 - Structure chimique des reutéranes (chaîne principale constituée de liaisons *α*(1→6) et *α*(1→4) présentant des ramifications en *α*(1→6)).

Leur masse molaire est de l'ordre de 10^6-10^7 g.mol^{-1} environ. La découverte de ces polymères est très récente, et seules deux souches productrices de *Lactobacillus reuteri* sont à ce jour recensées : *Lb. reuteri* 121 et *Lb. reuteri* « BioGaia » (Tableau 13).

Tableau 13 – Provenance des reuterane-saccharases et pourcentage liaisons osidiques présentes dans les reuteranes synthétisés.

Organisme	Enzyme	Solubilité dans l'eau	Liaisons osidiques		Masse molaire ($\times 10^7$ g.mol^{-1})	Références
			α(1→6)	*α*(1→4)		
***Lb. reuteri* 35-5**	GTF-A	+			-	van Leeuwen *et al*., 2008b
***Lb. reuteri* 121**	GTF-A	+	43	57	4,5	Kralj *et al.*, 2002
***Lb. reuteri* BioGaia**	GTF-O	+	22	78	4,2	Kralj *et al.*, 2005

Grâce à l'analyse struturale par RMN 1D et 2D ^{1}H et ^{13}C du reutérane produit par *Lb. reuteri* 35-5 ainsi qu'à la caractérisation d'oligosaccharides obtenus par hydrolyse par spectrométrie de masse et RMN, van Leeuwen *et al*. (2008b) ont proposé un structure pour le reutérane (Figure 35).

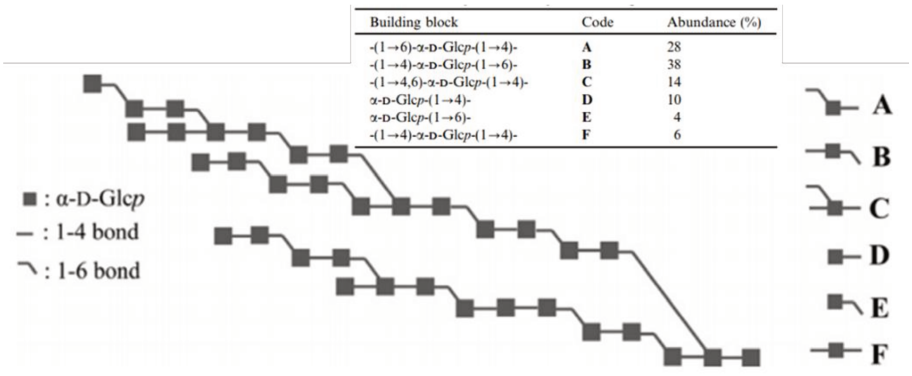


Figure 35 – Représentation de la structure du reutérane produit par *Lb. reuteri* 35-5 (van Leeuwen *et al.*, 2008b).

Il s'agit d'une structure hyperbranchée (14% de 1,4,6-Glc) et hétérogène puisqu'aucun segment se répéte.

6.2. Applications des reutéranes

Les *Lactobacillus reuteri* sont des microorganismes ayant des propriétés probiotiques[‡] reconnues (Valeur *et al.*, 2004 ; Badel *et al*., 2011)). Les reutéranes ou oligosaccharides produits par réaction d'accepteur pourraient aussi avoir des activités prébiotiques, ce qui stimule les recherches portant sur leur utilisation en tant qu'agents symbiotiques (agents possédant le double caractère, à la fois pré- et probiotiques).

[‡] Un probiotique est un microorganisme vivant considéré comme bénéfique à l'homme qui, grâce à leur résistance à la digestion (acidité, sels biliaires, etc.), atteignent différents sites intestinaux où ils peuvent être métaboliquement actifs, améliorant ainsi la santé de l'hôte.

Partie 3 : Les copolymères à blocs à base de polysaccharides

1. Généralités sur les copolymères à blocs

1.1. Définition

Un copolymère est issu de la copolymérisation de deux homopolymères constitués d'unités monomériques différentes. On peut appeler « biocopolymère » l'assemblage par liaison covalente de deux polymères d'origine biologique chimiquement différents. Il existe 3 structures de copolymères linéaires possibles : le copolymère alterné, le copolymère statistique et le copolymère à blocs (Figure 36a, b, c). Il existe une grande diversité architecturale de copolymères à blocs comme les copolymères linéaires, greffées ou étoilées (Figure 36d, e). Dans notre cas, nous nous intéresserons plus précisément aux copolymères à blocs.

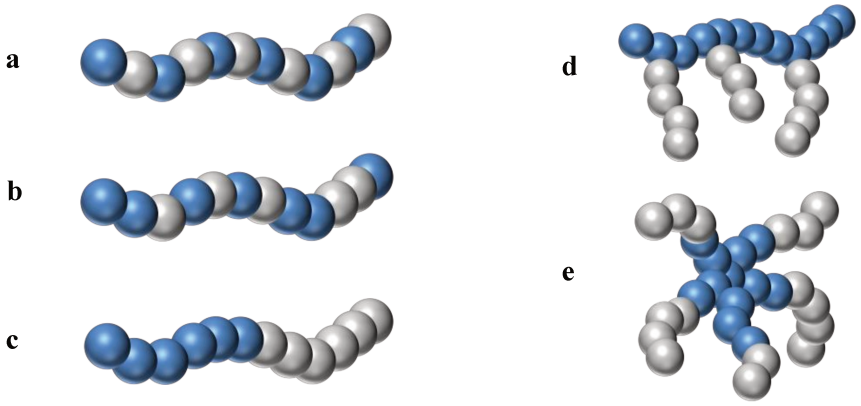


Figure 36 – Représentation des différentes architectures de copolymères linéaires et de copolymères non-linéaires a. Copolymère alterné. b. Copolymère statistique. c. Copolymère à blocs. d. Copolymère greffé. e. Copolymère en étoile.

Un copolymère à blocs avec deux blocs distincts A et B est conventionnellement noté A-*b*-B. Il est également possible d'obtenir des triblocs A-*b*-B-*b*-C.

Depuis quelques décennies, les copolymères à blocs suscitent un fort intérêt tant du côté des polymeristes que des physico-chimistes. L'intérêt de synthétiser des copolymères est d'obtenir de nouvelles propriétés physico-chimiques et mécaniques en combinant les propriétés intrinsèques des homopolymères respectifs. Le couplage de deux polymères a l'avantage de combiner des propriétés souvent opposées (des blocs hydrophiles et hydrophobes, des blocs ioniques et non ioniques, des blocs amorphes et cristallins, des blocs rigides et mous) dans une même structure. Les copolymères à blocs

amphiphiles formés d'un bloc hydrophile et d'un bloc hydrophobe sont particulièrement intéressants parce qu'ils ont la capacité de s'auto-assembler à l'état solide ou en présence de solvant sélectif.

Dans le cas des copolymères diblocs, nous pouvons noter deux classes de structures (Figure 37). Les copolymères diblocs pelote-pelote « coil-coil » sont composés de deux parties flexibles alors que les copolymères diblocs bâtonnet-pelote « rod-coil » sont composés d'une partie rigide et d'une partie flexible.

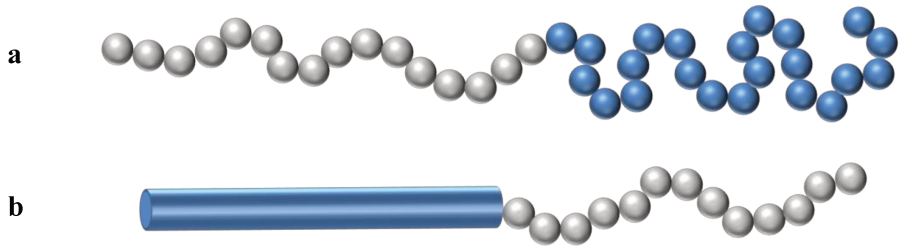


Figure 37 - Représentation schématique de différents copolymères diblocs. a. Copolymère diblocs bobine-bobine. b. Copolymère diblocs tige-bobine (Klok & Lecommandoux, 2001).

1.2. Principe d'auto-organisation des copolymères à blocs

Dans un premier temps, un résumé de la thermodynamique des solutions expliquant la notion de séparation de phase est présenté. La séparation microscopique sera qualifiée comme étant l'origine de l'organisation du copolymère dibloc. Puis, le diagramme de phase imposant les limites dimensionnelles et thermodynamiques d'un système de copolymère dibloc ainsi que l'auto-organisation en milieu aqueux de ces copolymères seront présentés.

1.2.1. Thermodynamique des copolymères à blocs

Au sein d'un système, la minimisation de l'enthalpie libre du copolymère dibloc A-*b*-B provoque une séparation des phases sous forme de nano-domaines entre les blocs du copolymère. La taille des nano-domaines est le résultat de la minimisation de l'énergie libre du système qui doit prendre en compte deux effets antagonistes (Tallegas, 2015) :

- La minimisation de l'enthalpie qui favorise des domaines dont la taille est la plus grande possible afin de réduire le contact entre les deux blocs A et B.
- La maximisation de l'entropie du système qui tend à augmenter le désordre du système en formant des domaines les plus petits possibles.

La stabilité thermodynamique de la solution formée par le copolymère dibloc A-*b*-B est déterminée par la variation de l'énergie libre de mélange ΔG_m dont le signe caractérisera le sens d'évolution privilégié de la réaction :

Démixtion ⟷ Mélange

ΔG_m représente la différence de stabilité entre le système homogène (le mélange) et le système hétérogène (la séparation des phases) dans les conditions données. L'étude thermodynamique de la stabilité du mélange de copolymères à bloc A-*b*-B nécessite l'analyse de la variation de l'énergie libre ΔG_m à l'aide de la relation suivante :

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\,\Delta S_m \qquad [39]$$

avec ΔH_m l'enthalpie de mélange, T la température et ΔS_m l'entropie de mélange d'indice m.

Les séparations de phases qu'elles soient micro ou macroscopiques, sont définies par la condition générale : $\Delta G_m > 0$.

Dans les copolymères à blocs, l'état de ségrégation provient de deux contributions : la contribution enthalpique qui se traduit par le paramètre d'interaction entre les deux motifs A et B (paramètre de Flory-Huggins, χ_{AB}) et la contribution entropique, inversement proportionnelle au nombre total de motifs de répétition N.

La variation de l'enthalpie libre ΔH_m, est proportionnelle au paramètre de Flory-Huggins χ_{AB}. Ce paramètre traduit la variation d'énergie du système causée par l'interaction dipolaire entre les deux blocs A et B de nature chimique différente. La relation est donnée par l'expression :

$$\chi_{AB} = \frac{1}{k_B T}\left[\varepsilon_{AB} - \frac{\varepsilon_{AA} + \varepsilon_{BB}}{2}\right] \qquad [40]$$

avec k_B la constante de Boltzman, ε_{AA} et ε_{BB} les énergies d'interactions dipolaires respectives des segments A et B entre eux et ε_{AB} l'énergie d'interaction dipolaire entre les segments A et B. Il s'agit d'interactions du type Van der Waals.

La répulsion de deux entités chimiquement différentes est décrite par la condition : $\Delta H_m > 0$.

En induisant la séparation des phases, l'enthalpie va entraîner la diminution forcée de l'entropie car le système va évoluer vers un état plus ordonné. Deux phénomènes sont à l'origine de cette augmentation de l'ordre :

- La création de phases distinctes, l'une composée des blocs A et l'autres des blocs B qui entraîne la diminution des contacts entre les blocs A et B et le regroupement des points de jonction entre les blocs A et B selon une zone interfaciale. Il s'agit de l'entropie d'interface, S_{int}.
- Le regroupement des chaînes à l'intérieur des phases qui entraîne une réorganisation de la configuration des chaînes de polymères pour satisfaire à la géométrie des domaines. Il s'agit de l'entropie de configuration ou de confinement, S_c.

Le système va alors évoluer de manière à atteindre un état d'équilibre où $\Delta G_m = 0$. Pour $\Delta G_m > 0$, le système va évoluer jusqu'à ce que la perte d'entropie compense énergétiquement le gain d'enthalpie. Le système atteint l'équilibre lorsque :

$$\Delta H_m = T(\Delta S_c + \Delta S_{int}) \quad [41]$$

Si les blocs A et B n'étaient pas reliés, les dimensions caractéristiques des phases seraient fixées uniquement par la valeur de ΔH_m. Plus ΔH_m sera grand, plus l'entropie diminuera et plus le système tendra vers une séparation de phases de plus en plus macroscopique.

1.2.2. Diagramme de phase ordre-désordre

Dans le cas des copolymères à blocs, l'existence d'une liaison covalente entre les blocs A et B limite la séparation de phase du système à une échelle nanoscopique même dans les conditions maximales d'incompatibilité des blocs.

L'affinité des blocs est décrite par le produit $\chi_{AB}N$ (où N représente le degré de polymérisation du copolymère), appelé paramètre d'incompatibilité entre les deux blocs, qui détermine le seuil de séparation des deux blocs des copolymères et la morphologie des phases. Le paramètre f, représentant la proportion d'un bloc par rapport à l'autre décrit la composition du système et s'écrit selon l'équation suivante :

$$f = \frac{N_A v_A}{N_A v_A + N_B v_B} \quad [42]$$

où N_i est le degré de polymérisation de la chaîne i (i = A ou B) et v_i le volume du monomère i (i = A ou B) défini par :

$$v_i = \frac{M_i}{dN_i} \quad [43]$$

où $M_i$est le poids moléculaire d'une chaîne composée de monomère i et d représente la densité du monomère i.

La morphologie des phases organisées est une conséquence du principe de minimisation de l'énergie du système. Lorsque $\chi_{AB}N$ est inférieur à 10,5, aucune phase ordonnée ne peut s'établir.

Plus la fraction volumique f est différente de 0,5 (valeur d'équilibre en volume entre les deux polymères), plus l'interface entre les deux phases doit se courber pour minimiser l'énergie de tension superficielle entre les blocs A et B. Ces considérations énergétiques expliquent le passage successif entre les phases sphériques (S) organisées suivant un réseau cubique centré, les phases cylindriques (C) organisées suivant un réseau hexagonal, gyroïdes (G) et lamellaires (L) lorsque f tend vers 0.5. La Figure 38 représente schématiquement ces différentes morphologies en fonction du paramètre f. A partir de f = 0.5 on obtient des morphologies avec « inversion » des deux phases. La géométrie de chaque configuration est illustrée sur la Figure 38a ainsi que les diagrammes de phases théorique et expérimental d'un copolymère PS-*b*-PI (Figure 38b et c).

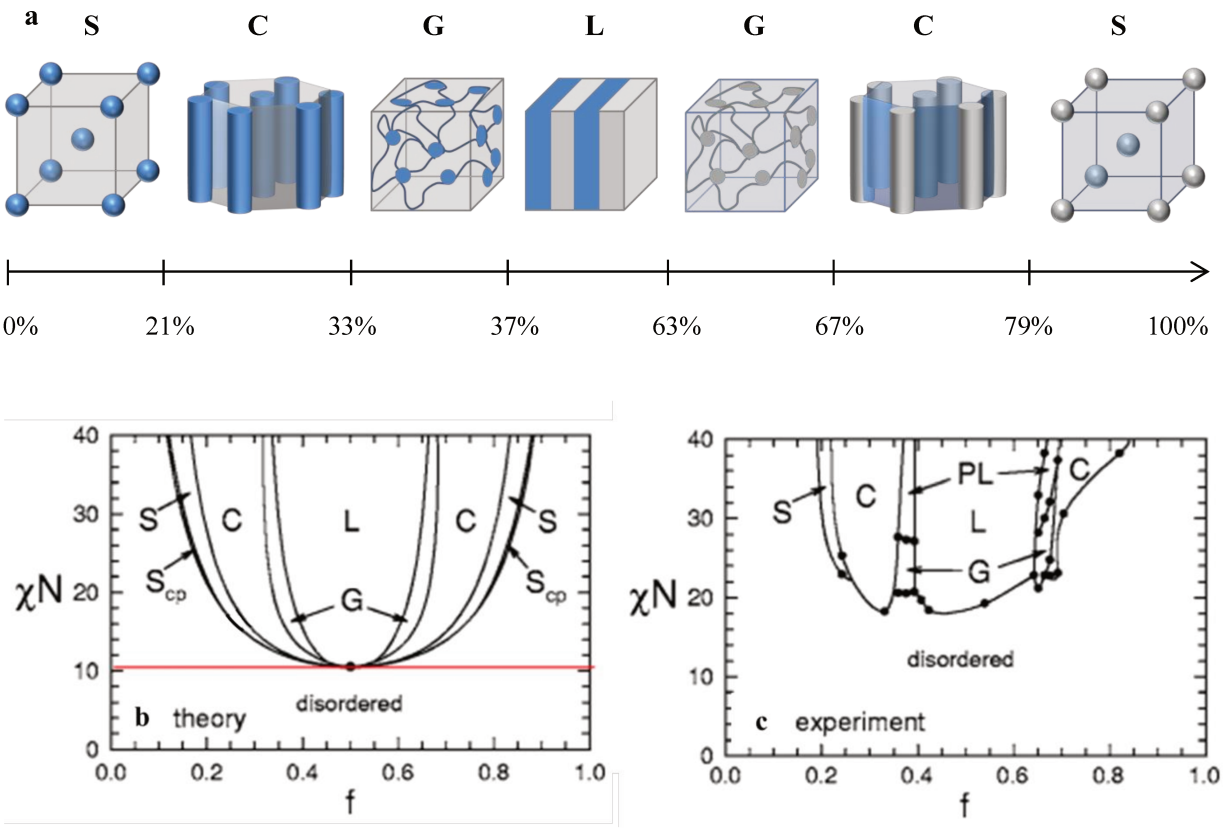


Figure 38 - Représentation schématique et diagrammes de phases d'un copolymère de type A-*b*-B. a. Différentes géométries en fonction de la fraction volumique f du bloc A (bleu). b. Diagramme de phase théorique- et c. Diagramme de phase expérimental d'un système copolymère dibloc PS-*b*-PI (Khandpur *et al.*, 1995).

La température joue un rôle important et est responsable des limites thermodynamiques. De plus, la température de transition vitreuse T_g qui définit la transition entre l'état vitreux et l'état caoutchoutique va impacter la formation des domaines. Au-dessus de T_g, les chaînes de polymères vont être mobiles ce qui caractérise l'état fondu. Le copolymère à blocs aura besoin d'une mobilité accrue des chaînes générée par $T>T_g$ pour permettre l'organisation et réaliser la micro-séparation de phase. La formation des nano-domaines nécessite la double condition suivante :

$$T_g < T < T_{ODT}$$

avec T_{ODT} la température « Order-Disorder Transition », température critique décrivant la limite inférieure du diagramme de phase.

1.2.3. Formation des domaines

Si les masses molaires des blocs A et B sont identiques alors le copolymère est symétrique, la répulsion entre A et B contraint les chaînes à s'organiser pour minimiser ces contacts. Les blocs A et B vont se déployer perpendiculairement à l'interface afin qu'elle soit la plus réduite possible. Cette organisation permet une surface minimale et l'équilibre entre répulsion et étirement conduit à une structure lamellaire. Lorsque le copolymère à blocs est dissymétrique (avec A plus long que B par ex.) (Figure 39), les blocs vont être étirés de façon égale afin de conserver une interface plane. Les contraintes entropiques pour l'étirer seront d'autant plus grandes que le bloc A sera long. Ces étirements de chaînes provoquent l'augmentation de la surface de contact entre les deux blocs et entraînent la modification de la géométrie des domaines en une géométrie sphérique ou cylindrique. Les multiples morphologies obtenues proviennent de ce phénomène.

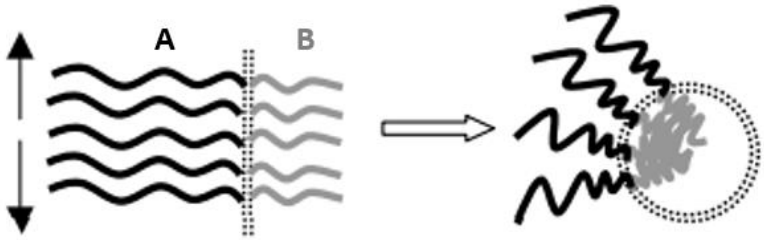


Figure 39 - Représentation schématique de la formation des domaines dans une configuration asymétrique (Fleury, 2001).

1.3. Auto-assemblage en milieu aqueux

L'auto-assemblage des copolymères à blocs en solution peut conduire à la formation d'agrégats micellaires de différentes tailles et morphologies. Leurs tailles peuvent varier de quelques nanomètres à plusieurs microns. L'auto-organisation est dirigée par des forces motrices telles que les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène, l'effet hydrophobe. Nous nous intéresserons ici à l'influence du solvant sur la formation de micelle.

1.3.1. Influence du solvant dans un mélange de copolymères à blocs

Lorsque le solvant est neutre, c'est-à-dire qu'il a la même affinité pour chacun des blocs, celui-ci est réparti de façon homogène le long des blocs et n'induit pas de modification de courbure de l'interface favorisant ainsi l'état désordonné.

Le solvant est légèrement sélectif lorsqu'il agit comme bon solvant pour un bloc et proche du solvant θ pour l'autre bloc. Des variations de température induisent alors des modifications dans les interactions blocs/solvant et le solvant n'est plus sélectif lorsque la température augmente.

Un solvant est dit fortement sélectif lorsqu'il est bon solvant pour un bloc et mauvais solvant pour l'autre bloc. Ceci va permettre la ségrégation des blocs et augmenter la stabilité de l'état ordonné (Hankley & Lodge, 2000).

Les différents diagrammes de phase obtenus avec le copolymère PS-*b*-PI dans ces trois types de solvants sont représentés sur la Figure 40.

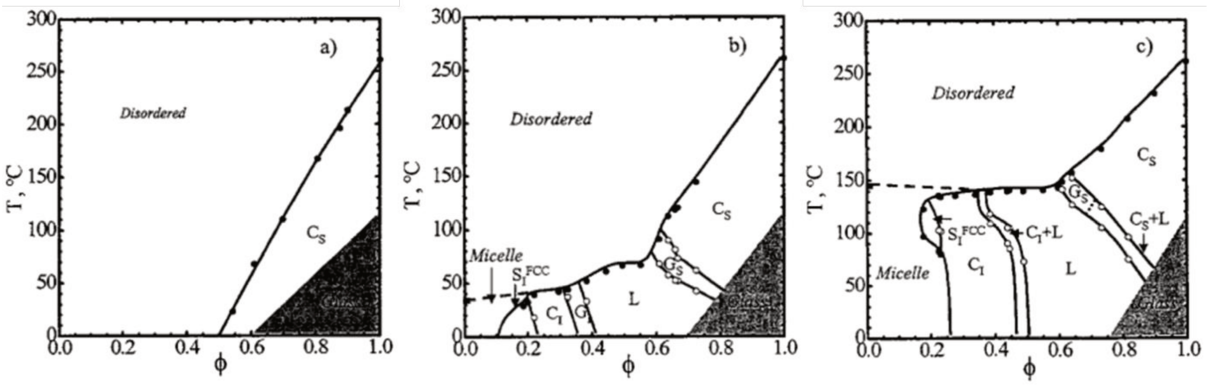


Figure 40 – Diagrammes de phase d'un copolymère dibloc PS(23%)-*b*-PI(77%) dissymétrique. a. Solvant neutre. b. Solvant légèrement sélectif du bloc PS. c. solvant sélectif du bloc PS (Lodge *et al.*, 2002).

Pour les solutions de copolymères à blocs dans un solvant sélectif d'un des blocs, différents régimes sont définis selon la concentration en copolymère : dilué, semi-dilué et concentré (Figure 41).

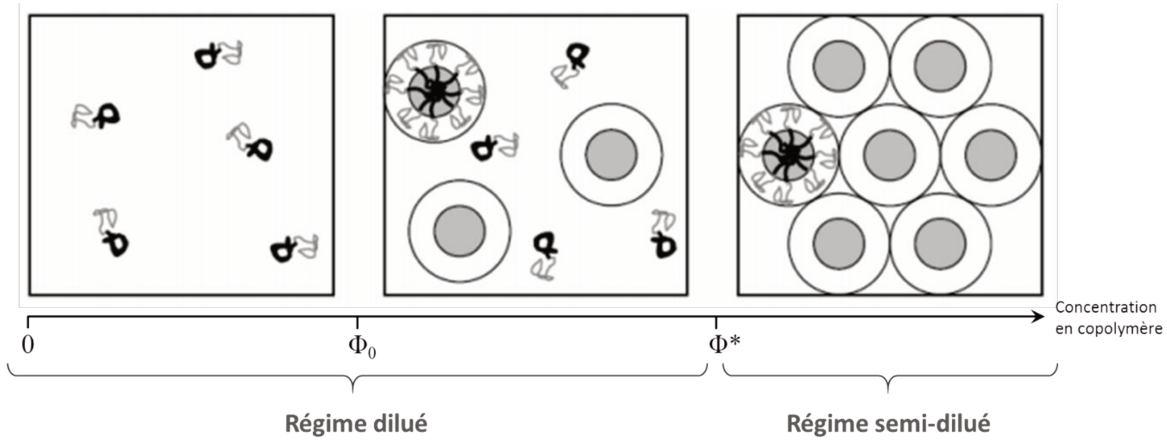


Figure 41 - Conformation des molécules de copolymère dibloc A-*b*-B dans un solvant sélectif en fonction de la concentration en copolymère (Hamley, 1998).

Dans un régime dilué, si la concentration en copolymère A-*b*-B Φ est inférieure à la concentration micellaire critique (cmc) Φ_0 alors les chaînes sont dispersées de manière homogène. Le bloc A, miscible, est alors gonflé par le solvant alors que le bloc B, non-miscible, va s'agréger sur lui-même. Lorsque la concentration en copolymère augmente ($\Phi>\Phi_0$), les blocs B vont s'agréger pour former des micelles monodisperses composés d'un cœur hydrophobe composé du bloc B (si le solvant sélectif est l'eau) et d'une couronne hydrophile composée du bloc A gonflée par le solvant (Chu, 1995). Le processus de micellisation dépend de deux paramètres majeurs : la cmc et la température micellaire critique (cmt). Si la concentration Φ est supérieure à la concentration de recouvrement Φ^* alors le régime sera semi-dilué. Les micelles vont alors s'organiser en structures fortement ordonnées conférant à la solution un comportement élastique (avec formation d'un gel physique).

La formation des micelles est due à deux forces opposées : la force d'attraction et la force de répulsion. La première entraîne l'agrégation des blocs insolubles, alors que la deuxième, repoussant les blocs solubles, conduit à une limitation des tailles des objets formés. Ainsi, en fonction de l'équilibre des différentes forces, des micelles de tailles et morphologies différentes (vésicules, micelles sphériques, cylindriques…) peuvent être obtenues et sont représentées sur la Figure 42.

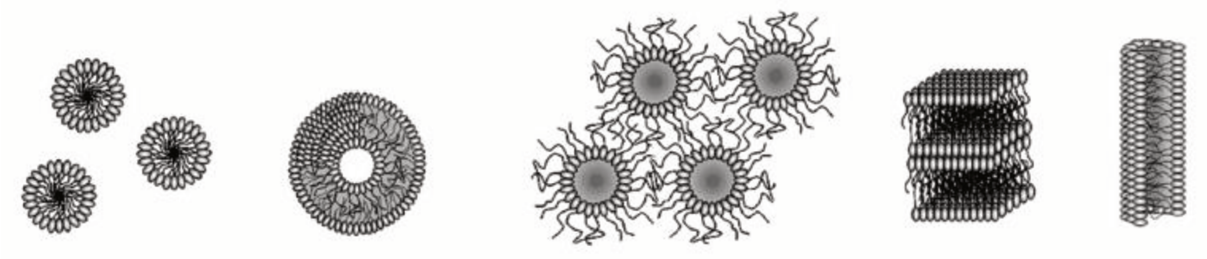


Figure 42 - Morphologies de copolymères à blocs obtenus en solution en solvant sélectif. a. Micelles sphériques. b. Vésicule. c. Agrégats de micelles. d. Structures lamellaires. e. Micelles tubulaires ou cylindriques. (Agut, 2008).

1.3.2. Détermination des paramètres structuraux des systèmes micellaires et techniques de caractérisation

Les paramètres structuraux des systèmes micellaires appelés « paramètres micellaires » sont brièvement cités ci-dessous et représentés sur la Figure 43 et dans le Tableau 14 :

- La *concentration (cmc) et la température (cmt) micellaire critique*, correspondant à la concentration ou à la température à laquelle se forment les micelles ;
- La *morphologie*, qui dans les cas les plus simples, peut être considérée comme sphérique ;
- La *masse molaire moyenne en poids* de la micelle (M_w) ;
- Le *nombre d'agrégation* (N_{ag}) correspondant au nombre de copolymères diblocs par micelle (soit au nombre de chaînes hydrophobes dans le cœur micellaire) ;
- Le *rayon de giration* de la micelle (R_G) correspondant à la moyenne quadratique des distances des unimères au centre de gravité de chaque micelle ;

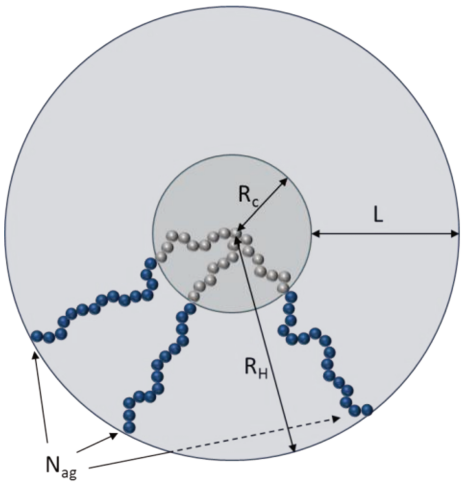


Figure 43 – Différents paramètres d'une micelle en solution.

- Le *rayon hydrodynamique* de la micelle (R_H) correspondant à la taille effective de la micelle détectée à partir de son mouvement brownien ;
- Le *rayon du cœur* du système micellaire (R_c) constitué par les chaînes hydrophobes et éventuellement des molécules de solvant ;
- L'*épaisseur de la couronne* (L) constituée majoritairement de solvant et de chaînes hydrophiles ;
- La somme R_c et L correspondant au *rayon de la micelle* (R_m) ;
- Le *second coefficient du viriel* (A_2) traduisant les interactions macromolécules-solvant.

Le Tableau 14 regroupe les techniques expérimentales permettant d'accéder aux grandeurs précédemment définies de systèmes micellaires.

Tableau 14 - Paramètres structuraux et techniques de caractérisation d'agrégats micellaires (Riess, 2003).

Techniques de caractérisation	Paramètres micellaires
Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	R_H, dynamique des systèmes
Diffusion dynamique de la lumière (QELS)	
Diffusion statique de la lumière (SLS)	R_G, A_2, M_w, cmc, N_{ag}, R_H
Diffusion des neutrons aux petits angles (SANS)	R_G, R_c, L, M_w, N_{ag}, dynamique des systèmes
Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)	
Microscopie électronique à transmission (MET)	Morphologie, taille, polydispersité en taille
Tensiométrie	cmc, cmt
Spectroscopie de fluorescence	cmc, cmt, dynamique des systèmes
Spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire (RMN)	
Techniques de viscométrie	Viscosité intrinsèque, R_H, R_v
Ultracentrifugation	Densité des micelles

Dans les parties suivantes, nous nous intéresserons, dans un premier temps, aux propriétés des copolymères ayant au moins une partie généralement hydrophile constituée de polysaccharides puis, dans un second temps, aux propriétés des copolymères constitués uniquement de polysaccharides (ces derniers sont très peu décrits dans la littérature).

2. Obtention et propriétés de copolymères à blocs synthétiques/polysaccharidiques

Dans la littérature, diverses combinaisons entre un oligo- ou polysaccharide et un bloc synthétique ont été réalisées par voie chimique. Très peu ont été obtenues par voie enzymatique. La nécessité de modifier spécifiquement l'unité terminale de l'oligo- ou du polysaccharide rend dans ces deux cas la stratégie complexe. Une grande partie de ces assemblages est listé dans le Tableau 15.

Tableau 15 - Copolymères comportant un bloc oligo- ou polysaccharidique et un bloc synthétique et leurs voies de synthèse reportées dans la littérature (adapté de Schatz & Lecommandoux, 2010).

Bloc polysaccharidique	Bloc synthétique	Voie de synthèse
Amylose	Oligo-methylene	Enzymatique
	Oligo-ethylene oxide	Enzymatique
	Polyethylene oxide (PEO)	Enzymatique
	Polystyrene (PS)	Enzymatique
	Poly(n-butyl methacrylate)	Click chemistry
Cellulose	Poly(γ-benzyl L-glutamate) (PBLG)	NCA
	Poly(L-glutamic acid)	NCA
	PS	ATRP
Chitosane	Polyethylene glycol (PEG)	Couplage
Dextrane	PS	ATRP et couplage
	Poly(isobutylcyanoacrylate)	RREP
	Polyamide	ROP
	Polyvinyl acetate	RAFT
	PEG	Couplage
	Poly(ε-caprolactone) (PCL)	Couplage
	PBLG	Couplage
Hyaluronane	Poly(2-ethyl-2-oxazoline)	Couplage
	PBLG	Couplage
Maltoheptaose	PCL	ROP
	Poly(methyl methacrylate) derivatives	ATRP
	PS	Couplage
	Poly(N-isopropylacrylamide)	Couplage
Maltodextrine	PS	Couplage
Xyloglucane	Polyacrylamide	MADIX
	Polyorganosiloxane	Couplage

Les acronymes NCA (*N*-carboxyanhydride), ATRP (atom transfer radical polymerization), RREP (redox radical emulsion polymerization), ROP (ring-opening polymerization), RAFT (reversible addition-fragmentation chain transfer) et MADIX (macromolecular design by interchange of xanthates) et la réaction de couplage correspondent à des mécanismes réactionnels de polymérisation et ne seront pas détaillés.

Nous pouvons regarder plus particulièrement les travaux de Loos *et al.* (Loos & Stadler, 1997 ; Loos & Muller, 2002 : Loos *et al.*, 2005) qui sont les premiers à avoir synthétisé par voie enzymatique des copolymères à base de polysaccharides. On particulièrement remarque le travail qui a été réalisé sur la synthèse d'un copolymère dibloc constitué d'un biopolymère, l'amylose, et d'un bloc synthétique, le polystyrène (Figure 44).

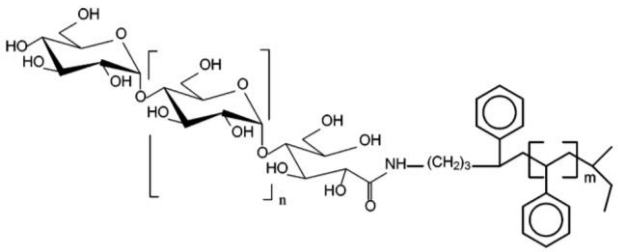


Figure 44 - Structure du copolymère dibloc amylose-*block*-polystyrène (Loos *et al.* 2005).

Ce copolymère forme des agrégats de différentes tailles dans le THF et des micelles de taille uniforme dans l'eau. L'impact du DP (7 ou 18) de la partie amylose sur les phénomènes d'auto-organisation a été étudié plus en détails (Aissou *et al.,* 2011). Les résultats montrent qu'à température ambiante le système s'auto-assemble en nanophases dépendant de la fraction volumique de l'amylose et que l'ajout de bipyridine au milieu entraîne une formation de phase différente que lorsque le copolymère est seul passant d'une phase lamellaire à une phase cylindrique respectivement. Ceci s'explique par l'augmentation de liaisons hydrogène dans le milieu causé par la présence de bipyridine.

3. Structure et propriétés de copolymères à blocs « tout » polysaccharides

À ce jour, aucun article présentant la synthèse de copolymères diblocs composés uniquement de polysaccharides n'est référencée dans la littérature. Seulement, deux publications sur la structure et les propriétés de copolymères chitosane-dextrane obtenus par voie chimique existent (Janciauskaite *et al*., 2008 ; Petrova *et al*., 2014). Les auteurs ont démontré que les modules élastiques, les contraintes et les allongements à la rupture de films de copolymère chitosane-dextrane (E ~ 6,3 GPa ; σ ~ 135 MPa ; ε ~ 4,5 %) dépendent du degré de substitution en chitosane dans le copolymère et sont supérieurs à ceux de films de mélange chitosane/dextrane 1 : 1 (E ~ 5,1 GPa ; σ ~ 111 MPa ; ε ~ 3,1 %). Ils ont par ailleurs observé que les modules élastiques, les contraintes et les allongements à la rupture d'un film constitué uniquement de chitosane (E ~ 6,9 GPa ; σ ~ 147 MPa ; ε ~ 15 %) sont supérieures à celles des films de copolymère. Ces valeurs sont relativement élevées pour des polysaccharides notamment si on les compare à celles obtenues pour l'amidon et les dextranes (Mali *et al*., 2005). Ces copolymères permettent de conserver les modules et contraintes du chitosane seul tout en diminuant l'allongement à la rupture. Les hydrogels de chitosane et de dextrane ont montré leur importance dans le domaine du transport de principes actifs (aussi appelé « drug delivery ») pour l'encapsulation de bactéries probiotiques et leur distribution sur le tractus gastro-intestinal (Falco *et al*., 2017). Rolland Sabaté *et al*. (2004) ont greffé des chaînes linéaires d'amylose, grâce à l'amylosaccharase produite par *Neisseria polysaccharea*, de façon aléatoire sur les extrémités non-réductrice de l'amylopectine et du glycogène.

L'élongation des chaînes ne se produisait que sur des polysaccharides possédant des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ ou $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$. Cette élongation conduisait à la formation de gel.

Nous avons également répertorié un autre document (non référencé dans la littérature) intitulé « *Enzymatic formation of copolymers and block-copolymers based on derivatized polysaccharides* » écrit par A. M. Moscovici et E. Shimoni (Israel). D'après cette étude, Moscovici *et al.* montrent que la structure de l'amylopectine (d'un amidon de maïs waxy) peut être modifiée en utilisant une dextrane-saccharase et du saccharose. Dans certaines conditions, lorsque l'amidon de maïs waxy est ajouté au milieu réactionnel, celui-ci va jouer le rôle d'accepteur et la réaction permettra l'élongation des chaînes d'amylopectine plutôt que la synthèse du dextrane. Des analyses par cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-MET) ainsi que par chromatographie échangeuse d'anions couplée à un détecteur par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) ont pu le confirmer.

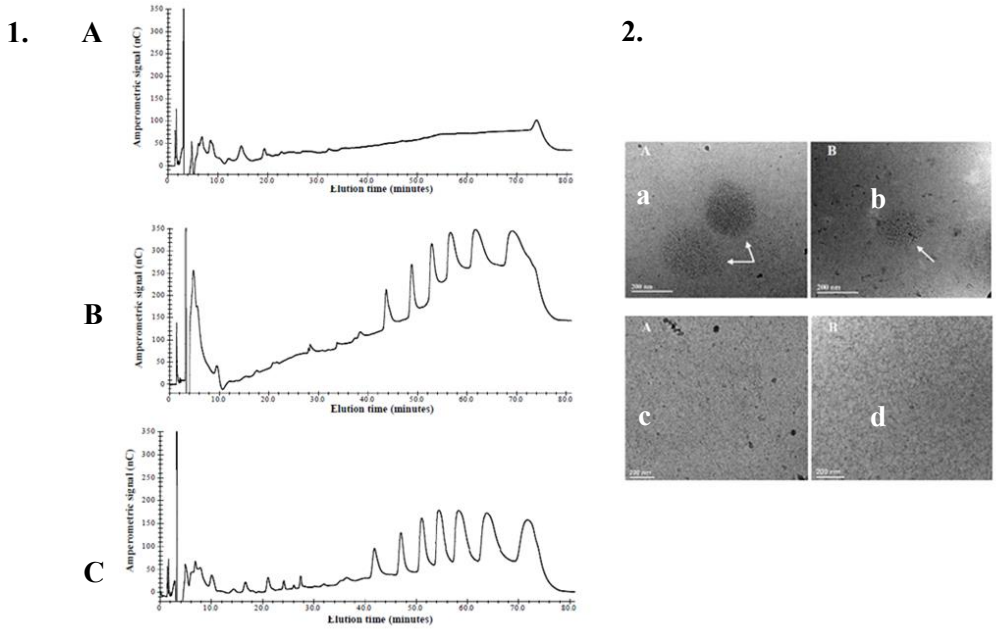


Figure 45 - 1. Profils HPAEC-PAD après action de l'isoamylase sur a. le milieu réactionnel contenant 15 g.L^{-1} de saccharose en présence de dextrane-saccharase pendant 6 h b. le milieu réactionnel contenant 15 g.L^{-1} de saccharose et 30 g.L^{-1} de waxy (sans dextrane-saccharase) c. le milieu réactionnel contenant 15 g.L^{-1} de saccharose et 30 g.L^{-1} de waxy en présence de dextrane-saccharase pendant 6h. **2. Cryo-MET sur les produits de réaction de la dextrane-saccharase obtenus avec** a. 15 g.L^{-1} de saccharose pendant 6 h b. 15 g.L^{-1} de saccharose pendant 24 h c. 15 g.L^{-1} de saccharose et 30 g.L^{-1} de waxy pendant 6 h d. 15 g.L^{-1} de saccharose et 30 g.L^{-1} de waxy pendant 24 h (dilution par 10).

L'isoamylase hydrolyse sélectivement les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et est utilisée pour réaliser les débranchements. Sur la Figure 45, les analyses par HPAEC-PAD montrent un décalage des pics d'élution d'environ 2 minutes vers les plus grands temps de rétention lorsque le milieu réactionnel contient à la fois de l'amylopectine et l'enzyme ce qui indique une élongation des chaînes de

l'amylopectine. En présence de saccharose et de dextrane-saccharase, le dextrane formé principalement de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ est produit puis hydrolysé par l'isoamylase. Les pics, au temps de rétention faibles, représentent donc les petits oligosaccharides issus de l'hydrolyse (Figure 45 1. A)

La réaction enzymatique de la dextrane-saccharase en présence de saccharose a été observée par cryo-MET. Des particules de dextranes d'environ 200 nm sont observées. Lorsque l'amidon de maïs waxy est ajouté au milieu réactionnel, ces particules de dextrane ne sont plus observées même après 24h de réaction montrant que tout le dextrane a été modifié.

Leemhuis *et al.* ont aussi modifié la structure de l'amylopectine à l'aide d'une glycosyltransférase, provenant de la bactérie *Lactobacillus reuteri* 121 GTF-B, qui va cliver la partie non réductrice du glucose lié en $\alpha(1\rightarrow4)$ pour rattacher cette partie en $\alpha(1\rightarrow6)$ à l'extrémité non réductrice d'un autre unité glucose liée en $\alpha(1\rightarrow4)$ sans former de branchements (Leemhuis *et al.*, 2014). La répétition de ce cycle catalytique permet d'allonger les bouts de chaînes en formant des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ (Figure 46).

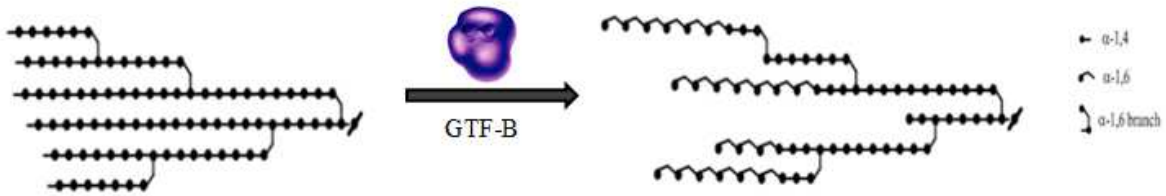


Figure 46 - Conversion enzymatique de l'amylopectine à l'aide de l'enzyme GTF-B.

Il pourrait s'agir d'un nouveau type de fibres alimentaires utilisées comme source de carbone par le microbiote du gros intestin ce qui pourrait en faire un prébiotique.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1. Production enzymatique des polysaccharides et leurs caractéristiques réalisées au LISBP

Les polysaccharides étudiés ont été obtenus par synthèse enzymatique au LISBP de Toulouse. Les conditions de synthèse sont décrites ci-après.

1.1. Dextranes produits à partir de l'enzyme DSR-OK

Dans le *Chapitre 3* ont été étudiés un dextrane produit par l'enzyme DSR-OK (D1-3B2) puis branché à l'aide de deux enzymes de branchement BRS-A et BRS-BΔ1. Un total de 5 échantillons a été obtenu et caractérisé. La synthèse de ceux-ci est présentée en détail dans le *Chapitre 3*, cependant, un tableau récapitulatif des conditions de synthèse est présenté ci-dessous.

Tableau 16 – Conditions de synthèse des dextranes étudiés dans le *Chapitre 3.*

Echantillons	D1-3B2	D1-3B5	D1-3B37	D1-2B10	D1-2B28
Saccharose ($g.L^{-1}$)		25	150	5	170
D1-3B2 ($g.L^{-1}$)		50	50	50	30
Enzyme de branchement		BRS-A	BRS-A	BRS-BΔ1	BRS-BΔ1
Quantité d'enzyme ($U.mL^{-1}$)		0,5	0,5	0,5	0,5
Température (°C)		20	20	20	20

Les réactions sont réalisées dans un tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5,75 pendant 24 h. Une fois la réaction terminée, deux précipitations successives sont réalisées à l'aide d'un mélange isopropanol/eau 50/50 (v/v). Les solutions sont ensuite lyophilisées. Au total, 100 g de chaque échantillon ont été produits.

1.2. Dextranes branchés à partir du dextrane commercial D500

De la même façon qu'avec les dextranes produits à partir de l'enzyme DSR-OK, le dextrane commercial produit par *Leuconostoc* spp. ($450\,000 < M < 650\,000\ g.mol^{-1}$, Sigma réf : 31392) a été branché à l'aide des enzymes de branchements BRS-A et BRS-BΔ1. Un total de 6 échantillons a été caractérisé, les conditions de synthèse sont présentées dans le Tableau 17. Les réactions sont réalisées dans un tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5,75 pendant 24 h. Une fois la réaction terminée, deux précipitations successives sont réalisées à l'aide d'un mélange isopropanol/eau 50/50 (v/v) et sont ensuite lyophilisés.

Ces synthèses ont permis de produire entre 50 et 60 g de chaque dextrane. Leurs caractérisations font l'objet du *Chapitre 4*.

Tableau 17 - Conditions de synthèse des dextranes étudiés dans le *Chapitre 4*.

Echantillons	D500	D500-3B8	D500-3B21	D500-2B8	D500-2B19	D500-2B32
Saccharose ($g.L^{-1}$)	Commercial	6	30	10,8	25	84
D500 ($g.L^{-1}$)		60	60	60	60	60
Enzyme de branchement		BRS-A	BRS-A	BRS-BΔ1	BRS-BΔ1	BRS-BΔ1
Quantité d'enzyme ($U.mL^{-1}$)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Température (°C)		20	20	20	20	20

1.3. Dextranes produits à partir de l'enzyme DSR-M

La dextrane-saccharase DSR-M provenant de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 a été exprimée sous la forme d'une protéine de fusion $(His)_6$-DSR-MΔ1, par la souche recombinante *E. coli* BL21 portant le plasmide pET-53-DEST-*dsrMΔ1*.

Un dextrane (M-100) a été produit en utilisant 1 $U.mL^{-1}$ d'enzyme DSR-M et 100 $g.L^{-1}$ de saccharose dans un tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5,75 à 20 °C. Après 24 h de réaction, le dextrane a été purifié à l'aide de deux précipitations successives avec un mélange isopropanol/eau 50/50 (v/v) puis lyophilisé. Les réactions de branchements avec les enzymes BRS-A et BRS-BΔ1 sont réalisées directement sur le milieu en fin de synthèse de M-100 qui a auparavant été chauffé à 95 °C pendant 5 min afin d'inactiver l'enzyme DSR-M. Les conditions de synthèse sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18 - Conditions de synthèse des dextranes étudiés dans le *Chapitre 5*.

Echantillons	M-100	M-3B19	M-3B29	M-3B47	M-2B34
Saccharose ($g.L^{-1}$)		15	30	170	120
M-100 ($g.L^{-1}$)		30	30	30	30
Enzyme de branchement		BRS-A	BRS-A	BRS-BΔ1	BRS-BΔ1
Quantité d'enzyme ($U.mL^{-1}$)		0,5	0,5	0,5	0,5
Température (°C)		20	20	20	20

Après 24 h de réaction, les dextranes branchés ont été purifiés à l'aide de deux précipitations successives avec un mélange isopropanol/eau 50/50 (v/v) puis lyophilisés. Entre 60 et 100 g de chaque échantillon ont été produits et caractérisés dans le *Chapitre 5*.

Une fraction des milieux de synthèse M-100, M-3B29, et M-2B34 a été recueillie puis caractérisée par la suite.

1.4. Alternane produit à partir de l'enzyme ASR

L'alternane-saccharase ASR provenant de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 a été exprimée sous la forme d'une protéine de fusion $(His)_6$-ASR, par la souche recombinante *E. coli* BL21 portant le plasmide pBad *asr C-APY-del Δthio*.

L'alternane a été produit à partir d'1 $U.mL^{-1}$ de l'enzyme ASR et 100 $g.L^{-1}$ de saccharose dans un tampon acétate 50 mM à pH 5,2 et à 30 °C. Après 24 h de réaction, l'alternane a été obtenu après deux précipitations successives avec un mélange isopropanol/eau 50/50 (v/v) puis lyophilisé. 100 g d'alternane ont été produits et caractérisés dans le *Chapitre 5*.

1.5. Polysaccharides produits à partir de GS-X

L'enzyme GS-X produit un α-glucane mixte comportant différentes liaisons osidiques et sa structure est en cours de caractérisation.

Le polysaccharide A/GS-X a été produit à partir d'1 $U.mL^{-1}$ de l'enzyme GS-X purifié et 50 $g.L^{-1}$ de saccharose dans un tampon acétate 50 mM à pH 5,75 et à 20 °C. Le polysaccharide B/GS-X a été produit à partir d'1 $U.mL^{-1}$ de l'enzyme GS-X non purifié (extrait brut) et 50 $g.L^{-1}$ de saccharose dans un tampon acétate 50 mM à pH 5,75 et à 20 °C. Après 24 h de réaction, les polysaccharides sont purifiés à l'aide d'un mélange isopropanol/eau 50/50 (v/v) puis lyophilisés. 50 g de chaque polysaccharide ont été produits et leurs caractérisations sont présentées dans le *Chapitre 4*.

1.6. Mutanes produits par les enzymes GTF-J et GTF-Si

Les mutanes A et B ont été produits à partir d' 1 $U.mL^{-1}$ d'enzymes GTF-J et GTF Si, respectivement, et 100 $g.L^{-1}$ de saccharose dans un tampon phosphate à pH 6,5 à 37 °C. Après 24 h de réaction, les mutanes sont purifiés à l'aide d'un mélange isopropanol/eau 50/50 (v/v) puis lyophilisés. 36 g et 61 g sont obtenus respectivement pour les mutanes A et B et leurs caractérisations sont présentées dans le *Chapitre 5*.

1.7. Synthèse d'oligosaccharides et de copolymères dibloc et tribloc

Dans un premier temps, deux copolymères, le copolymère alternane-*b*-dextrane et le copolymère amylose-*b*-alternane ainsi qu'un tribloc amylose-*b*-alternane-*b*-dextrane, ont été synthétisés en petites quantités (Tableau 19) et composent le lot 1. Leurs synthèses sont décrites dans la publication faisant l'objet du *Chapitre 6*. Par la suite, une production plus importante de ces copolymères a permis de les caractériser en détails. Ils font l'objet du lot 2 (Tableau 19). Les étapes de précipitation des échantillons du lot 2 sont réalisées à l'aide d'une mélange isopropanol/eau 50/50 ou 75/25 (v/v) afin d'éliminer le fructose et/ou les polymères de très faibles ou très hautes masses molaires. Le copolymère alternane-*b*-dextrane a été purifié sur une colonne Sephacryl S200 avec un débit en eau de 8 $mL.min^{-1}$ et le copolymère amylose-*b*-alternane a été purifié sur une colonne P6DG à 10 $mL.min^{-1}$ à 60 °C. La pureté des échantillons du lot 2 a été déterminée par HPAEC-PAD et est > 95 % sachant qu'ils ne contiennent plus de fructose ni de glucose.

Les résultats obtenus avec ces α-glucanes sont présentés dans le *Chapitre 6*.

Tableau 19 - Quantités disponibles en oligosaccharides et copolymères résultants des deux lots étudiés dans le *Chapitre 6*.

	Lot 1 (mg)	**Lot 2** (g)
Oligoalternane	43	4,2
Copolymère alternane-*b*-dextrane	40	8,6
Oligoamylose	42	5
Copolymère amylose-*b*-alternane	36	10
Tribloc amylose-*b*-alternane-*b*-dextrane	4	-

2. Caractérisation moléculaire et macromoléculaire

2.1. Détermination des liaisons inter-oses par la méthode de perméthylation des sucres

La perméthylation est une procédure fiable permettant de déterminer l'enchaînement des monomères constitutifs d'un oligo- ou polysaccharide. Le principe repose sur l'identification des hydroxyles impliqués dans les liaisons glycosidiques. Etant engagés dans les liaisons, ceux-ci sont en effet protégés de la réaction de perméthylation, et l'hydrolyse acide réalisée dans un second temps libère un mélange

d'oses partiellement méthylés. Cette technique nous a permis d'appréhender la structure des composés du *Chapitre 6*.

Un milligramme de chaque échantillon préalablement lyophilisé puis séché sous vide à 40 °C a été dissous dans 1 mL de DMSO à 80 °C pendant 20 min. La méthylation a été réalisée en ajoutant 1 mL de réactif NaOH-DMSO et 0,5 mL d'iodure de méthyle (adapté de Anumula & Taylor, 1992). Pour améliorer la réaction, les échantillons ont été soumis à des ultrasons et mélangés avec un vortex pendant 2 minutes. Cette étape est répétée trois fois. La réaction a été arrêtée par ajout de 2 mL d'eau et les produits méthylés sont extraits avec 2 mL de chloroforme. Après un mélange vigoureux au vortex, les échantillons sont centrifugés à 5000 g pendant 5 minutes. La phase supérieuse aqueuse est éliminée et la phase organique inférieure, après trois lavages avec 4 mL d'eau, est séchée sous rampe à air. Un étalon interne, l'inositol (50 µg), est ajouté à chaque échantillon et l'ensemble est ensuite hydrolysé avec une solution d'acide trifluoroacétique 2 M puis convertis en acétate d'alditols (dérivation chimique adaptée de Englyst & Cummings, 1988). Les acétate d'alditols partiellement méthylés ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne non-polaire TraceGOLD^{TM} TG-1MS GC (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Thermo Scientific^{TM} ; gaz vecteur H_2 à 1,5 mL.min^{-1}) puis détectés par spectrométrie de masse (TRACE-GC-ISQ, Thermo^{TM}). L'identification des acétate d'alditols partiellement méthylés est basée sur la combinaison des temps de rétention relatif des analytes (par rapport à un étalon interne) et de leur spectre de fragmentation (Tableau 20).

Tableau 20 – Tableau permettant l'attribution des signaux déterminés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-ISQ).

Ether de méthyl	Liaison	Temps de retention relative / étalon interne
2,3,4,6Me$_4$-Glc-ol	Glc terminal = Glct	0,800
2,4,6Me$_3$-Glc-ol	(1,3)-Glc	0,861
2,3,6Me$_3$-Glc-ol	(1,4)-Glc	0,873
2,3,4Me$_3$-Glc-ol	(1,6)-Glc	0,881
3,4Me$_2$-Glc-ol	(1,3,4)-Glc	0,905
2,4Me$_2$-Glc-ol	(1,3,6)-Glc	0,937
2,3Me$_2$-Glc-ol	(1,4,6)-Glc	0,933
2,6Me$_2$-Glc-ol	(1,2,4)-Glc	0,915

Glc = glucose, Me = méthyl

2.2. Détermination de la solubilité et des paramètres de structure

2.2.1. Etude de la solubilité dans divers solvants

Afin d'étudier la solubilité des α-glucanes, ceux-ci ont été solubilisés dans différents solvants comme l'eau, le DMSO, NaOH (0,5 M et 1 M), KOH (0,1 M et 1 M), HCl (1 M) et H_2O/DMSO 3/1 (v/v) à 0,5 $g.L^{-1}$. La transmittance des solutions (%T) a été mesurée à 650 nm dans des cuves en verre de précision en utilisant un spectrophotomètre UV-vis Jasco V-530 dans les conditions ambiantes.

2.2.2. Détermination de la concentration des solutions d'α-glucanes

La concentration des diverses solutions est déterminée par la technique colorimétrique à l'orcinol sulfurique. Le dosage est effectué en flux continu grâce à un auto-analyseur Skalar (Figure 47a) (Planchot *et al.*, 1997). A chaud (98 °C) et en milieu acide, les polysaccharides étudiés vont être hydrolysés en unités glucose qui formeront des unités furfural. Celles-ci vont interagir avec l'orcinol pour former un complexe absorbant à 420 nm (Figure 47b).

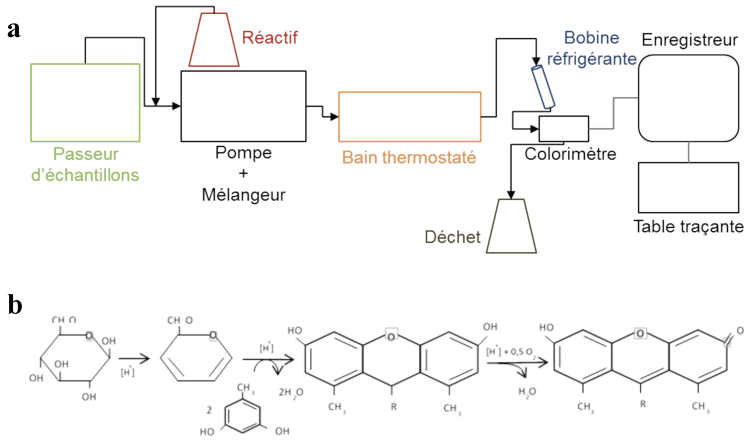


Figure 47 - Représentation de l'appareillage en flux continu permettant le dosage colorimétrique par la méthode à l'orcinol sulfurique.

L'orcinol sulfurique constitue le réactif et est obtenu en refroidissant 650 mL d'eau osmosée dans lequel est ajouté 1 400 mL d'acide sulfurique 98% par petites quantités. Une solution contenant 2,00 g de 3,5-dihydroxytoluène et 50 mL d'eau est agitée pendant 10 min à l'abri de la lumière et est ensuite additionnée au milieu précédent sous agitation. Cette solution peut être stockée 15 jours à l'abri de la lumière. Afin de déterminer la concentration des échantillons, il faut au préalable réaliser une gamme de glucose (constituant des polysaccharides étudiés) entre 25 et 100 $mg.L^{-1}$. Les échantillons à analyser

sont dilués de façon à être situés dans la gamme. L'absorbance du composé furfuralique coloré est proportionnelle à sa concentration suivant la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \times l \times C \qquad [44]$$

avec A l'absorbance, ε le coefficien d'extinction molaire, l la longueur de la cellule et C la concentration de l'échantillon.

Pour déterminer la droite d'étalonnage, la courbe A = f(C) est tracée (Figure 48). Celle-ci est déterminée avant chaque analyse et régulièrement vérifiée au cours de la manipulation. Les échantillons sont analysés en triplicat.

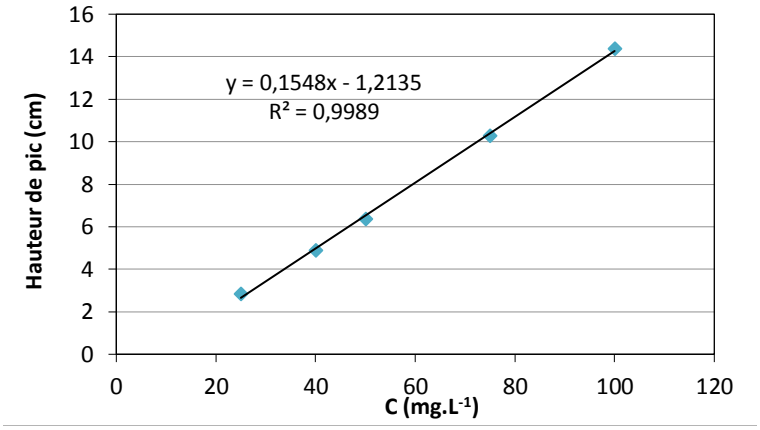


Figure 48 – Droite d'étalonnage d'une gamme de glucose dans l'eau.

2.2.3. AF4-UV-MALLS-DRI

Les distributions en masse molaire et en taille ainsi que la structure des polysaccharides ont été déterminées par fractionnement par croisement de deux flux dans un canal asymétrique (asymmetrical flow fiel flow fractionation AF4) couplé à des détections UV, réfractométrique (DRI) et par diffusion de la lumière multi-angles (MALLS). Après solubilisation à 25 °C des échantillons entre 1 h et 4 h sous agitation, ceux-ci sont filtrés avant l'injection. Les conditions de préparation des échantillons sont reportées dans le Tableau 21.

Tableau 21 – Conditions de préparation des α-glucanes avant l'analyse par AF4-UV-MALLS-DRI.

Echantillons	Solvant de solubilisation	Concentration ($mg.mL^{-1}$)	Filtration (µm)
Dérivés produits par DSR-OK (*Chap.3*)	DMSO puis dilution par 4 avec H_2O	0,5 soit 0,125 après dilution	5
Dérivés produits à partir de D500 (*Chap. 4*)	H_2O	0,5	0,45
Dérivés produits par DSR-M (*Chap. 5*)	H_2O	0,5	0,45
Alternane (*Chap. 5*)	H_2O	0,5	0,45
Dérivés produits par GS-X (*Chap. 5*)	H_2O	0,125	0,45

Le rendement de solubilisation est déterminé grâce à l'équation suivante :

$$Rendement_{solubilisation}(\%) = \frac{C_f}{C_i} \times 100 \quad [45]$$

avec C_i et C_f les concentrations de la solution initiale et de la solution après filtration déterminées par dosage à l'orcinol sulfurique.

Un espaceur de 350 µm, permettant de régler l'épaisseur du canal, et une membrane en cellulose régénérée avec un cut-off de 10 kDa sont placés dans le canal de 275 mm de longueur. Le système est constitué d'une pompe ISO-3100SD, d'un dégazeur SRD-3200, d'un injecteur automatique WPS-3000SL (ThermosPro, ThermoFisher™). Les différents débits sont gérés par Eclipse® AF4 (Wyatt Technology). Le canal est placé dans un four régulé en température à 25 °C (ThermosPro, ThermoFisher™). L'éluant utilisé est une solution à 0,2 $g.L^{-1}$ d'azoture de sodium dans de l'eau Millipore, le tout filtré sur 0,22 µm. Les volumes d'injection, les flux d'injection ainsi que les flux détecteur utilisés pour l'analyse des différents α-glucanes sont présentés dans le Tableau 22.

Tableau 22 - Conditions d'analyses des α-glucanes par AF4-UV-MALLS-DRI.

Echantillons	Injection (µL)	Flux d'injection ($mL.min^{-1}$)	Flux détecteur ($mL.min^{-1}$)
Dérivés produits par DSR-OK (*Chap.3*)	30	0,2	0,84
Dérivés produits à partir de D500 (*Chap. 4*)	100	0,2	1,00
Dérivés produits par DSR-M (*Chap. 5*)	70	0,2	1,00
Alternane (*Chap. 5*)	80	0,2	1,00
Dérivés produits par GS-X (*Chap. 5*)	20	0,2	1,00

Les méthodes d'élution utilisées sont développées et adaptées à la caractérisation d'un polysaccharide donné. Elles varient en fonction du polysaccharide étudié et sont présentées dans la Figure 49. Le système AF4 est couplé à trois détecteurs en ligne : un détecteur MALLS (DAWN Heleos II) équipé d'une cellule de mesure K5 et d'un laser GaAS ($\lambda = 663$ nm), un détecteur réfractométrique fonctionnant à la même longueur d'onde (Optilab T-rEX) de Wyatt Technology (Santa Barbara, CA, Etats-Unis) et un détecteur UV Ultimate 3000 fonctionnant à 280 nm (ThermosPro, ThermoFisher™).

Le rendement d'élution est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$Rendement_{élution}(\%) = \frac{C_{polysaccharides\ (DRI)} \cdot d}{C_f} \times 100 \qquad [46]$$

avec $C_{polysaccharides\ (DRI)}$ la concentration de polysaccharides élués déterminée par l'intégration du signal DRI, d le facteur de dilution.

Les distributions en masse molaire, en rayon ainsi que la polydispersité sont déterminées avec le logiciel Wyatt ASTRA® (v.6.1.4.25). L'incrément d'indice de réfraction dn/dc utilisé pour l'analyse d'α-glucanes est de 0,146 $mL.g^{-1}$. Les rayons hydrodynamiques ont été déterminés en injectant des pullulanes standards (Shodex, Japon) et/ou des sphères de latex monodisperses (Duke scientific, Palo Alto, CA, USA) de R_H connus entre 3,6 et 250 nm de rayon. Les courbes de calibration sont obtenues en traçant le rayon hydrodynamique en fonction du volume d'élution comme décrit précédemment (Rolland-Sabaté *et al*., 2011).

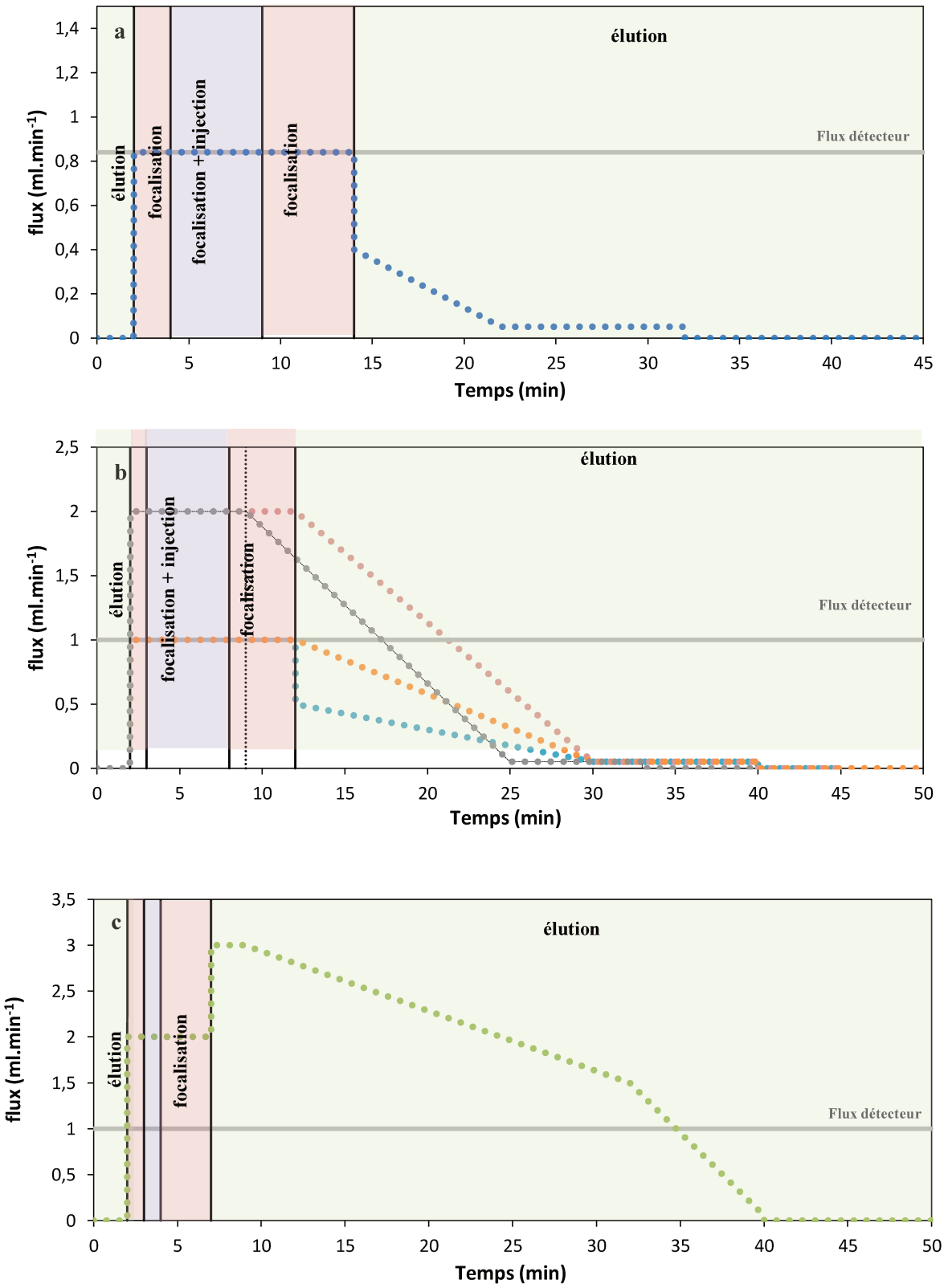


Figure 49 - Récapitulatif des débits, flux détecteur (trait plein) et flux croisé (trait pointillé) utilisés pour l'analyse des α-glucanes par AF4-UV-MALLS-DRI. a. Dextranes produits par DSR-OK. **b.** Dextranes dérivés

du dextrane commercial D500 (trait noir), dextranes produits par DSR-M (trait rouge), α-glucanes produits par GS-X (trait orange), alternane (trait bleu). **c.** Copolymère alternane-*b*-dextrane.

2.2.4. HPSEC-MALLS-DRI

Les solutions sont analysées par chromatographie d'exclusion stérique haute performance couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles et à un réfractomètre différentiel (HPSEC-MALLS-DRI). Ce système est équipé d'une pompe Dionex P680 et d'un injecteur automatique Waters 717. Trois colonnes Suprema 8 mm × 300 mm (PSS, Allemagne) ainsi qu'une pré-colonne de 8 mm × 50 mm sont constituées d'une phase stationnaire d'un réseau de copolymère de polyhydroxyméthacrylate et sont montées en série. Elles présentent un diamètre de particule de 10 µm et leur porosité est de 3000 Å (2 colonnes) et 100 Å (1 colonne). Ces colonnes sont placées dans un four Crocodil CIL (Bordeaux) à 30 °C. Le détecteur de diffusion de la lumière est un DawnHeleos (Wyatt®) opérant à λ = 658 nm à 25 °C. Le détecteur réfractométrique est un réfractomètre à lumière blanche RID-10A (Shimadzu) opérant à 35 °C. L'éluant utilisé est une solution à 0,2 $g.L^{-1}$ d'azoture de sodium, filtré sur 0,22 µm et dégazé. Le flux d'élution est maintenu à 0,5 $mL.min^{-1}$, en mode isocratique. L'échantillon est solubilisé dans l'eau à 0,5 $mg.mL^{-1}$, filtré sur 0,45 µm puis un volume de 100 µL est injecté dans le système. Le temps d'analyse est de 82 min. Les données sont acquises par le logiciel Wyatt ASTRA® (v.6.1.4.25) (Wyatt Technology, Santa Barbara, US).

2.2.5. Détermination de la tailles des particules par diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS)

Afin de déterminer la taille et la solubilité des *α*-glucanes dans divers solvants, ils ont été solubilisés dans l'eau, le DMSO, KOH (0,1 M et 1 M), NaOH (0,5 M) et H_2O/DMSO 3/1 (v/v) à 0,5 $g.L^{-1}$ puis leurs tailles ont été mesurées à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern®) fonctionnant à 173° à 20 °C.

Pour les échantillons du *Chapitre 3 – Résultats complémentaires à la publication 1*, les analyses ont été réalisées au laboratoire Charles Coulomb (Montpellier). Les expériences ont été réalisées en mode homodyne (une seule fréquence) à l'aide d'un détecteur compteur de photons en utilisant deux phototubes dans la configuration de pseudo-corrélation croisée. Le rayonnement incident (λ = 532,5 nm) a été obtenu à partir d'une diode laser Nd-YAG double en fréquence et polarisée verticalement. Les expériences ont été réalisées en utilisant un programme commercial (Amtec Goniometer and Brookhaven BI-9000AT correlator). Les mesures ont été réalisées à 25 et à 45 °C à 0,5 $mg.mL^{-1}$ dans l'eau, NaOH 0,5 M, NaOH 1 M et dans le DMSO, ainsi qu'à 5 angles de diffusion compris entre 30° et

120°. Les fonctions d'autocorrélation ont été traitées par deux méthodes différentes : l'analyse des cumulants (Koppel, 1972) et l'analyse CONTIN (Provencher, 1982) qui donne la distribution des temps de relaxation des fonctions d'autocorrélation mesurées. Les valeurs des rayons hydrodynamiques ont été directement calculées en utilisant le taux de relaxation du premier ordre obtenu à partir d'une analyse des cumulants de second ordre.

2.2.6. Complexation à l'iode de l'oligoamylose et du copolymère amylose-*b*-alternane

La complexation à l'iode des composés amylacés est réalisée à l'aide d'un titrateur DL53 (Mettler Toledo), d'une électrode double pointe platine DM142-100, d'une carte capteur Karl Fisher pour DL5X, d'une burette DV1010 de 10 mL et d'un récipient en verre thermostatable de 80 mL pour DL5X. Dans la cellule thermostatée sont introduits successivement 1 mL d'échantillon à 1 $mg.mL^{-1}$ dans KOH 1N, 2 mL d'HCl 1N, 1 mL de KI à 0,1 N et 15 mL d'eau. Une tension de 250 mV est imposée. Une solution de KIO_3 à $8,33.10^{-4}$ $mol.L^{-1}$ est ajouté au milieu à raison de 0,02 mL toutes les 10 sec. La courbe $E = f(V_{KIO3})$ est tracée et l'extrapolation de façon linéaire des parties de la courbe avant et après le changement de courbure peut être faite. Le point d'intersection des deux droites correspond au volume équivalent d'iode.

2.3. Comportement rhéologique des solutions d'*α*-glucanes en régime dynamique linéiaire

En régime dynamique, on s'intéresse aux propriétés viscoélastiques du matériau sans le perturber. Pour ce faire, on applique une sollicitation sinusoïdale au matériau. Le matériau est donc soumis à une déformation sinusoïdale en fonction du temps $\gamma(t)$ s'écrivant de la façon suivante :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \qquad [47]$$

avec ω la pulsation en $rad.s^{-1}$. Dans le domaine viscoélastique linéaire du matériau, la contrainte résultante $\sigma(t)$ est alors mesurée (Figure 50). C'est également une fonction sinusoïdale du temps de même fréquence mais avec un déphasage δ qui s'écrit :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \qquad [48]$$

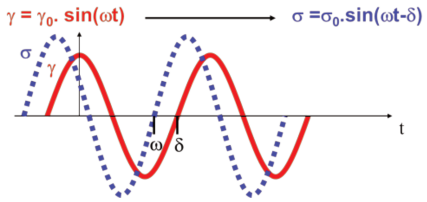


Figure 50 – Mesure de viscoélasticité en régime dynamique.

Le déphasage est caractéristique des propriétés viscoélastiques du matériau. Il est nul pour un solide élastique idéal. Dans le cas d'un liquide visqueux Newtonien, le déphasage vaut π/2 radians et est compris entre 0 et π/2 pour les matériaux viscoélastiques, présentant un comportement intermédiaire. Ainsi, le module conservatif G' qui est en phase avec la sollicitation et le module dissipatif G'' qui est en déphasage de δ avec la sollicitation, sont déterminés à partir des équations suivantes :

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0}\cos\delta \;\; et \; G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0}\sin\delta \qquad [49]$$

Il est également possible de calculer le facteur de perte $\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$.

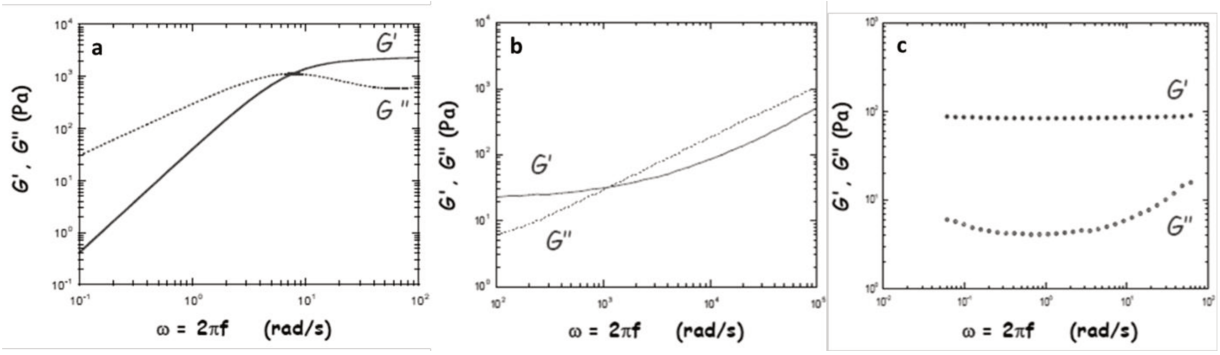


Figure 51 – Courbes de variations des modules conservatifs G' et dissipatifs G'' en fonction de la fréquence. a. solution macromoléculaire. b. Gel faible. c. Gel fort.

La Figure 51 représente les spectres mécaniques typiques de polymères. Pour une solution macromoléculaire (Figure 51a), aux basses fréquences, les modules G' et G'' ont repectivement des pentes de 2 et 1 respectivement et se croisent à une fréquence caractéristique signant le passage d'une contribution visqueuse à une contribution élastique du matériau (Figure 51a). Un gel est dit « faible » lorsque G' > G'' avec G' faiblement dépendant de la fréquence (Figure 51b). Un gel est dit « fort » lorsque G' > G'' avec G' indépendant de la fréquence (Figure 51c).

Les mesures en dynamique sont réalisées dans le domaine linéaire, c'est-à-dire dans la gamme de sollicitation où les modules conservatifs G' et dissipatifs G'' ne dépendent pas de la déformation. Pour le déterminer, un balayage en déformation a été réalisé à une fréquence de sollicitation donnée.

Les mesures rhéologiques ont été réalisées sur un rhéomètre ARES (TA Instruments) à déformation imposée équipé d'une géométrie cône-plan en téflon® (diamètre 40 mm ; angle 0,391 rad ; entrefer 55,6 µm). La régulation thermique est assurée par le plateau inférieur équipé d'un thermostat à effet Peltier. Avant le début des mesures, les échantillons sont recouverts d'huile paraffine pour éviter toute évaporation. Les spectres mécaniques sont réalisés à 25 °C de 100 à 0,001 rad.s^{-1} à des déformations différentes pour chaque échantillon, mais toujours choisie dans le domaine viscoélastique linéaire (Figure 52).

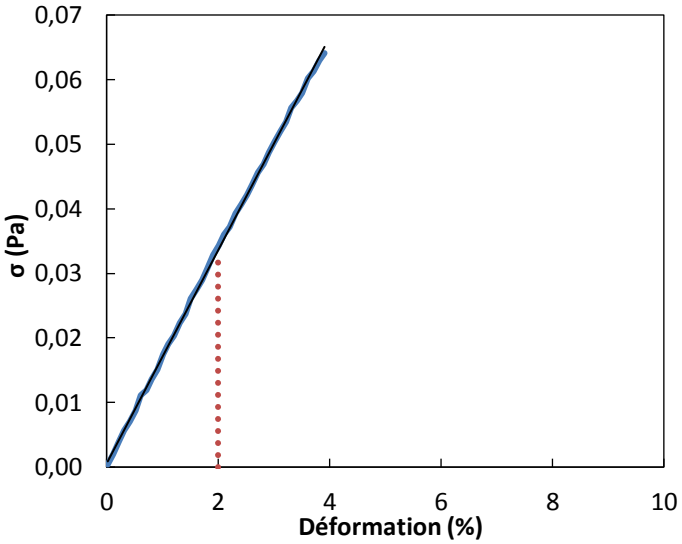


Figure 52 – Courbe de contrainte σ en fonction de la déformation du dextrane D1-3B37 à 2% (p/v) indiquant la valeur de déformation de 2%, déterminée dans le domaine viscoélastique linéaire, et utilisée pour les mesures en régime dynamique.

2.4. Caractérisation par microscopie

- **Loupe binoculaire**

Une loupe binoculaire Leica (Leica Microsystems) à lumière polarisée a été utilisée pour l'observation des polysaccharides en solution ainsi que des films de polysaccharides afin d'observer les macro-séparations de phases et d'éventuelles polarisations des systèmes.

- **Microscopie confocale à balayage laser**

Un microscope confocal à balayage laser (MCBL) en fluorescence permet de regarder un plan focal dans un échantillon épais en s'affranchissant des plans du dessus et du dessous. Une (ou des) source(s) excitatrice(s) balaye(nt) une zone dans les directions x, y et z puis les signaux de fluorescence émis par l'échantillon sont renvoyés vers un détecteur à travers une ouverture appelée sténopé ou pinhole, qui

permet de focaliser le laser dans un plan focal donné et de balayer ensuite en z pour éventuellement réaliser des reconstructions en 3D.

Le marquage des molécules d'intérêt a été réalisé avant l'observation par microscopie confocale. Pour ce faire, deux marqueurs fluorescents ont été utilisés : l'isothiocyanate de fluorescéine (ou FITC, possédant une $\lambda_{excitation}$ à 495 nm et une $\lambda_{émission}$ à 521 nm) pour le marquage du dextrane et la rhodamine-B-isothiocyanate (ou RITC, possédant une $\lambda_{excitation}$ à 540 nm et une $\lambda_{émission}$ à 573 nm) pour le marquage de l'alternane. 1 g de polysaccaride est solubilisé dans 20 mL de DMSO puis environ 0,15 g du marqueur fluorescent (FITC ou RITC), 50 mg de dilaurate de dibutylétain ainsi que quelques gouttes de pyridine sont ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 65 °C pendant 2 h. La solution est ensuite précipitée à l'éther diéthylique. Après filtration du précipité, celui-ci est mis en solution dans l'eau à une concentration de 1% et laissé à dialyser contre l'eau pendant une semaine afin d'éliminer le marqueur en excès. Après vérification de la non-absoprtion aux UVs des eaux de dialyse, la solution est lyophilisée. L'alternane et le dextrane marqués (50/50) (p/p) sont mis en solution dans l'eau pour obtenir une concentration finale totale de 5 et 10% (p/v). Les observations sont réalisées au jour 0 et jour 3. Un microscope Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Europe) a été utilisé pour réaliser les images de mélange de polysaccharides. Les longueurs $\lambda_{excitation}$ appliquées pour la visualisation était de 488 nm pour le FITC et 561 nm pour le RITC, les $\lambda_{émission}$ étaient respectivement de 515 nm et 595 nm (largeur à mi-hauteur de 30 nm et 50 nm, respectivement). La puissance du laser était de 21,6 % dans le cas du FITC et de 10,0% dans le cas du RITC.

- **Microscopie électronique en transmission (MET)**

La microscopie électronique à transmission (MET) consiste à observer à fort grossissement des objets minces et transparents aux électrons. Un faisceau d'électrons fortement accélérés traverse l'échantillon. Les lentilles électromagnétiques du microscope contrôlent la trajectoire des électrons afin de former une image très agrandie des objets sur un écran montrant le volume projeté de l'objet. Le contraste des échantillons peut être augmenté par coloration négative en utilisant un colorant liquide à base d'atomes lourds résistant aux électrons.

Cette technique a été utilisée pour visualiser les polysaccharides en solution aqueuse au CERMAV (Grenoble). Pour cela, des gouttelettes en suspension dans l'eau entre 0,5 et 2 $mg.mL^{-1}$ ont été déposées sur des grilles métalliques recouvertes d'un film fin de carbone puis un agent de contraste, l'acétate d'uranyle à 2% (p/v) est ajouté (coloration négative). Les préparations ont été observées avec un

microscope Philips CM200 (Eindhoven, Pays-Bas) fonctionnant à 200 kV et les images ont été enregistrées avec un appareil photo numérique TVIPS TemCam F216.

- **Microscopie électronique à balayage (MEB)**

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée afin de visualiser la surface et l'organisation structurale des polysaccharides. Le principe de base du MEB est la formation d'un faisceau très fin d'électrons, monocinétique à partir d'un filament de tungstène porté à haute température. Le faisceau balaie la surface de l'échantillon où se produisent des interactions détectées par un capteur qui contrôle la brillance d'un oscilloscope cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau d'électrons.

Les échantillons, sous forme de poudre dans leur état de réception, sont disposés sur des plots en laiton recouvert d'un adhésif double face carbone. Ils sont alors métallisés au platine avant d'être introduit dans la chambre d'observation. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope JEOL 7600F, accessible à l'Institut des Matériaux Jean Rouxel (Nantes). Une tension d'accélération de 5 kV a été utilisée de façon à éviter la dégradation de l'échantillon qui aurait lieu si la vitesse d'impact des électrons incidents sur l'objet était trop grande.

3. Détermination des propriétés physiques des poudres et matériaux

3.1. Etude par calorimétrie de la température de transition vitreuse et de la température de recristallisation

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) consiste à mesurer les différences d'échanges de chaleur entre un échantillon et une référence (Figure 53). Cette technique permet d'observer des transitions de phase comme la fusion, la recristallisation, les transitions solide-solide ou les transitions vitreuses.

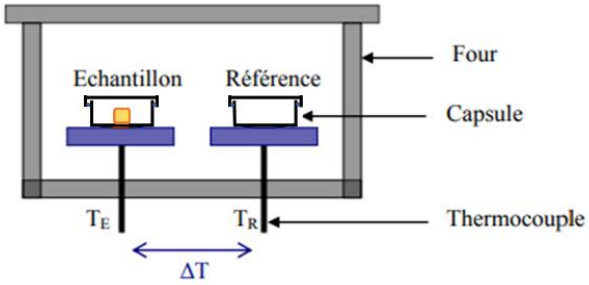


Figure 53 – Schéma représentatif du dispositif expérimental (DSC).

La Figure 53 est une représentation du dispositif expérimental constitué d'un four dans lequel sont installées deux capsules, l'une contenant l'échantillon à analyser, l'autre sert de référence. Les capsules sont soumises à un programme contrôlé de température en fonction du temps. Le système mesure la différence ΔT entre la température de l'échantillon T_E et celle de la référence T_R et les convertit en flux de chaleur.

La détermination des températures de transition vitreuse T_g et de recristallisation T_c a été réalisée à l'aide d'un calorimètre DSC Q100 (TA Instruments). Des capsules en inox contenant environ 10 mg d'échantillon ont été utilisées. La capsule de référence était une capsule en inox vide. Pour s'affranchir du vieillissement de l'échantillon lors de la détermination de la T_g, deux rampes de chauffage successives ont été appliquées pour tous les polysaccharides sauf pour l'alternane. L'échantillon est d'abord chauffé de – 40 °C à 90 °C à une vitesse de 3 °C.min^{-1}, puis refroidi à une vitesse de 10 °C.min^{-1} jusqu'à – 40 °C, ensuite l'échantillon est à nouveau chauffé jusqu'à 200 °C à 3 °C.min^{-1}. Les deux rampes de chauffage successives pour l'alternane étaient : – 40 °C à 63 °C puis – 40 °C à 200 °C à 3 °C.min^{-1}. La Figure 54 représente la détermination de la T_g à mi-hauteur du saut de capacité calorifique correspondant au ΔC_p ainsi que la détermination de la T_c en sommet du pic exothermique ainsi que l'enthalpie de recristallisation ΔH correspondant à l'aire sous le pic.

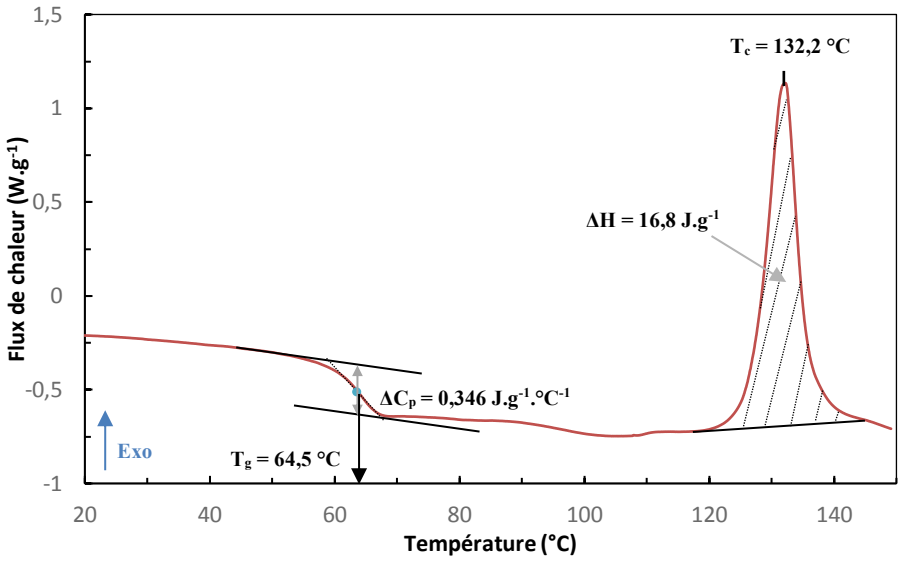


Figure 54 – Etude calorimétrique pour la détermination de la T_g et de la T_c d'un échantillon au deuxième passage : cas du dextrane commercial D500 à 3°C.min^{-1}.

Les capsules sont ensuite percées afin de déterminer la teneur en eau de l'échantillon. La détermination de la teneur en eau est réalisée par analyse thermogravimétrique (ATG). L'ATG consiste à mesurer la variation de masse d'un matériau en fonction de la température et/ou du temps. L'appareil utilisé est un TGA 2050(TA Instruments) constitué d'une balance sensible à ± 10^{-3} mg. La masse perdue est déterminée lorsque la masse résiduelle a atteint un équilibre. Pour cela, une rampe de température est appliquée sous balayage d'azote. La rampe de température utilisée est la suivante : de 25 °C à 90 °C à raison de 5 °C.min^{-1} puis une isotherme est effectué pendant 7 heures à 90 °C afin d'atteindre l'équilibre.

3.2. Dégradation des α-glucanes par ATG

L'étude de dégradation des polysaccharides a été réalisée par ATG et a permis d'en extraire la température de dégradation. Une rampe en température de 25°C à 800°C à une vitesse de 10 °C.min^{-1} a été utilisée directement sur les poudres conditionnées à 59% HR.

3.3. Caractérisation structurale par diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X (DRX) permet d'étudier les structures cristallines des échantillons. Lorsqu'un faisceau monochromatique de rayons X (λ = 0.15405 nm) est dirigé sur un échantillon, il en résulte des interactions rayonnement-matière. Le faisceau est alors diffracté dans une certaine direction par chacune des familles de plans réticulaires. Selon la loi de Bragg [50], les distances d entre les plans diffractants peuvent être connues en mesurant l'intensité du faisceau en fonction de l'angle 2θ.

$$2d \sin\theta = n \lambda \qquad [50]$$

avec d la distance réticulaire entre deux plans de diffraction ; θ l'angle incident des rayons X ; λ la longueur d'onde et n l'ordre de diffraction (nombre entier).

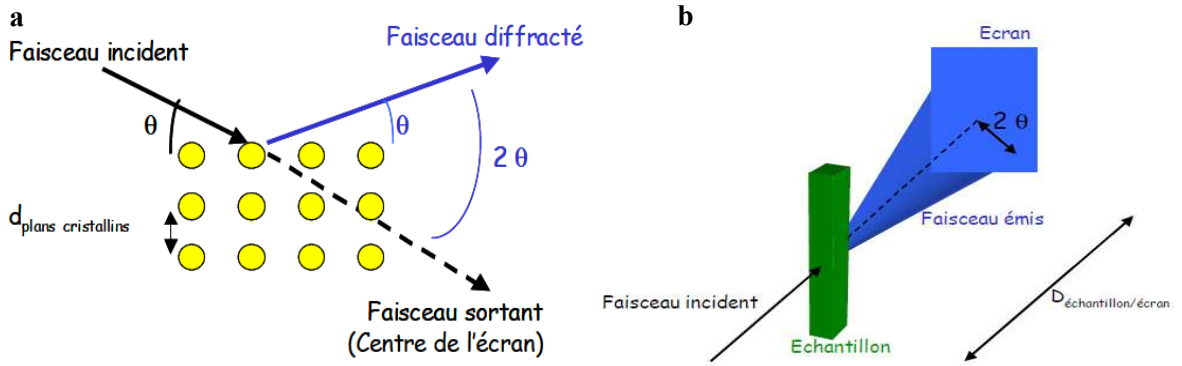


Figure 55 – Schéma de principe d'une mesure par diffusion des rayons X. a. Diffraction de plans cristallins. **b.** Schéma du dispositif expérimental.

La matière désorganisée, ou amorphe, émet un halo. Le faisceau sortant se trouve sous la forme d'un cône dont l'angle solide est 2θ. Un détecteur permet de recueillir l'intensité du rayon en fonction de 2θ.

Un diffractomètre Bruker D8 X-Ray (Karlsruhe, Allemagne) muni d'un détecteur 2D Gadds a été utilisée pour les caractérisations structurales par diffraction des rayons X. La source est une anode de cuivre. Une différence de potentiel de 40 kV (avec une intensité de 40 mA) est appliquée entre les électrodes. Les électrons accélérés entrent en collision avec l'anode de cuivre, il en résulte une fluorescence X. Dans une configuration dite WAXS (Wide Angle X-Ray Scattering) : $d_{échantillon\text{-}détecteur}$ = 10 cm ((2θ ϵ[3° ; 30°] ; 0,2 nm <d<3 nm), le détecteur est décalé de 25° par rapport à la direction du faisceau incident.

Les spectres obtenus à partir des diffractomètres sont normalisés par rapport à l'aire totale diffusée pour des angles 2θ compris entre 3° et 30°.

Pour réaliser les balayages en température, la configuration est la suivante : $d_{échantillon\text{-}détecteur}$ = 8 cm (cellule Linkam® ; faisceau central ; (2θ ϵ[3° ; 27°])). La régulation en température est réalisée à l'aide d'un flacon d'azote liquide et d'un boîtier de commande (température : 20 °C à 150 °C, rampe : 3 °C.min^{-1}, durée : isotherme de 10 min aux températures d'acquisition).

Les spectres sont déconvoluées grâce au logiciel Origin® et les aires cristalline et amorphe déterminées. Le degré de cristallinité est ensuite calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Taux de cristallinité (\%)} = \frac{\text{Aire totale cristalline}}{\text{Aire amorphe} + \text{Aire cristalline}} \quad [51]$$

3.4. Détermination de la cristallinité par résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'acquisition des spectres ^{13}C CP-MAS (Cross Polarization – Magic Angle Spinning) a été réalisée avec un spectrophotomètre Bruker Avance III 400 MHz WB, travaillant à 100,62 MHz pour le noyau ^{13}C, équipé d'une sonde double résonance H/X MAS 4 mm. La fréquence de rotation utilisée a été de 9 kHz à température ambiante. Les paramètres de la séquence de polarisation croisée utilisés ont été les suivants : impulsion à 90° proton = 2,95 µs ; temps de contact = 2,75 ms ; temps de recyclage = 10 s. 5120 scans ont été accumulés sur une durée d'environ 14 h. Le signal du carbonyle de la glycine (176,03 ppm) a été utilisé comme référence externe pour calibrer les déplacements chimiques du spectre ^{13}C. Tous les paramètres des raies (déplacements chimiques, largeur à mi-hauteur, aire et rapport Gaussien/Lorentzien) ont été déterminés avec la méthode des moindres carrés à l'aide du logiciel Peakfit®.

3.5. Fabrication des matériaux

L'objectif était d'obtenir des matériaux, principalement des films, afin d'évaluer la filmabilité des α-glucanes synthétisés et de réaliser des essais mécaniques aux petites et/ou grandes déformations sur un minimum de 5 éprouvettes afin d'évaluer leurs propriétés mécaniques.

3.5.1. Fabrication de films obtenus par casting

Des solutions à 2% (p/v) de polysaccharides dans l'eau sont préparées afin d'élaborer des films minces. La solution est agitée pendant 2 h à température ambiante puis dégazée sous vide pendant 15 min afin d'éliminer les bulles d'air et mise sous ultra-sons pendant 15 min. Les films sont obtenus par casting : la solution est déposée sur des plaques en polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou de verre recouvertes de Téflon® de façon à avoir 5 mm d'épaisseur de solution sur toute la surface. Les plaques sont ensuite placées dans une étuve à 40 °C jusqu'à évaporation complète de l'eau (Figure 56).

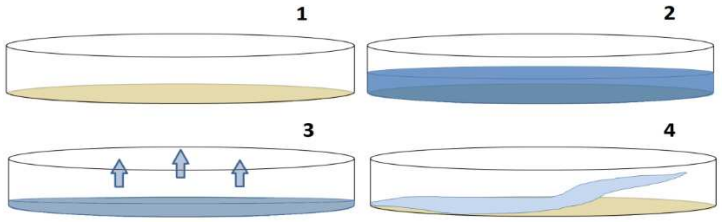


Figure 56 – Représentation du procédé de casting. 1. Support recouvert de Téflon®. 2. Dépôt de la solution sur le support. 3. Evaporation de l'eau à 40°C. 4. Obtention du film polysaccharidique.

Les films sont enfin placés dans une enceinte conditionnée au bromure de sodium (NaBr) à 20 °C et à 59% d'HR pendant une semaine. L'épaisseur du film est déterminée à l'aide d'un micromètre avant chaque analyse.

3.5.2. Fabrication de fils

Les fils de dextrane ont été préparés à l'aide d'une solution de dextrane concentrée à 60% (p/v) dans l'eau. La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit. Celle-ci est centrifugée à 6000 $tr.min^{-1}$ afin d'enlever les bulles d'air dans la solution. Les fils sont obtenus par étirement de la solution à l'aide d'une spatule et sont ensuite séchés à l'air ambiant. Les fils sont ensuite placés dans une enceinte conditionnée (NaBr) à 20 °C et à 59% d'HR pendant une semaine. L'épaisseur du fil est déterminée à l'aide d'un micromètre avant chaque analyse.

3.5.3. Thermomoulage

Le thermomoulage des échantillons est réalisé à l'aide d'un moule de 10 mm × 36 mm en acier Z30 C13 nitruré et de profondeur 0,1 mm (Scamex®). Il est constitué de 3 pièces : la matrice, un poinçon et une cale, le tout rectangulaire (Figure 57a). 0,5 g d'échantillon, préalablement conditionné à 59% HR, sont répartis de manière homogène dans l'ensemble moule + cale. Le poinçon vient fermer l'ensemble. Le dispositif est ensuite placé dans un système régulé en température lui-même sous une presse (Figure 57b).

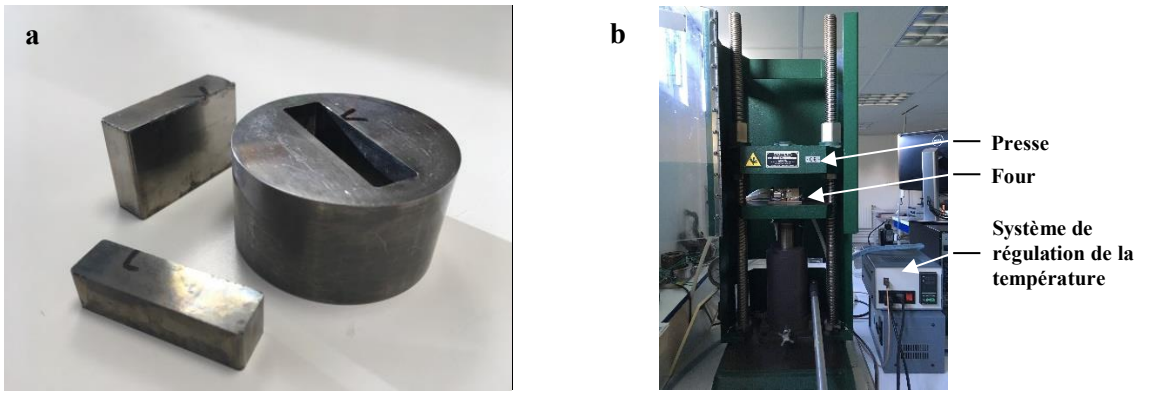


Figure 57 – a. Moule ayant servi au thermomoulage. b. Presse ayant servi au thermomoulage.

Pour l'obtention d'un *barreau amorphe*, la rampe de température suivante a été utilisée : 20 °C à 90 °C pendant 15 min. Une pression de 100 bar est alors appliquée et la température de 90 °C est maintenue pendant 15 min. Une rampe de refroidissement allant de 90 °C à 20 °C est réalisée pendant 15 min et la pression est relâchée une fois le système revenu à température ambiante.

Pour l'obtention d'un *barreau semi-cristallin*, la même méthode est utilisée, la température de 90 °C est remplacée par une température de 150 °C.

3.6. Analyse thermomécanique dynamique (DMA) en humidité contrôlée

L'analyse mécanique dynamique permet de déterminer les modules de stockage E' et de perte E'' d'un échantillon soumis à une déformation sinusoïdale. Lors d'une mesure mécanique dynamique aux petites déformations, la déformation doit être suffisamment faible pour ne pas créer de déformations irréversibles : l'échantillon reste dans son domaine élastique.

Le signal de réponse en déformation s'écrit :

$$\varepsilon_{(t)} = \varepsilon_0 \,.\, \sin(\omega t) \qquad [52]$$

où ε_0 est l'amplitude du cycle de déformation, ω correspond à la pulsation en rad.s^{-1}, et t le temps en s. Lors d'une sollicitation sinusoïdale, et dans le domaine élastique, le module d'Young complexe peut être défini comme suit :

$$E = E' + i\,E'' \qquad [53]$$

où E' est le module de stockage représentant la composante élastique et le module en quadrature, E'' le module de perte représentant la composante visqueuse. La tangente de perte tan δ est définie comme le rapport de E'' sur E'.

En analyse mécanique dynamique, les modules E' et E'' des polymères sont mesurés en fonction de la température, de l'humidité relative ou du temps. Le polymère est ainsi déformé sous une déformation périodique réversible à une température (isotherme ou programmée) et une humidité relative contrôlées. Le module de stockage est à rapprocher de la rigidité et le module de perte à la dissipation d'énergie et à l'amortissement.

Pour les essais à humidité contrôlée, la machine utilisée est un DMA (Dynamical Mechanical Analyzer) 50N 01dB-Metravib associé à un bloc de contrôle d'humidité et de température (Figure 58a, b). Les films de polysaccharides ont été découpés en bandes de 5 mm de large et 1 cm de long, puis fixés entre un mors fixe et un mors mobile. La distance entre les mors a été mesurée au pied à coulisse. La force statique, la déformation ainsi que la fréquence utilisée sont de 0,5 N, 0,01% et 1 Hz, respectivement.

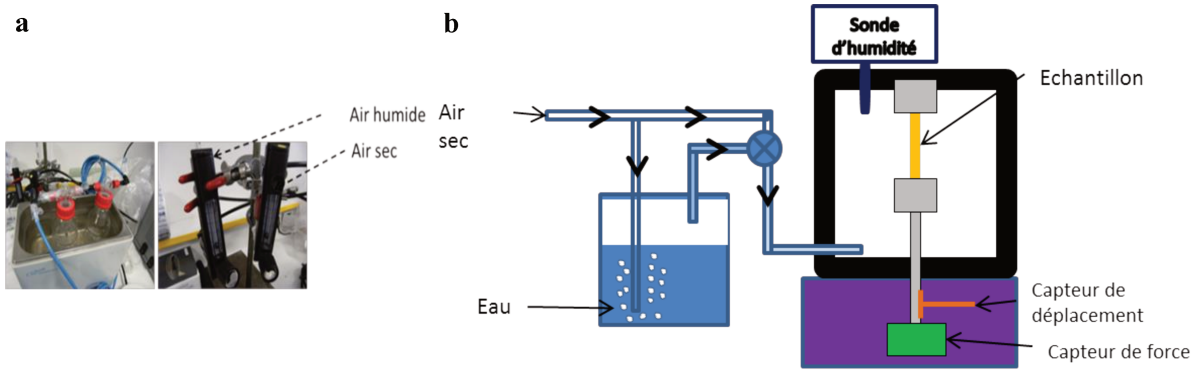


Figure 58 – a. Système de régulation en humidité. b. Représentation du système de mesure de Dynamical Mechanical Analyzer (DMA) couplé à une régulation en humidité.

3.7. Propriétés mécaniques aux grandes déformations

Cet essai mécanique consiste à appliquer une déformation longitudinale (étirement) à vitesse constante sur un échantillon au-delà de son domaine élastique et jusqu'à la rupture. L'appareil de traction relève la force de traction nécessaire en fonction de l'allongement. Les éprouvettes ont été découpées dans un film en bandelettes de 5 mm de largeur et de 2 cm de longueur. L'épaisseur de la bandelette a été déterminée à l'aide d'un micromètre. La bandelette a ensuite été placée dans un appareil de micro-traction Linkam 200N (Figure 59). La longueur initiale séparant les mors était de 15 mm et la vitesse de déplacement de la traverse est de 10 $\mu m.s^{-1}$.



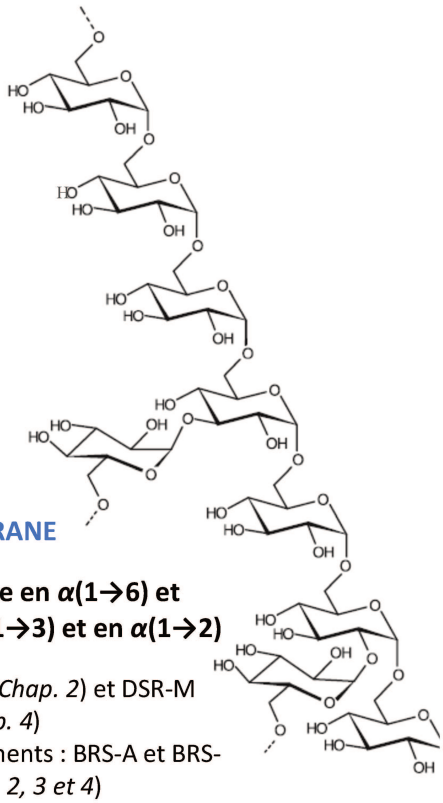
Figure 59 – Appareil de micro-traction Linkam 200N.

À partir des courbes de force en fonction du déplacement, différents paramètres sont obtenus :

- La ***contrainte σ*** (en MPa) correspond à la force mesurée rapportée à la section de l'éprouvette : $\sigma = \frac{F}{A}$ avec F en Newton (N) et S la section de l'éprouvette (mm²).
- La ***déformation ε***, sans unité, correspond au rapport entre le déplacement et la longueur de référence : $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l0} = \frac{l-l0}{l0}$ avec l l'allongement et l_0 la longueur de référence exprimés en mm.
- Le ***module d'Young E*** (en MPa) correspond à la pente de la courbe contrainte-déformation pour les grandes déformations sur le domaine linéaire. Il est également appelé le module d'élasticité. Plus ce module sera élevé, plus le matériau sera rigide.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \qquad [54]$$

L'allure des courbes contrainte-déformation permet de définir un comportement particulier du matériau tel que le comportement fragile (rupture dans le domaine élastique) et ductile (rupture dans le domaine plastique).

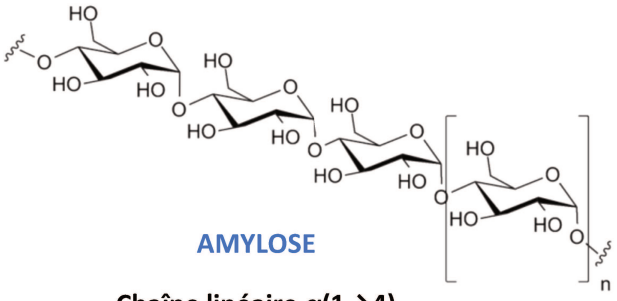


DEXTRANE

Chaîne principale en α(1→6) et ramifications en α(1→3) et en α(1→2)

Enzymes : DSR-OK (*Chap. 2*) et DSR-M (*Chap. 4*)
Enzymes de branchements : BRS-A et BRS-BΔ1 (*Chap. 2, 3 et 4*)

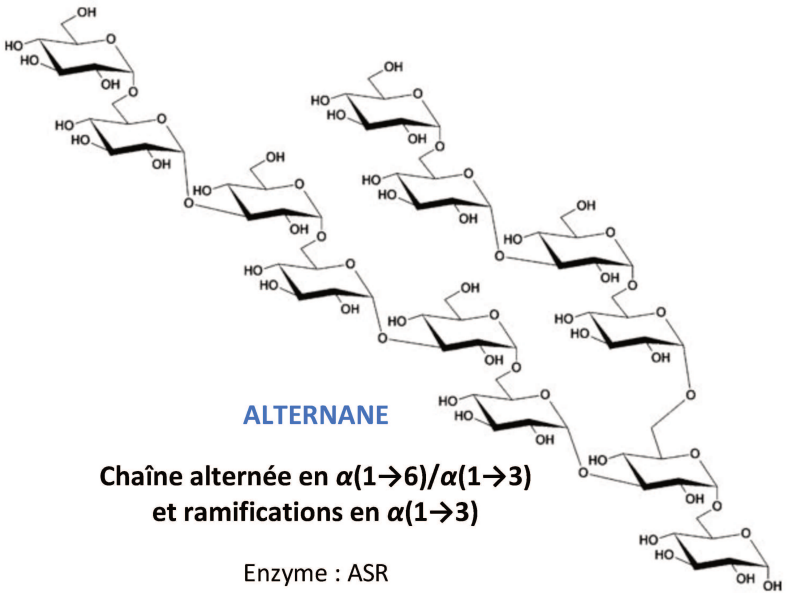
Chapitres 2, 3 et 4



AMYLOSE

Chaîne linéaire α(1→4)

Chapitre 4

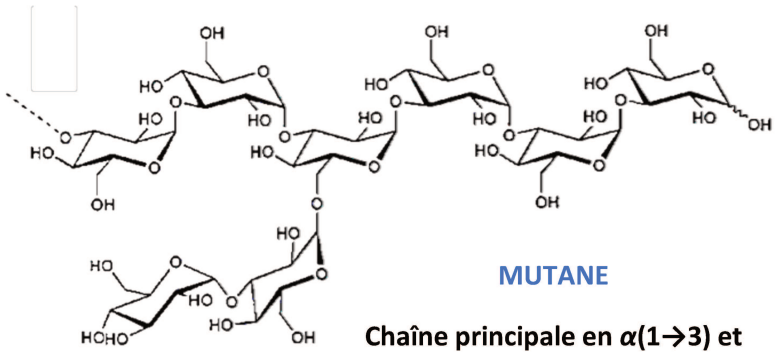


ALTERNANE

Chaîne alternée en α(1→6)/α(1→3) et ramifications en α(1→3)

Enzyme : ASR

Chapitre 4



MUTANE

Chaîne principale en α(1→3) et ramifications en α(1→6)

Enzymes : GTF-J et GTF-Si

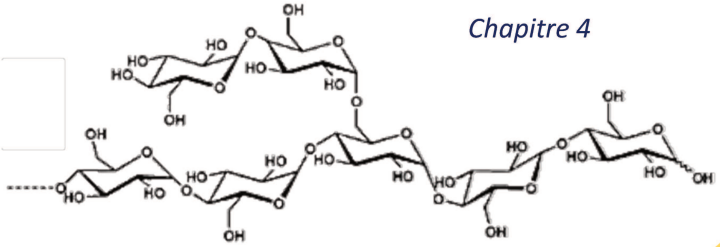
Chapitre 4

REUTÉRANE

Chaîne principale en α(1→4) et α(1→6) et ramifications en α(1→6)

Enzyme : GS-X

Chapitre 4



CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE NOUVEAUX DEXTRANES DE TRES HAUTES MASSES MOLAIRES OBTENUS PAR SYNTHESE ENZYMATIQUE

Introduction

Dans ce chapitre, notre objectif a été de caractériser précisément différents dextranes produits par synthèses enzymatiques impliquant une dextrane-saccharase recombinante DSR-OK provenant de *Oenococcus kitaharae* DSM 17330 connue pour synthétiser de très gros dextranes comprenant majoritairement des liaisons de types $\alpha(1\rightarrow6)$ avec des masses molaires > 10^9 g.mol^{-1} (Vuillemin *et al.*, 2018) et deux enzymes de branchement, BRS-A et BRS-BΔ1 provenant de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 et de *Leuconostoc citreum* NRRL B-742 respectivement, qui ont servi à obtenir des dextranes avec différents types de branchement ($\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow2)$) et différents taux de branchement (2 à 37%). Les types et les taux de branchement ont été variés en utilisant l'une ou l'autre des enzymes de branchement et en faisant varier la concentration en saccharose. Les différentes voies de synthèse sont représentées dans la Figure 60.

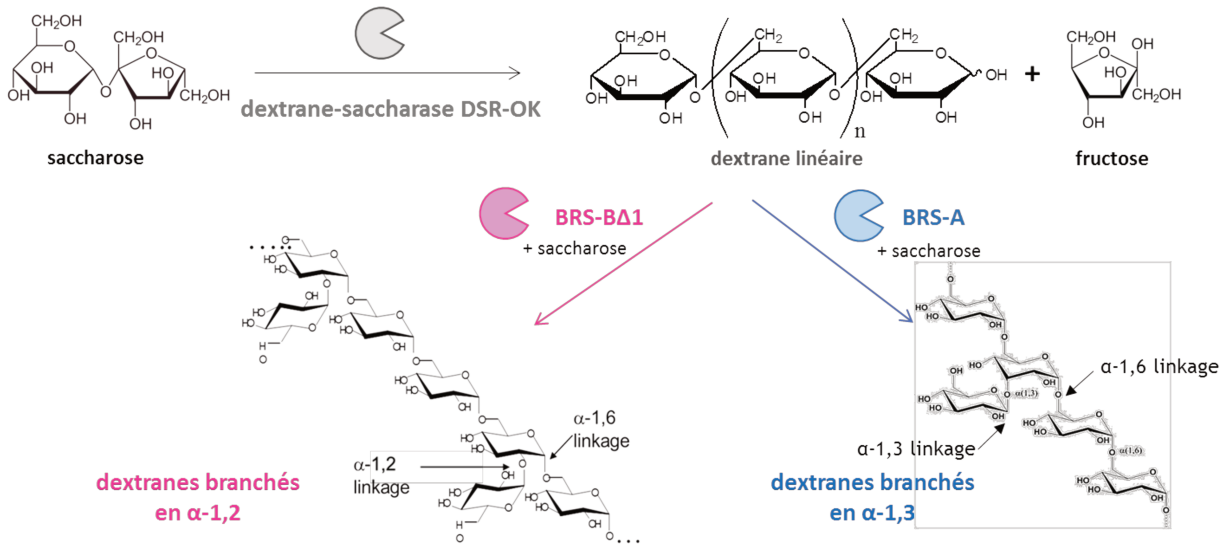


Figure 60 - Représentation des voies de synthèse ayant servi à obtenir les dextranes de l'étude.

Ainsi, cinq dextranes ont été produits : un dextrane synthétisé par l'enzyme DSR-OK puis à partir de ce premier dextrane, quatre dextranes ont été obtenus à l'aide des deux enzymes de branchement.

Afin de faire un lien entre la structure et les propriétés de ces dextranes plus ou moins branchés en différentes positions, les caractéristiques macromoléculaires ont été déterminées en combinant la RMN

^{1}H et le fractionnement par couplage flux-force asymétrique (AF4) couplé à la diffusion de la lumière laser multi-angulaire (MALLS). Les propriétés thermiques de ces dextranes ont également été étudiées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) pour déterminer leur température de transition vitreuse et de recristallisation. Afin de déterminer leurs propriétés mécaniques, des films ont été produits par casting et étudiés par analyse mécanique dynamique en fonction de l'humidité relative. Ces résultats font l'objet d'une publication dans Carbohydrate Polymers, présentée en première partie de ce chapitre et intitulée *"Macromolecular structure and film properties of enzymatically-engineered high molar mass dextrans"*.

La deuxième partie de ce chapitre concerne des résultats complémentaires à la publication expliquant les difficultés rencontrées notamment dans la détermination de la taille de ces très gros dextranes. Une étude rhéologique a été réalisée afin d'étudier l'impact que peuvent avoir ces branchements sur les propriétés rhéologiques de ces dextranes. Aussi, lors de leur synthèse, des produits secondaires se retrouvent présents en solution (fructose, glucose, …) et ne sont pas éliminés totalement lors des étapes de précipitation et de purification. Ces impuretés, si elles sont présentes en grande quantité, peuvent être gênantes lors de la détermination des propriétés des dextranes. Ce chapitre se finira donc par une étude de l'impact de ces impuretés dans les échantillons sur les propriétés rhéologiques, thermiques et mécaniques.

Publication 1

Macromolecular Structure and Film Properties of Enzymatically-Engineered High Molar Mass Dextrans

Pauline Faucard, Florent Grimaud, Denis Lourdin, Jean-Eudes Maigret, Claire Moulis, Magali Remaud-Siméon, Jean-Luc Putaux, Gabrielle Potocki-Véronèse and Agnès Rolland-Sabaté

1. Abstract

New $\alpha(1\rightarrow2)$ or $\alpha(1\rightarrow3)$ branched dextrans with high molar masses and controlled architecture were synthesized using a dextransucrase and branching sucrases. Their molecular structure, solubility, conformation, film-forming ability, as well as their thermal and mechanical properties were determined. These new dextrans present structures with low densities from 9500 to 14000 g m^{-3} in H_2O/DMSO medium, their molar mass, size and dispersity increase with increasing branching degree (weight-average molar mass up to 10^9 g mol^{-1} and radius of gyration around 500 nm). Dextrans exhibit a glass transition between 40.5 and 63.2 °C for water content varying from 12.2 to 14.1%. The effect of branching is mainly observed on the ability of dextran to crystallize. They have a good film-forming ability with a storage modulus which varies from 2 to 4 GPa within a relative humidity range of 10-50%.

Keywords

dextrans, sucrose-active enzymes, asymmetrical flow field-flow fractionation, thermal properties, hygromechanical properties.

2. Introduction

Due to their abundance, carbon-neutrality and low cost, biosourced materials are an interesting alternative to polymers derived from fossil resources for producing a wide range of materials with plastic and elastomeric properties. The bio-based polymer production capacities are projected to grow by more than 400% by 2019 (Aeschelmann & Carus, 2015). In particular, α-D-glucans are widely employed in the industry for their functional properties. Starch is used in food and bioplastics whereas pullulans and dextrans are used for pharmaceutical, medical, cosmetic and food applications. Xanthan, gellan or dextran exhibit texturing or film-forming properties and are exploited in a broad range of applications such as controlled release system and wound healing tissue engineering (Moscovoci, 2015). In this context, developing dextrans with new structures in order to modulate their mechanical properties by a tailoring approach is an interesting challenge. Dextran biosynthesis requires the action of dextransucrases, enzymes that belong to the Glycoside Hydrolase family 70 (Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Coutinho & Henrissat, 2014). Most of the enzymes classified in this family use sucrose as the D-glucopyranosyl donor to synthesize α-D-glucans with a very high molar mass (>10^6 g mol^{-1}) with the concomitant release of D-fructose. They are also referred to as glucosyltransferases (GTFs) or glucansucrases (GSs) (André, Potocki-Véronèse, Morel, Monsan & Remaud-Siméon, 2010; Leemhuis *et al.*, 2013a).

Depending on their specificity, GSs catalyze the formation of linear or branched α-D-glucan chains with various types of glycosidic linkages, namely $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$, $\alpha(1\rightarrow4)$ and/or $\alpha(1\rightarrow6)$ (Jeanes *et al.*, 1954; Sidebotham, 1974; André *et al.*, 2010; Moulis, André, & Remaud-Siméon, 2016). However, a new sub-group of sucrose-active enzymes was recently discovered in this GH70 family, corresponding to enzymes that display no polymerase activity, but efficiently transfer the glucosyl residue from sucrose to linear $\alpha(1\rightarrow6)$ dextrans through the specific formation of single $\alpha(1\rightarrow2)$ or $\alpha(1\rightarrow3)$ linked glucosyl units. They are named branching sucrases (BRSs) (Brison *et al.*, 2010, 2012; Passerini *et al.*, 2015; Vuillemin *et al.*, 2016). Thus, the sequencing of *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 *and Leuconostoc citreum* NRRL B-742 genomes allowed identifying two BRSs that naturally graft dextrans via $\alpha(1\rightarrow2)$ or $\alpha(1\rightarrow3)$ ramifications (BRS-A and BRS-B, respectively) (Passerini *et al.*, 2014, 2015). Their specificity was investigated, revealing their potential for the production of branched dextrans with a controlled degree of branching (Passerini *et al.*, 2015; Vuillemin *et al.*, 2016). The effect of branching on film properties of polysaccharides have been examined previously by Bizot *et al.* (1997). Branching induces a T_g depression (-10/-20°C) for amylopectin *vs* amylose and (-5/-10°C) for phytoglycogen *vs* amylopectin, which could be interpreted in terms of internal plasticization. For dextrans, it was known

that entanglements of long chains induced the formation of films during the dehydration of aqueous solution but the effect of branching was not known.

The objective of this work was to precisely characterize the structure of very high molar mass dextrans and evaluate the effect of branching on their thermal properties and film-forming ability. For this aim, new dextrans with very high molar masses and controlled architectures ($\alpha(1\rightarrow2)$ and $\alpha(1\rightarrow3)$ branched dextrans) were thus synthesized using the recombinant dextransucrase DSR-OK from *O. kitaharae* DSM 17330 (Vuillemin *et al.*, 2015) and the recombinant branching sucrase BRS-A from *L. citreum* NRRL B-1299 and BRS-B from *L. citreum* NRRL B-742. First, the macromolecular characteristics of these designed dextrans were determined by combining ^{1}H-NMR and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled with multi-angle laser light scattering (MALLS). Then, their thermal properties (including glass transition temperature) and the mechanical properties of films prepared by casting were studied as a function of relative humidity. In order to evidence a potential effect of branching on films properties no external plasticizer other than water was used.

3. Materials and methods

3.1. Enzyme Production and Enzymatic Assay

The dextransucrase from *Oenococcous kitahare* DSM 17330 (DSR-OK), the branching sucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (BRS-A) and the branching sucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742 (BRS-BΔ1) were expressed as fusion proteins in *E. coli* BL21 cells. As previously described, the *E. coli* BL21 Star cells carrying either the pET-53-DEST-dsrOK (Vuillemin *et al.*, 2015) or the pET-55-brsB Δ1 plasmids (Vuillemin *et al.*, 2016), and the *E. coli* BL21 AI cells carrying the pBAD-DEST49-brsA plasmid (Passerini *et al.*, 2015) were all grown in ZYM-5052 medium, during 24 h at 23 °C for producing DSR-OK, or during 26 h at 21 °C for BRS-A and BRS- BΔ1.

The cells were harvested by centrifugation (5 000 *g*, 15 min, 4 °C), re-suspended in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.75) at a final optical density of 80 at 600 nm, and disrupted by sonication. The recombinant enzymes were recovered after centrifugation of the crude cell extracts (15 000 *g*, 30 min, 4 °C). Supernatants (cell-free extracts) were used for polymer production and for the production of branched dextrans with a controlled degree of branching.

Dinitrosalicylic acid (DNS) enzymatic assays were performed at 20 °C in 50 mM sodium acetate, pH 5.75. Enzyme activity was determined by measuring the initial velocity of released fructose from 100 g L^{-1} sucrose. Fructose concentration was determined using the DNS method (Miller, 1959). One unit of DSR-OK, BRS-A and BRS-BΔ1 enzyme corresponds to the amount of enzyme that catalyzes the production of 1 µmol of fructose per min in the assay conditions.

3.2. Dextran Synthesis

A dextran fraction was produced at 20 °C using 1 U mL^{-1} of DSR-OK enzyme and 100 g L^{-1} of sucrose in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.75. After 24 h, the reaction was stopped by adding one volume of the final reaction medium to one volume of isopropanol (95 vol%) to precipitate dextran. The supernatant containing fructose and low molar mass products was discarded after decantation. The dextran precipitate was re-suspended in ultrapure water. This purification process was repeated twice before freeze-drying. The purified dextran, containing 2% of $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages, was named D1-3B2.

Acceptor reactions with sucrose and the purified D1-3B2 fraction at various concentrations were performed using the BRS-A and BRS-BΔ1 enzyme (0.5 U mL^{-1}) at 20 °C in 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.75. A series of $\alpha(1\rightarrow2)$ and $\alpha(1\rightarrow3)$ branched dextrans was synthesized by varying the initial amounts of sucrose and dextran. The amount of enzyme used for the acceptor reactions was determined in order to reach complete sucrose consumption in less than 24 h. After 24 h of reaction, the branched dextrans were purified by isopropanol treatment as upper described. In total, samples of 100 g of each dextran were produced.

3.3. Quantification of Proteins, Glucose, Fructose and Leucrose in Purified Dextrans

Protein quantification was performed by using a *DC*™ Protein Assay using BSA as a standard. The amount of glucose, fructose and leucrose in purified dextrans was measured by using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Purified dextrans were re-suspended in water to a final concentration of 0.4 g L^{-1} and analysed by HPAEC-PAD on a 2 × 250 mm Dionex Carbopac PA100 column. A gradient of sodium acetate (from 6 to 300 mM in 30 min) in 150 mM NaOH was applied at 0.25 mL min^{-1} flow rate. Detection was performed using a Dionex ED40 module with a gold working electrode and a Ag/AgCl pH reference. The experimental uncertainty for protein and mono-/disaccharide quantification is 0.2% and was determined from the variation obtained between triplicate analyses of the samples by each method.

3.4. ^{1}H-NMR Analysis

Freeze-dried polymer samples were re-suspended in deuterated water at a final concentration of 20 mg mL^{-1}. ^{1}H-NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 500 MHz spectrometer using a 5 mm z-gradient TBI probe, an acquisition frequency of 500.13 MHz and a spectral width of 8012.82 Hz. All measurements were performed at 298 K. A total of 16 scans were recorded and data were processed with TOPSPIN 3.0 software. The percentages of $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ and $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages in the α-glucans were calculated by integrating the corresponding anomeric proton signals, with an experimental uncertainty lower than 1% (Irague *et al.*, 2011, 2012).

3.5. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Coupled with Multi-angle Laser Light Scattering and Differential Refractometric Detection (AF4-MALLS-DRI)

Dextrans were solubilized at room temperature in DMSO under mild stirring during 4 hours. These solutions were diluted with water to obtain a final concentration of around 0.125 g L^{-1}. The sulfuric acid-orcinol method was used to determine carbohydrate concentrations. The AF4 instrument was constituted of an AF4 channel (275 mm-long), a spacer of 350 µm thickness and a regenerated cellulose membrane with a nominal cut-off of 10 kDa (Millipore, Bedford, MA, USA). The AF4 channel flow, cross flow, sample injection and focus flow were controlled with a Wyatt Eclipse AF4 flow chassis, a pump and an autosampler from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). The carrier used (Millipore water containing 0.2 g L^{-1} NaN_3) and the AF4 flow schedule were the same as previously described (Rolland-Sabaté, Guilois, Jaillais, & Colonna, 2011) except for a relaxation time of 5 min, the injection of 30 µL of dextran solution and a ramp of crossflow from 0.84 mL min^{-1} to 0.05 mL min^{-1} during 8 min. These analytic conditions were specially adjusted for these dextrans (see supplementary material, section S3). The AF4 instrument was coupled with two online detectors: a MALLS instrument (DAWN Heleos II) fitted with a K5 flow cell and a GaAs laser (λ = 663 nm), and a refractometric detector operating at the same wavelength (Optilab T-rEX) from Wyatt Technology (Santa Barbara, CA, USA).

The molar masses, the dispersity ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$), and the radius of gyration were determined with Wyatt ASTRA® software (v. 6.1.4.25) as previously described (Rolland-Sabaté, Guilois, Jaillais, & Colonna, 2011) excepted that ten angles were used (from 37.5 to 120.1°) for Berry extrapolation.

The refractive index increment dn/dc was 0.1461 mL g^{-1}, value classically used for glucans solubilized in water.

The hydrodynamic radius was determined using hydrodynamic radius versus elution volume calibration curves determined using monodisperse latex spheres sizing between 50 and 500 nm diameter (Duke scientific, Palo Alto, California, USA) as previously described (Rolland-Sabaté, Guilois, Jaillais, & Colonna, 2011).

3.6. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Droplets of 0.5 g L^{-1} dextran suspensions were deposited onto glow-discharged carbon-coated grids and negatively stained with 2 wt% uranyl acetate. The preparations were observed with a Philips CM200 microscope operating at 200 kV and the images were recorded with a TVIPS TemCam F216 digital camera.

3.7. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Dextran powders were equilibrated at 11, 43, 59, 75 and 97% relative humidity (RH) using different saturated salts (LiCl, K_2CO_3, NaBr, NaCl, K_2SO_4 solutions, respectively) for two weeks at 20 °C. Glass transition (T_g) temperatures were determined with a Q100 differential scanning calorimeter (TA Instruments, Guyancourt, France). The DSC instrument was calibrated with an indium standard. The analyses were made with 5-25 mg samples, using hermetically sealed stainless-steel pans for all measurements. An empty pan was used as a reference. The sample was first heated at 3 °C min^{-1} from −40 to 90 °C then cooled at 10 °C min^{-1} to –40 °C to suppress all thermal events due to thermal history. Then, the glass transition temperature was determined upon second heating from −40 to 200 °C at 3 °C min^{-1}. The T_g of dextrans was defined at the midpoint of heat capacity change during the second scan. The water content was determined after DSC measurement, directly on the pierced pan containing the sample, by thermogravimetric analysis (TGA) under nitrogen atmosphere using a TGA2050 instrument (TA Instruments, Guyancourt, France). The samples were heated at 5 °C min^{-1} from room temperature to 90 °C. Then, an isotherm was performed during 200 min.

3.8. Film Preparation by casting

Aqueous solutions (2 wt%) were prepared by dissolving freeze-dried dextrans in Millipore water at 20 °C by stirring during 4 h. Solutions were then degassed under vacuum during 2 h. 30 mL of aqueous solution were then deposited on a polycarbonate plate covered with a Teflon sheet and left at 40 °C

overnight. Before characterization, thin films of dextrans were equilibrated at 59% RH over a saturated NaBr solution during two weeks.

3.9. Dynamic Mechanical Analysis

The mechanical properties of the thin films were determined with a Dynamic Mechanical Analyser (DMA) (DMA 50, Metravib, France) with a humidity conditioning system. Strips were cut from each film for analysis. The film thickness was measured with a hand-held micrometer. The storage modulus (E') was measured at 20 °C from 10 to 80% RH using a homemade system based on the mix of dry and water-saturated air. Assays were repeated at least 4 times per film. The stationary force, dynamic deformation and frequency were 0.5 N, 0.01% and 1 Hz, respectively.

4. Results and discussion

By using a combination of sucrose polymerase (the DSR-OK dextransucrase) and of branching sucrases (either BRS-A or BRS-BΔ1), we produced a panel of engineered dextrans from sucrose, a low cost agroresource, as sole substrate. Their architecture was controlled by the specificity of the branching sucrase, the amount of glycosyl donor (sucrose) and acceptor (dextran D1-3B2) (Table 23). Five dextran structures were obtained, branching rates varying from 2 to 37 % for $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages and from 10 to 28 % for $\alpha(1\rightarrow2)$ linkages (Table 23). They were all partially water soluble, and DMSO appeared to be the best dissolving solvent (Supplementary material section S1). Residual synthesis constituents (up to 2.5% proteins) and by-products (up to 3.9% fructose, and lower amounts of glucose and leucrose) could not be completely eliminated during the purification steps and were present in each sample (Table 23).

Table 23 - Amounts of sucrose and dextran used to synthesize the α(1→2) and α(1→3)-branched dextrans, linkage ratio determined by ^{1}H-NMR spectroscopy and sample composition determined by HPAEC-PAD and protein assay. Nomenclature: for example, a dextran containing 10% α(1→2)-linkages is referred to as D1-2B10.

Sample name	D1-3B2	D1-3B5	D1-3B37	D1-2B10	D1-2B28
Sucrose (g L^{-1})		25	150	5	170
D1-3B2 (g L^{-1})		50	50	50	30
Branching sucrase		BRS-A	BRS-A	BRS-BΔ1	BRS-BΔ1
Amount of enzyme (U mL^{-1})		0.5	0.5	0.5	0.5
Reaction temperature (°C)		20	20	20	20
Linkage ratio (%)					
α(1→6)	98	95	63	88	70
α(1→3)	2	5	37	2	2
α(1→2)	0	0	0	10	28
% mass increase by branching	**0**	**3**	**56**	**11**	**40**
Amount of co-products (%)					
Fructose	3.9	0.0	2.5	0.7	3.9
Glucose	0.0	0.0	0.7	0.2	0.3
Leucrose	0.3	0.0	1.4	0.0	0.6
Proteins	0.3	2.0	2.5	0.7	0.5

4.1. Macromolecular Characteristics of Dextrans in Solution

The molar mass, macromolecular size distribution and conformation in solution were obtained using AF4-MALLS coupling. Elution recovery rates (percentages of macromolecules eluted through the AF4 channel) were between 83 and 98% (Table 24). The values were calculated as follows:

$$Elution\ recovery\ (\%) = \frac{C_G \times C_{nf}}{C_f}$$

where C_G is to the concentration of eluted glucan (determined by integration of the differential refractive index (DRI) signal), C_{nf} and C_f are the carbohydrate concentrations before and after filtration, respectively, determined using the sulfuric acid-orcinol colorimetric method.

This method was thus considered to ensure a representative structural characterization of the samples.

For every dextran, the hydrodynamic radius R_H distributions (Figure 61a and 39c) showed one broad population between 30 and 850 nm. The five size distributions were almost superimposed excepted for the quasi-linear dextran D1-3B2 that was smaller than the branched ones, and D1-2B28 which shifted towards the largest sizes. From the molar mass distributions, it was clear that the molar mass increased with the branching degree, as expected. The pattern of the molar mass increase with R_H (Figure 61a and 39c) depends on the branching degree and the branching type, probably because of the different conformations due to the different flexibility and hindrance introduced by either the $\alpha(1\rightarrow2)$ or the $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages. Indeed the loglog plots of hydrodynamic radius versus molar mass exhibited a linear behavior with a slope of 0.61 for D1-3B2 and D1-3B5 and 0.50 for D1-3B37 and D1-2B28. These values corresponded to random coiled conformations generally found for dextrans and their decrease when branching increase was in line with an increase of molecular density caused by branching (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008).

Table 24 - Solubilization recovery, weight and number average molar masses ($\bar{M}_w$,$\bar{M}_n$), dispersity ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$), z-average radius of gyration ($\bar{R}_{Gz}$), weight-average hydrodynamic radius ($\bar{R}_{Hw}$), apparent density ($\overline{d_{Gapp}}$) and increase in molar mass determined by AF4-MALLS.

Dextrans	Elution recovery[a] (%)	$\bar{M}_w$ [b] (× 10^{-9} g mol^{-1})	$\bar{M}_n$ [b] (× 10^{-9} g mol^{-1})	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$ [b]	$\bar{R}_{Gz}$ [c] (nm)	$\bar{R}_{Hw}$ [c] (nm)	$\overline{d_{Gapp}}$ (g m^{-3})	% increase in $\bar{M}_w$
D1-3B2	84	2.16	1.22	1.77	489	235	9530	-
D1-3B5	83	2.19	1.25	1.75	451	254	11664	1.4
D1-3B37	85	4.35	1.52	2.86	599	254	12631	101
D1-2B10	92	2.89	1.59	1.82	526	261	11089	34
D1-2B28	98	4.30	2.04	2.11	542	267	14172	99

The error on the values: [a]is lower than 1%, [b]is 15%, [c]is lower than 10%.

$\overline{M_w}$ and $\bar{R}_{Gz}$ values ranged from 2.16 × 10^9 to 4.35 × 10^9 g mol^{-1} for D1-3B2 and D1-3B37 respectively and from 451 to 599 nm for D1-3B5 and D1-3B37 respectively (Table 24). An increase of $\overline{M_w}$ and $\bar{R}_{Gz}$ was observed with branching. As D1-3B5 and D1-3B37 were obtained from D1-3B2 which has been branched by $\alpha(1\rightarrow3)$-linked glucosyl monomers to a final amount of 5 and 37%, an increase of 3 and 56% of the molar mass was expected, respectively (Table 23). Similarly, for D1-2B10 and D1-2B28, obtained from D1-3B2 branched by one glucosyl unit with $\alpha(1\rightarrow2)$ linkage, to a final $\alpha(1\rightarrow2)$ branching of 10 and 28% of monomers of the backbone, molar mass increases of 11 and 40% were expected, respectively (Table 23).

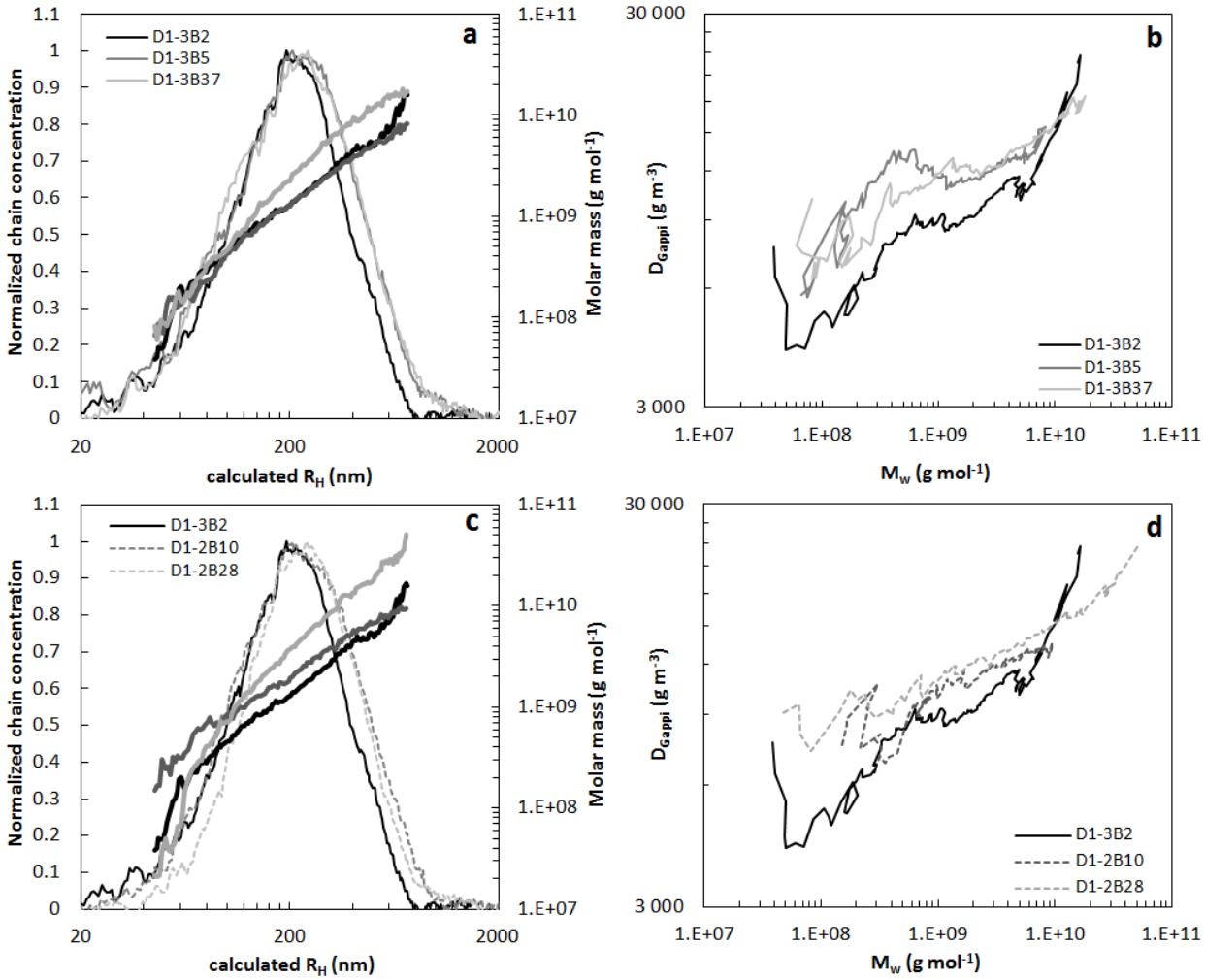


Figure 61 - a,c) Calculated hydrodynamic radius R_H distributions of dextrans obtained by AF4. The thin lines represent the DRI values and the thick lines represent the molar mass M_w; b,d) Plot of apparent particular density (D_{Gapp}) *vs* molar mass.

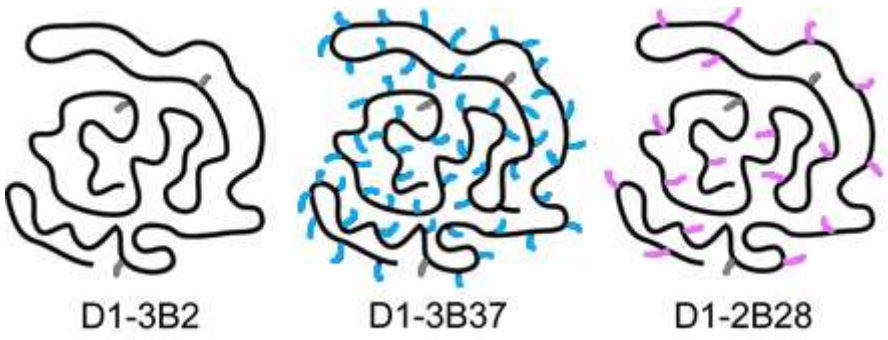


Figure 62 - Schematic representation of D1-3B2, D1-3B37 and D1-2B28 dextrans: short $\alpha(1\rightarrow3)$ branches are drawn in blue and $\alpha(1\rightarrow2)$ branches in pink.

The expected increase of molar masses from ^{1}H-NMR were calculated with equation (1):

$$\% \nearrow M_{w\,NMR} = \frac{\%\alpha(1\rightarrow6)_s \times 100}{\%\alpha(1\rightarrow6)_b} - 100 \quad (1)$$

where $\%\alpha(1 \rightarrow 6)_s$ and $\%\alpha(1 \rightarrow 6)_b$ are the respective percentages of α(1→6) linkages in the starting dextran (D1-3B2) and α(1→6) linkages in the branched dextran.

The molar mass increase measured by AF4-MALLS analysis (Table 24) was overestimated for the branched dextrans compared to the molar mass increase predicted from the ^{1}H-NMR data (Table 23), even if the values ranged in the same way. This could be due to the experimental bias putatively present in AF4-MALLS as discussed below and in the supplementary material (Sections S1, S2 and S3).

These molar masses and sizes were all very high compared to commercial dextrans (Ioan, Aberle, & Burchard, 2000b; Viebke & Williams, 2000; Rolland-Sabaté *et al.*, 2008, 2011; Maina *et al.*, 2014; Pitkanen & Striegel, 2015). These values were in agreement with data previously reported for the dextran synthesized by DSR-OK (Vuillemin *et al.*, 2015), but higher that those obtained from dextrans synthesized by engineered dextransucrases (Irague *et al.*, 2012).

The apparent particle density d_{Gappi} was calculated at each ith slice of the elugrams using the following equation:

$$d_{Gappi} = M_w/N_A(4\pi/3)\ {R_{Gwi}}^3 \quad (2)$$

with N_A the Avogadro number, M_{wi} the weight average molar mass and R_{Gwi} the weight average radius of gyration for the ith slice.

The average apparent particle density $\overline{d_{Gapp}}$ was from 9530 to 14172 g m^{-3} for D1-3B2 and D1-2B28 respectively (Table 24). Such low values are in agreement with d_{Gappi} values reported by Vuillemin *et al.* (2015) and classically found for weakly branched commercial dextrans (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008). Indeed, the chains may be considered as quasi-linear because they do not possess long branches, since the two branching enzymes used in this study are exo-acting enzymes only grafting glucosyl monomers on hydroxylated acceptors. An increase in apparent density was observed with increasing chain ramification (Table 24, Figure 61b and 39d). Yet, the d_{Gappi} increased with the molar mass which would correspond to an aggregated state. This would be in line with the evolution of R_{Gi}/R_{Hi} values which decreased from 2 to 1 across the peak (results not shown) suggesting a random coiled structure for low

molar masses (R_{Gi}/R_{Hi} = 1.5-2.1, Burchard, 1999) and a spherical and more dense one at the highest molar masses (R_{Gi}/R_{Hi} = 0.5-1.5, Burchard, 1999). These results were in line with the observations of Maina *et al.* (2014) who reported a higher propensity aggregation of dextrans to aggregate when their molar mass increased. Beside the aggregation propensity was also evidenced by transmittance and batch light scattering measurements and the nature of aggregates investigated (see supplementary material sections S1 and S2). Unfortunately, the extent of aggregation in these dextrans could not be assessed from these data as all the samples eluted in one peak. Consequently, one could make two hypotheses: (i) the elugram represented aggregated structures, (ii) aggregated and single molecular structures co-elute under the same peak.

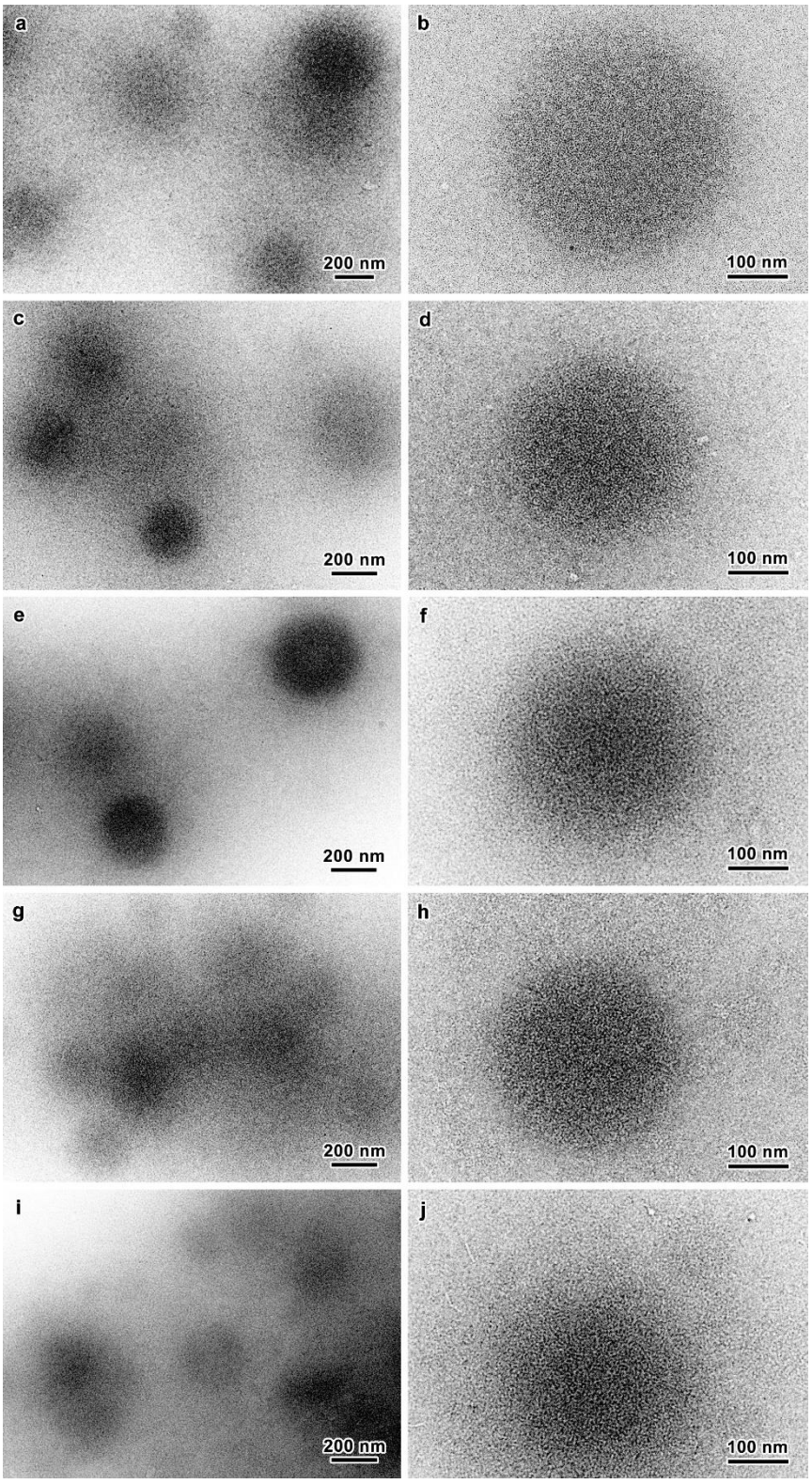


Figure 63 - TEM images of negatively stained preparations from D1-3B2 (a,b), D1-3B5 (c,d), D1-3B37 (e,f), D1-2B10 (g,h) and D1-2B28 (i,j) 0.5 g L^{-1} dextran solutions.

All dextran solutions were also observed by TEM after negative staining and drying (Figure 63). At low magnification, dark regions were observed that may correspond to dry macromolecular aggregates with apparent diameters between 100 nm and 1 µm. Considering the low density of the objects, the

diameter values have to be taken with care as the aggregates probably undergo both a flattening and a retraction upon drying. Nevertheless, the size range and the spherical shape are in agreement with what was measured with scattering techniques. For denser glucan particles, like glycogen, for instance (Grimaud *et al.*, 2013), the stain is generally excluded from the objects, outlining their contours and creating a negative contrast. Here, however, the stain was clearly preferentially absorbed by the molecular aggregates which resulted in the dark contrast, in agreement with the low apparent density determined from the AF4-MALLS data. No specific detail of the macromolecular organization could generally be observed at higher magnification (Figure 63) except for sample D1-2B28 for which a filamentous networks can be distinguished (Figure 63 h, j).

4.2. Glass Transition and Crystallization of Dextran Films

The water content of the different dextrans equilibrated at 59% RH is shown in Table 25. It was precisely determined by TGA after DSC analysis. The water content was between 11.8 and 14.1%, values which are comparable with those found for amylose, amylopectin and pullulans equilibrated at the same relative humidity (Bizot *et al.*, 1997). Typical DSC thermograms upon heating are shown in Figure 64a. A change of heat capacity corresponding to the glass transition was observed on all samples and T_g values are reported in Figure 64a with corresponding water content. Some thermograms presented an exothermic peak, between 110 and 140 °C (Figure 64a). This peak corresponds to a partial crystallization of the amorphous phase and was observed only for $\alpha(1\rightarrow3)$ branched dextrans. The crystal type determined by X-ray diffraction corresponds to the high temperature allomorph described by Chanzy *et al.* (1981) (Supplementary material, Fig. S1). The melting of the crystalline phase was not observed below the degradation of samples which occurred at about 200 °C. Conversely, $\alpha(1\rightarrow2)$ branching prevented any crystallization, even for the lowest branching degree of the D1-2B10 sample.

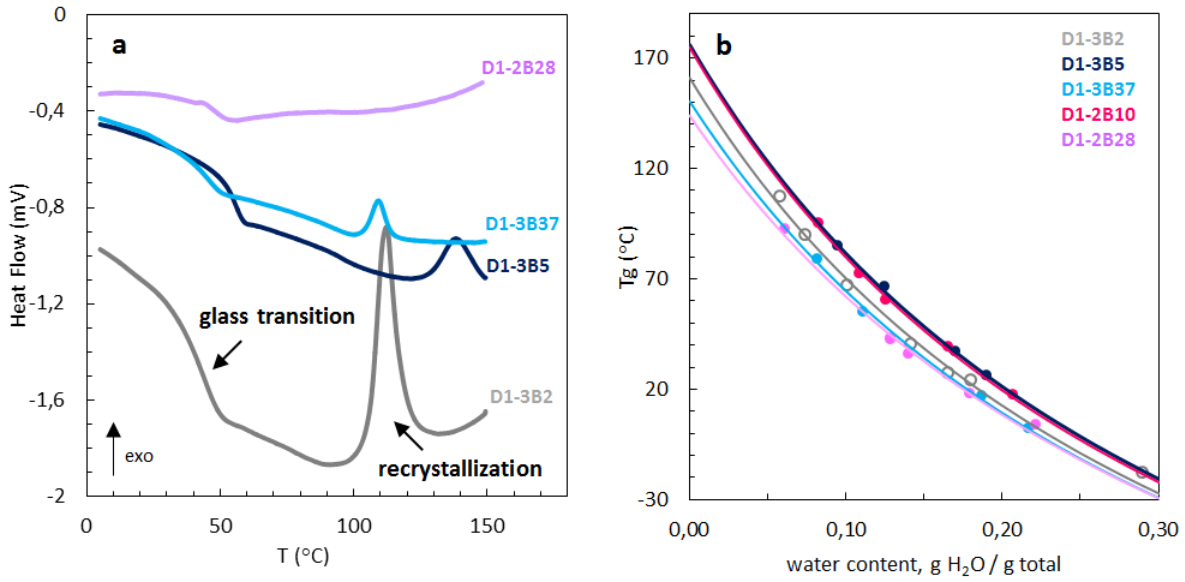


Figure 64 - a. Differential scanning calorimetry thermograms of the branched dextrans upon heating; b. calorimetric glass transition of dextrans vs water content.

Table 25 - Water content, glass transition temperature (T_g), recrystallization temperature (T_c) and recrystallization enthalpy ΔH_c of different dextrans.

	Experimental[a]				Fit[b]	
Sample	**Water Content** (%)	T_g (°C)	T_c (°C)	ΔH_c (J g^{-1})	T_g **dry** (°C)	k
D1-3B2	14.1	40.5	112.1	11.5	161.2	0.257
D1-3B5	12.2	63.2	143.4	4.5	176.1	0.260
D1-3B37	11.2	53.2	115.8	3.0	150.5	0.264
D1-2B10	12.5	60.6	-	-	174.9	0.257
D1-2B28	12.8	43.0	-	-	144.0	0.274

[a]The error on the experimental values is lower than 2%. [b]Calculated dry dextrans glass transition temperature and fitting parameters estimated for the heat capacity change of the pure dextran using Gordon Taylor's relation.

The T_g of dextrans was determined at different water contents (Figure 64b). An important decrease of T_g was observed with increasing water content, which corresponds to the classical plasticizing effect of water generally observed with α-glucans. The Gordon-Taylor equation (Gordon & Taylor, 1952) was used to fit experimental T_g of hydrated compounds (3).

$$T_{g\ (mixture)} = \frac{w_1 T_{g1} + k w_2 T_{g2}}{w_1 + k w_2} \quad (3)$$

where w_1 and w_2 are the respective weight fractions of dextran and water, T_{g1} is the T_g of anhydrous dextran, T_{g2} is the T_g of amorphous water which is taken at –138 °C (Sugisaki, Suga & Seki, 1968) and k is a constant related to the strength of dextran-water interaction.

The fit of experimental values of T_g of mixtures was performed using a non-linear least square curve fitting routine to determine both T_{g1} and k. The plots shown in Figure 64b which evidence the first order effect of water on the T_g of these high molar mass dextrans, were based on the best fitting parameters of the equation (3), which are reported in Figure 64. The k values were in the same order than the value of 0.25 found by Bizot *et al.* (1997) for commercial dextran with a molar mass of 5×10^5 g mol^{-1}. The T_g calculated for the dry linear dextran D1-3B2 was about 161 °C, which is significantly lower than the value of 175 °C predicted by Icoz *et al.* (2005) and the value of 189 °C predicted by Bizot *et al.* (1997) for a dry dextran with a molar mass of 5×10^5 g mol^{-1}. A potential effect of branching on dextran T_g, as suggested by Bizot *et al.* (1997) is less clear in the Figure 64b. It seems to show a highest T_g for a lower branching degree conversely to a lowest T_g for a higher branching degree, the T_g of linear chains being located in the middle. Interpretation of these results is subject to caution, as minor components such as fructose can have an impact on these properties.

4.3. Mechanical Properties of Films as a Function of Humidity

The casting technique allowed obtaining transparent and homogeneous thin films from aqueous solutions of all different dextrans. X-ray diffraction experiments (Supplementary material, Fig. S1) had shown that all films were completely amorphous. All the films formed with amorphous dextrans were rigid and brittle. At each humidity change, the modulus E' was measured after a few minutes of stabilization. The E' value corresponded to the average modulus measured at least of 5 specimens cut in the same films and the error bar correspond to the dispersion of data. The evolution of the storage modulus as a function of RH is shown in Figure 65. It was similar for all studied films. From 10 to 50 or 60% RH, a high modulus from about 2000 to 4000 MPa was typical of a glassy state at 20 °C. At higher humidity, depending on the type of sample, the dramatic drop of modulus was due to the proximity of the glass transition. The humidity at the beginning of this drop was about 50% for D1-3B37 and D1-2B28 about 80% for D1-3B5 and D1-2B10. This result means that a T_g at 20 °C was obtained for a lower water content for D1-3B37 and D1-2B28 than for D1-3B5 and D1-2B10. It is in perfect agreement with calorimetric results shown in Figure 64b. In the glassy state between 20 and 30

% RH, a small increase of the storage modulus was observed for all films. This could be due to a structural organization of bonds in the film that induces an increase of the rigidity at low water content. This increase of rigidity, also observed on other types of polysaccharides like starch, corresponds to the antiplasticization phenomenon (Lourdin, Bizot, & Colonna, 1997).

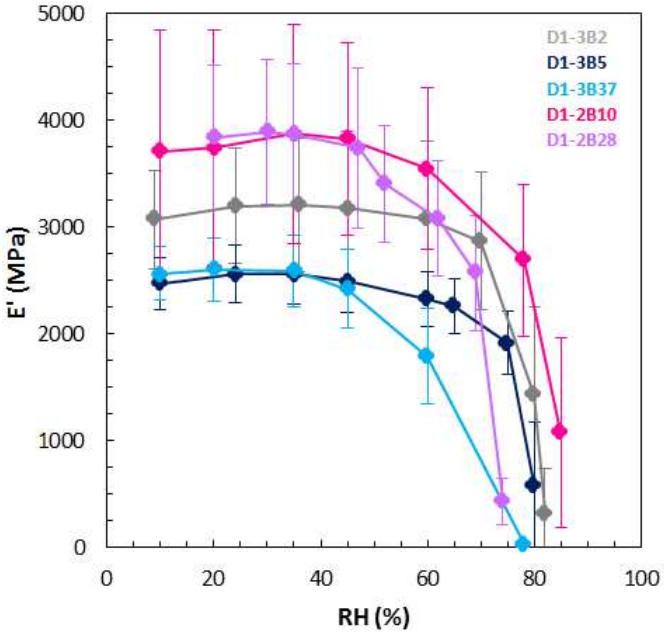


Figure 65 - Storage modulus (E') as a function of relative humidity (RH) for the different dextrans.

All the films showed an average modulus in the vitreous state between 2500 MPa (for D1-3B5 and D1-3B37) and 3800 MPa (for D1-2B10 and D1-2B28). D1-3B2 presented an intermediate storage modulus at 3000 MPa. It would seems that dextrans with $\alpha(1\rightarrow2)$ branching have been a greater modulus than dextrans with $\alpha(1\rightarrow3)$ branching. Taking account the large error bar, these results analysis have been taken with caution.

For comparison, the mechanical properties of cellulose, xyloglucan and potato starch films have been determined by the same method (unpublished results). The measured modulus at 50% humidity were in the same range than for dextrans. It has been determined at around 2500-2600 MPa for potato starch and xyloglucan and 3500 MPa for cellulose. The difference was the trend of modulus for β-glucans (cellulose and xyloglucan) which decreased continuously with humidity without dramatic drop as observed for dextrans and starch. This was probably due to the absence of clear glass transition for β-glucans.

5. Conclusion

This study shows that combinations of sucrose-acting polymerase and branching sucrases allow producing new dextrans with a specific branching architecture (type and branching degree). AF4-MALLS have been successfully applied to the determination of their molar mass and size distribution. The common characteristics of these newly designed dextrans are their huge apparent molar mass (higher than 10^9 g mol^{-1}) and their important radius of gyration (up to 600 nm). The size of the macromolecular aggregates observed in TEM images of dry preparations and that measured by AF4-MALLS are in the same order of magnitude. These very high size values could be partly due to the high propensity of these dextrans to aggregate. Indeed, the size remained high even in solvents known to disrupt H-bonds and hydrophobic interactions. This aggregation was thus highly stable. They are low density structures in H_2O/DMSO medium with apparent molar mass, dispersity and size that increase with increasing branching degree.

Despite their important propensity to aggregate, these high molar mass dextrans have very good film-forming ability from aqueous solutions. An innovative system of environmental dynamic mechanical analysis was used to determine their mechanical properties depending on ambient humidity. For the first time, the variation of the storage modulus of dextran films with humidity was measured. The modulus decreases with 50-60 % humidity which is very well correlated with the evolution of the glass transition temperature with water content. The effect of branching on the thermal and mechanical properties seemed to be limited. Indeed, the increasing of $\alpha(1\rightarrow3)$ branching decrease the ability of dextran to crystallize upon heating, while $\alpha(1\rightarrow2)$ totally prevented crystallization. The study of the properties of the semicrystalline materials is in progress.

6. Acknowledgements

The authors thank Xavier Falourd and Bruno Pontoire for their technical support, Luca Cipelletti for granting access to quasi-elastic light scattering equipment and the NanoBio-ICMG platform (Grenoble, FR 2607) for granting access to the electron microscopy facility. We also thank Sandra Pizzut-Serin, Laurence Tarquis, Sandrine Morel and Nelly Monties for dextran production, for assistance in NMR analysis and for technical assistance on HPAEC-PAD provided by the ICEO facility dedicated to enzyme discovery and characterization, part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA). The authors thank IFMAS (French Institute of Biobased Materials) for the

provision of the AF4-MALLS equipment. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant number ANR 14-CE27-0011-02).

7. Supplementary Data

7.1. Solubility Assay

The transmittance at 650 nm (*%T*) of solutions containing 0.5 g L^{-1} of these new dextrans was measured in order to determine the best solvent for their solubilization. Three solvents were tested: DMSO, H_2O and KOH. Transmittance values in DMSO were all higher than 94% (Table S1) accounting for a good solubilization in this solvent. On the opposite, the transmittance was generally the lowest in water varying from 81% for D1-3B5 to 89% for D1-3B37 and D1-2B28 (Table S1). Transmittance values lower than 95% accounted for the presence of micrometric particles that could correspond to large insoluble aggregates. Likewise, few very large particles (500 nm to 2 µm) have been evidenced by quasi-elastic light scattering measurements of all the dextrans solutions (results not shown). Aggregation is a common phenomenon in polysaccharide solutions caused by inter and intramolecular hydrogen bonding. DMSO is known to disrupt H-bonds and basic solvents such as 1 M KOH are used to hinder hydrophobic interactions.

Transmittance values significantly increased with the solvent pH for all the samples, which indicates aggregate breaking when hydrophobic interactions decrease. This was particularly clear for the highest branched dextrans (D1-3B37 and D1-2B28) for which the transmittance increased up to 100% in 1 M KOH. This increase in transmittance was due to the augmentation of -OH sites which in basic medium will be in the O^- form, which facilitates the interactions with water and thus decreases the hydrophobic interactions. This tendency was reversed in DMSO, in line with the lower number hydrogen bonds and more hydrophobic interactions in aggregates of branched dextrans. As expected, a decrease in transmittance was observed when water was added to DMSO. These aggregates could be formed due to hydrogen bonding mainly, as their size/amount decrease in DMSO. However, hydrophobic interactions probably play a more significant role when the branching degree is higher than 10%. In order to force solubilization, the samples were also heated at 45 and 80 °C in water and in DMSO. The transmittance was not improved by heating, and it even decreased (80 and 82 % in H_2O at 80 °C and DMSO at 80 °C, respectively, for D1-3B5). This could be explained by a decrease of H-bonds between dextran and solvent molecules, thus favoring the intermolecular association that produces a contraction of the coil as the temperature increase, as observed by Basedow *et al.* (1980) and Antoniou *et al.* (2010) (who showed that increasing the temperature from 20 to 40 °C, good solvent systems for dextrans moved toward θ conditions), and even a precipitation if the θ temperature is exceeded. Finally, these new

dextrans were soluble in all the tested solvents and DMSO generally appeared to be the best solvent for these dextrans, in line with previous studies which reported DMSO as a better solvent than water for other dextrans (Basedow *et al.*, 1980; Antoniou *et al.*, 2010; Antoniou & Tsianou, 2012; Maina *et al.*, 2014).

Table S1. UV-Vis transmittance values[a] (*%T*) at 650 nm of 0.5 g L^{-1} dextran solutions at 25 °C, in different solvents.

	D1-3B2	D1-3B5	D1-3B37	D1-2B10	D1-2B28
H_2O	86	81	89	82	89
KOH 0.1 M	97	87	89	85	92
KOH 1 M	100	92	100	94	100
DMSO	96	100	96	100	94
H_2O/DMSO	86	86	85	87	85

[a] The error on the experimental values is lower than 1%.

7.2. Digestion by the proteinase K (*Tritirachium album*)

In order to check for a potential crosslinking between single dextran chains caused by association with the enzyme that made the synthesis, D1-3B2 was submitted to digestion by the proteinase K from *Tritirachium album*, as previously described (Potocki-Véronèse *et al.*, 2005). The samples obtained before and after proteinase K digestion were analyzed by high performance size exclusion chromatography (HPSEC) in a solvent containing 0.45 M $NaNO_3$, and 1.0 % (v/v) ethylene glycol as previously described (Moulis *et al.*, 2006). The results clearly indicate that the dextran size was not affected by proteolysis, which means that no crosslinking involving the enzyme occurred in the media.

Macromolecular Characteristics of Dextrans in Solution

First of all, a methodological development was implemented to find the best conditions for sample fractionation. Different separation channels, linear crossflow methods and AF4 temperatures were tested. When the dextrans were solubilized in water, it was not possible to separate properly the samples despite the different methods tested, probably because of the presence of large aggregates in water (see previous section). DMSO was shown to be the best solvent to solubilize these dextrans. AF4, which provides reliable results for large macromolecules, cannot be used with pure DMSO because of fluidic incompatibilities. In addition, the very low dn/dc value in DMSO produces noisy refractometric and MALLS signals, hence no accurate molar masses. For these reasons, dextrans were first solubilized in

pure DMSO and then diluted 3 times before injection in the AF4-MALLS system operating with water containing 0.2 g L^{-1} NaN_3. This method gave the best results for these new dextrans.

Yet, the huge molar masses and radii obtained for these new dextrans (about 10^9 g mol^{-1} and between 30 and 850 nm, respectively) are questionable. Although the separation in an AF4 channel is effective for particles measuring several micrometers, the upper limit of the MALLS detector is approximatively 600 nm. A larger error is made when this limit is reached. Significant $\bar{R}_{Gz}$ values were then considered here only up to 600 nm. A slight deviation from the Rayleigh−Gans−Debye regime was observed at high angles and for the larger populations by plotting the scattering intensities versus scattering angle (results not shown). Moreover, fitting the data using the Lorentz-Mie theory produced very large deviations that were not acceptable. The Rayleigh−Gans−Debye approximation was then considered as the best one to extrapolate these data to zero angle, with the Berry formalism. The errors in molar mass and radius of gyration obtained using such approximation were estimated from the average error in the fitting procedure of the light scattered varying the angles used for the extrapolation to zero angle. They were estimated to be between 6 and 27% for the molar mass and 3 and 9% for the radius of gyration.

7.3. X-ray diffraction

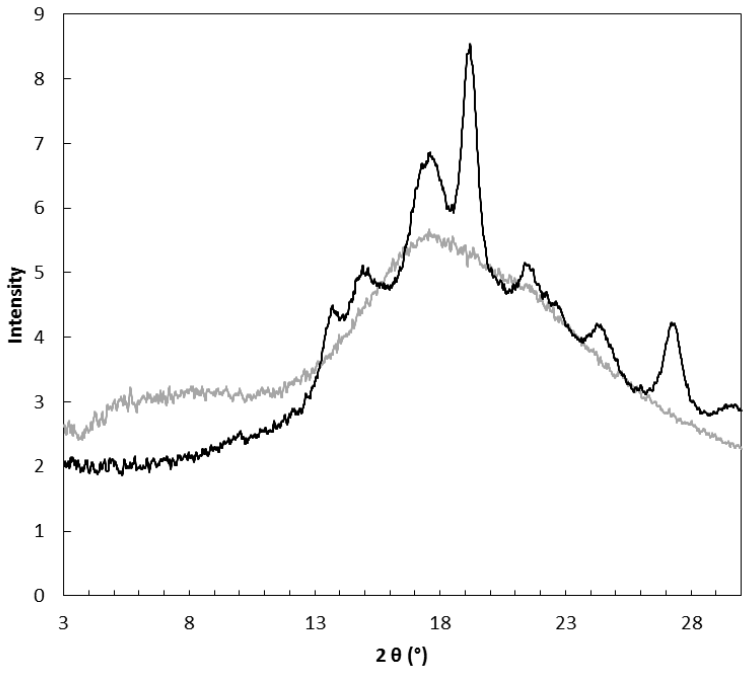


Fig. S1. X-ray diffraction profiles of native (grey line) and thermally-treated (black line) D1-3B2 dextran.

X-ray diffraction (XRD) was used to evaluate the crystallinity of the different dextrans as powders or films before and after thermal treatment. Dextrans with amounts of $\alpha(1\rightarrow3)$ or $\alpha(1\rightarrow2)$ linkages, ranging from 2 to 37%, were completely amorphous. The presence of branches, even at a small fraction, inhibited the crystallization of the macromolecule. The XRD profiles of all native dextrans were similar to that of D1-3B2 shown in Fig. S1 (grey line). An exothermic peak was observed on the DSC thermograms of all dextrans branched at the $\alpha(1\rightarrow3)$ position but not for those branched at the $\alpha(1\rightarrow2)$ position. The XRD profiles of thermally-treated dextrans branched at the $\alpha(1\rightarrow3)$ position (Fig. S1, black line) were compared with the data in the literature and corresponded to the high temperature allomorph described by Chanzy *et al.* (1981).

Résultats complémentaires à la publication 1

Un travail important de développement analytique a permis de montrer que l'AF4-MALLS-DRI est la technique la plus adaptée pour la détermination de la masse molaire de ces dextranes étant donné qu'il n'existe pas de colonnes chromatographiques HPSEC adaptées à la taille de ces échantillons. Nous pensions au départ que ces échantillons s'agrégeaient lors de l'analyse par AF4, ceci pouvant être causé par une phase d'introduction de l'échantillon dans le canal trop violente, notamment pendant l'étape de focalisation. Afin de limiter ces problèmes supposés, de nombreux paramètres ont été explorés pour obtenir le meilleur fractionnement possible des échantillons : utilisation d'un canal Frit-Inlet permettant une introduction de l'échantillon plus douce dans le canal sans étape de focalisation, augmentation de la température du canal de fractionnement à l'aide d'un four thermostaté… Ceci n'ayant pas abouti à des résultats concluants. Lorsque l'échantillon était injecté en concentration trop importante, des problèmes de surcharge (ou overloading, Wahlund, 2013) et d'élution entre un mode normal et un mode stérique ont été observés à cause de la grande taille de ces particules, l'échantillon n'était donc pas fractionné. Il en est de même lorsque le flux croisé appliqué était trop fort, une partie de l'échantillon pouvait se retrouver « collé » à la membrane, celui-ci ne sortant jamais du canal provoquant une caractérisation incomplète de l'échantillon. Afin de permettre le fractionnement de ces dextranes, la solution a été d'injecter l'échantillon en très faible quantité induisant un signal réfractométrique à la limite du bruit de fond et d'appliquer un flux croisé peu important.

En parallèle, et en raison de la grande difficulté à déterminer la taille de ces dextranes en solution, la diffusion de la lumière quasi-élastique (QELS) multi-angulaire est apparue comme une technique appropriée pour déterminer la taille et la distribution de tailles dans différents solvants et pour éventuellement s'affranchir des phénomènes d'agrégation. Des essais ont pu être réalisés avec cette technique au laboratoire Charles Coulomb de Montpellier (accueil Dr Luca Cippelleti) et font l'objet de la première partie.

Une étude rhéologique a également été réalisée sur ces dextranes afin d'observer un éventuel impact du type et du taux de branchement. Ces résultats sont décrits dans la première partie. Dans une seconde partie, l'impact de la présence de fructose sur les propriétés rhéologiques, thermiques et mécaniques est étudié.

1. Détermination de la taille des dextranes par QELS

Nous avons vu précédemment que ces dextranes étaient solubles dans les solvants testés ici (eau, DMSO, KOH 1M et 0,1M). Généralement, le DMSO semblait être le meilleur solvant pour les solubiliser. Des mesures de diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS) ont été réalisées sur les dextranes D1-3B2 et D1-3B37 dans différents solvants (eau, DMSO et NaOH 1M et 0,5M) et à différentes températures (25 et 45 °C) afin de déterminer le R_{Hz} à angle nul (R_{Hz0}). Ces valeurs de R_{Hz0} sont déterminées par extrapolation suivant le modèle de Zimm du coefficient de diffusion D_0 en fonction du vecteur d'onde q. Les résultats sont reportés dans le Tableau 26.

Tableau 26 - Valeurs de transmittance[a] (%T) à 650 nm et rayons hydrodynamiques $\bar{R}_{Hz0}$ obtenus par QELS de chaque dextrane à 25 °C et à 0,5 g.L^{-1} (ou 2 g.L^{-1} dans le DMSO).

	D1-3B2		D1-3B11	D1-3B50		D1-2B11	D1-2B30
	T(%)	$\bar{R}_{Hz0}$	T(%)	T(%)	$\bar{R}_{Hz0}$	T(%)	T(%)
H_2O (45 °C)	86 (89)	2790 (380)	81	89 (86)	3410 (815)	82	89
KOH 0,1M	97	n.d	87	89	n.d	85	92
KOH 1M	100	n.d	92	100	n.d	94	100
NaOH 1M (0.5M)	91	290 (1840)	n.d	91	1150	n.d	n.d
DMSO (45 °C)	96	810 (500)	100	96	1960 (1520)	100	94
H_2O/DMSO	86	n.d	86	85	n.d	87	85

[a] L'erreur sur les valeurs de transmittance est < 2%.

De très grosses particules ont été mises en évidence dans toutes les solutions de dextrane, même lorsqu'ils sont en solution dans le DMSO. Ceci étant compatible avec des structures agrégées. Il est important de noter que même si les mesures de QELS surestiment les tailles moyennes des dextranes (car la réponse des grosses particules est supérieure), ces très grosses particules ne sont pas présentes en grande proportions dans les solutions car la transmittance des solutions reste élevée et leur taille/quantité augmente avec la concentration de dextrane du fait de l'augmentation de liaisons H. Ces particules sont très grosses dans l'eau à 25 °C (> 2 µm), moins importantes dans l'eau chauffée à 45 °C (environ 380 nm pour D1-3B2), ce qui montre que ces interactions non covalentes (liaisons H principalement) sont détruites par chauffage. En utilisant du NaOH 0,5N, l'interaction hydrophobe est partiellement éliminée. Les valeurs de R_{Hz0} des dextranes sont effectivement diminuées après 1 h seulement de solubilisation dans NaOH 1M (afin d'éviter toute hydrolyse) (Tableau 26) après 1 h de solubilisation afin d'éviter toute hydrolyse, ce qui pourrait suggérer que ces agrégats sont également causés par des interactions hydrophobes.

Ces particules de dextranes sont très polydisperses et ce sont les agrégats qui sont majoritairement caractérisés par QELS. Ces particules de dextranes ne suivent pas les lois générales observées pour les

polymères (Trappe, 1997). Ainsi, pour le moment, cette technique a été mise de côté car il est nécessaire de faire un développement important notamment au niveau du traitement des données mais aussi des essais complémentaires doivent être menés afin de conclure quant aux R_{Hz} de ces dextranes, ces structures étant très complexes.

2. Comportement rhéologique des dextranes produits par l'enzyme DSR-OK

Les comportements viscoélastiques et d'écoulement de ces dextranes ont été investigués et comparés à ceux du dextrane commercial à 500 000 g.mol^{-1} produit par *Ln. mesenteroides* NRRL B-512 F. La Figure 66 montre que les valeurs de module conservatif (G') du dextrane D1-3B2 à 2% w/v avec une déformation de 2% sont supérieures aux valeurs de module dissipatif (G'') sur toute la gamme de fréquence. Une pente est observée pour G' en fonction de la fréquence et l'écart entre G' et G'' tend à se réduire aux faibles fréquences.

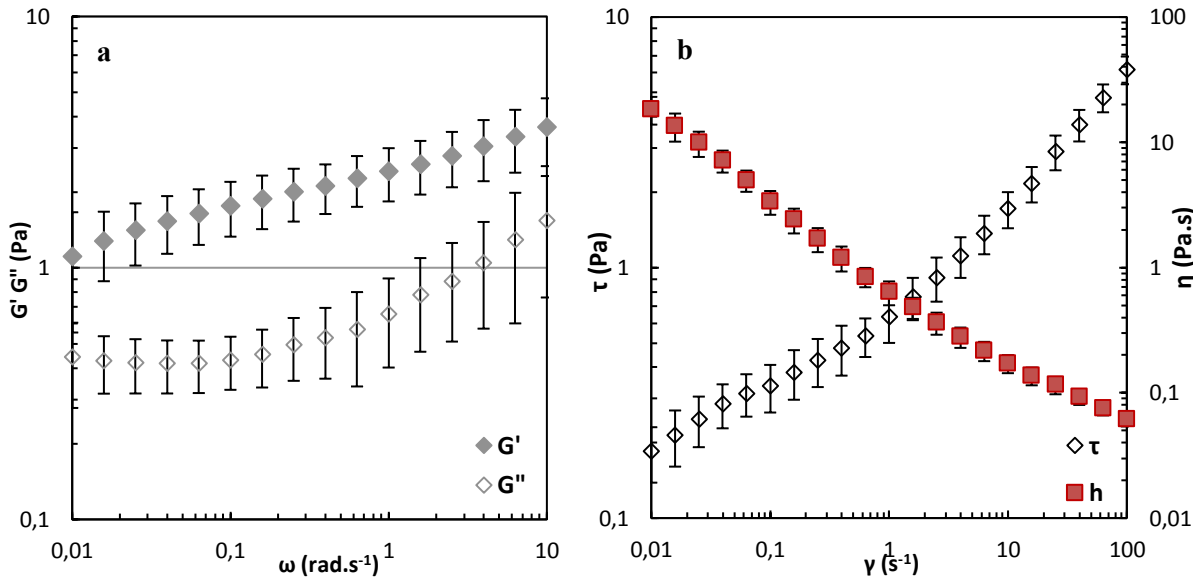


Figure 66 – Propriétés rhéologiques du dextrane D1-3B2 à 2% (p/v) a. Spectre mécanique présentant les modules conservatifs (G') et dissipatifs (G'') avec une déformation appliquée de 2%. **b.** Viscosité η et contrainte τ en fonction de la vitesse de cisaillement γ.

Sur cette gamme de fréquence, un comportement à dominante plutôt élastique, de type gel faible, est observé mais il est possible que sur des temps plus longs, il y ait un croisement entre G' et G''. Ces allures de courbes pour les dextranes produits avec l'enzyme DSR-OK ne correspondent pas à des solutions macromoléculaires classiques de dextrane (avec G' > G'' et des pentes de 1 et 2 respectivement). Ceci peut s'expliquer par des enchevêtrements entre les particules (comme le montrent les images de MET Figure 63). Il s'avère que les spectres mécaniques des 5 dextranes ont tous la même

allure, ce qui signifie que la structure et le type de branchement n'influent pas sur les modules conservatifs et dissipatifs. Concernant les mesures d'écoulements, tous les dextranes présentent aussi la même allure, seul le dextrane D1-3B2 est représenté Figure 66b pour des raisons de clarté. La viscosité η diminue et la contrainte τ augmente quand la vitesse de cisaillement γ augmente ce qui correspond à un comportement rhéo-fluidifiant (ou pseudoplastique). Il n'y a pas de contrainte seuil, ce qui signifie que l'échantillon coule sans qu'il n'y ait besoin d'appliquer une contrainte minimale. Ce type de comportement, souvent observé dans le cas des biopolymères, peut être attribué à des macromolécules entremêlées qui se séparent et s'alignent avec le champ de contrainte dans le sens de l'écoulement. Dans notre cas, ceci pourrait s'expliquer par une déformation des sphères et/ou par les désenchevêtrements des chaînes avec la contrainte.

L'effet de la concentration en dextrane sur les propriétés rhéologiques a aussi été étudié. La Figure 67a représente les spectres mécaniques du dextrane D1-2B10 à 4 concentrations : 1%, 2%, 5% et 10% (p/v). Dans les 4 cas, G' est supérieur à G'' et les valeurs de modules sont multipliées par 10 entre la solution à 1% et la solution à 2%.

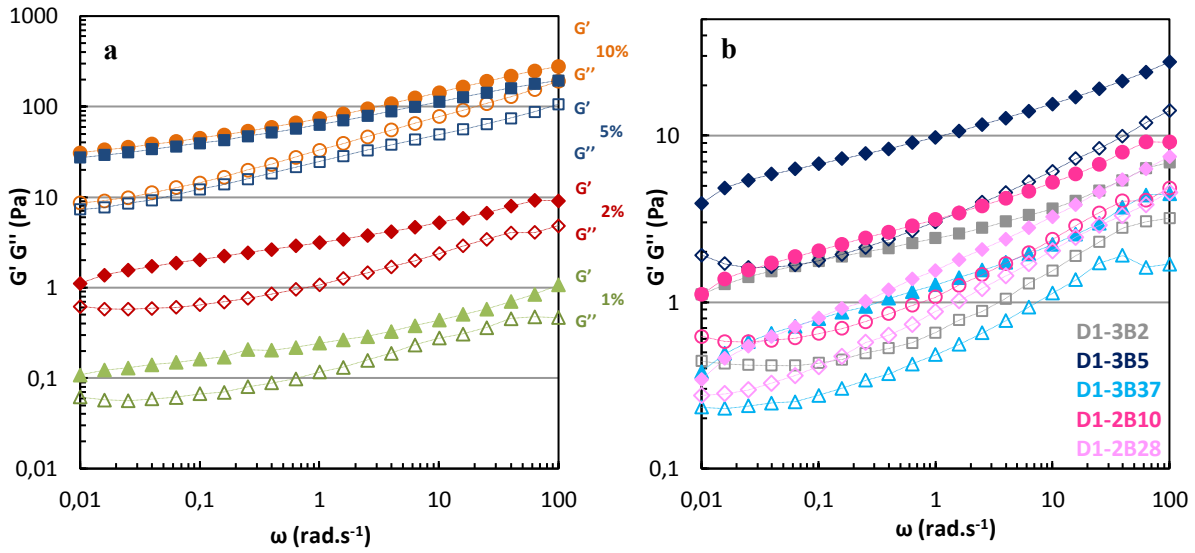


Figure 67 – Evolution des modules conservatifs G' et dissipatifs G'' en fonction de la fréquence ω, pour une déformation appliquée de 2%. a. Dextrane D1-2B10 à 1%, 2%, 5% et 10% (p/v), **b.** Dextranes D1-3B2, D1-3B5, D1-3B37, D1-2B10 et D1-2B28 à 2% (p/v).

Il apparaît que les modules G' et G'' sont superposés à une concentration de 5 ou 10%. Ceci pourrait s'expliquer par l'atteinte de la concentration d'enchevêtrement C^*_{RG} du système. Par ailleurs, cette concentration a été calculée à l'aide des grandeurs déterminées précédemment par AF4-MALLS-DRI grâce à l'équation suivante :

$$C^*_{RG} = \frac{\bar{M}_w}{N_A \times \frac{4\pi}{3} \times \bar{R}_G{}^3} \quad [15]$$

où C^*_{RG} est la concentration d'enchevêtrement en $g.L^{-1}$, $\bar{M}_w$ la masse molaire en $g.mol^{-1}$, le rayon de giration $\bar{R}_G$ en dm et N_A le nombre d'Avogadro.

Les valeurs de C^*_{RG} de chaque dextrane sont représentées dans le Tableau 27 ci-dessous.

Tableau 27 - Concentration C^*_{RG} des différents dextranes produits par l'enzyme DSR-OK.

C^*_{RG}	D1-3B2	D1-3B5	D1-3B37	D1-2B10	D1-2B28
en $g.L^{-1}$	7,32	9,46	8,02	7,87	10,7
en %	0,732	0,946	0,802	0,787	1,07

La concentration d'enchevêtrement C^*_{RG} semble atteinte lorsque la concentration en dextrane se situe entre 0,732 et 1,07 % pour D1-3B2 et D1-2B28 respectivement. Les essais rhéologiques ont donc été réalisés en régime semi-dilué avec $C > C^*_{RG}$ ce qui signifie que les chaînes s'interpénètrent pour former un réseau, ce qui peut expliquer ce comportement de gel faible étant donnée sur la gamme de fréquence étudiée, G' est toujours supérieur à G''.

Afin de mettre en évidence un potentiel effet du branchement sur les propriétés rhéologiques des dextranes, les spectres mécaniques de chaque dextrane à 2% (p/v) et à 2% de déformation sont superposés et représentés sur la Figure 67b. Les concentrations en sucres de chaque solution ont été déterminées par dosage à l'orcinol sulfurique donnant une concentration moyenne réelle de 1,7% (écart-type de 0,1). Des différences de valeurs de module de conservation G' et de module de perte G'' sont observées sur ces cinq échantillons sans remettre en cause d'éventuelles variations de concentration entre les différents échantillons. Le dextrane D1-3B5 est l'échantillon présentant les plus forts modules avec un module de conservation G' de 9,77 Pa contre 1,27 Pa pour le dextrane D1-3B37 à une fréquence de 1 $rad.s^{-1}$, presque 8 fois supérieur. Les échantillons possédant les plus faibles modules rhéologiques sont les dextranes D1-3B37 et D1-2B28. Les dextranes D1-3B2 et D1-2B10 possèdent des modules intermédiaires. Il est possible de tracer pour chaque échantillon le module G' aux différentes concentrations à une fréquence ω donnée. Cette représentation fait l'objet de la Figure 68 qui résume les observations de la Figure 67.

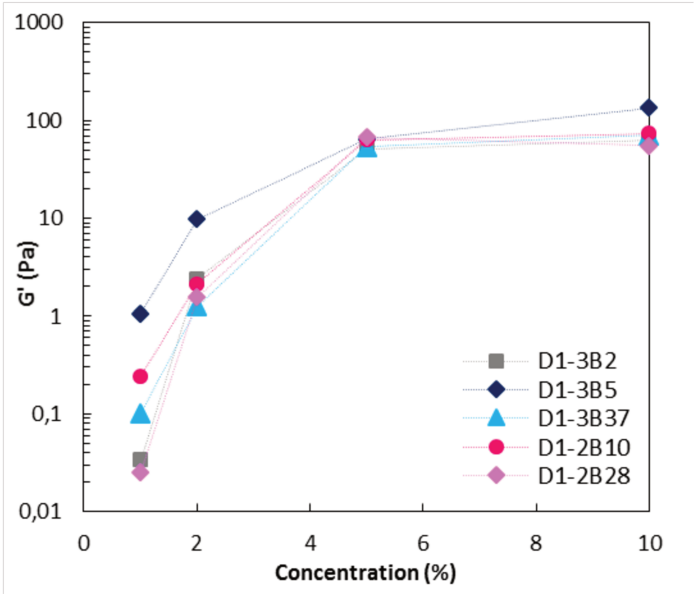


Figure 68 - Evolution des modules de conservation G' de chaque dextrane en fonction de la concentration à 1 rad.s^{-1}.

Elle montre que le fait de concentrer l'échantillon de 1% à 5% permet d'augmenter d'environ 100 à 1000 fois les modules rhéologiques G' et G'', donc de structurer l'échantillon en renforçant le réseau. De plus à 1% et 2%, les valeurs de module varient en fonction du dextrane, les dextranes pouvant être différenciés alors qu'à 5% et 10%, les valeurs de modules G' sont confondues ne permettant pas un lien avec la concentration d'enchevêtrement C*. Ceci peut s'expliquer par des erreurs dans les mesures de R_G avec le détecteur MALLS (valeurs de R_G hors gamme de détection).

A ce stade, nous pourrions conclure à un effet d'affaiblissement du réseau aux faibles concentrations (1% et 2%) lorsque le dextrane est fortement branché. Cependant, il apparaît important de déterminer l'impact des impuretés dans chaque échantillon sur les propriétés rhéologiques.

3. Impact du fructose sur les propriétés des dextranes

Les impuretés, à savoir, le fructose, le glucose, le leucrose et les protéines contenues dans chaque échantillon de dextrane sont pour la plupart présentes en quantité non négligeable. Celles-ci n'ont pas pu être éliminées pendant les étapes de précipitation. Ces petites molécules étaient certainement piégées à l'intérieur de la structure macromoléculaire. La Figure 69 montre la répartition de ces impuretés dans chaque échantillon. Elles représentent entre 1,6 % et 7,1 % en masse de l'échantillon total.

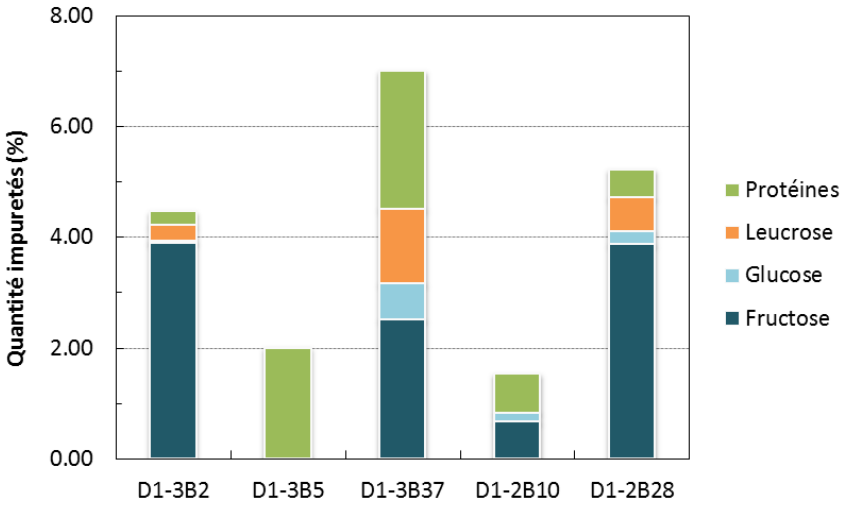


Figure 69 – Représentation graphique des proportions cumulées de chaque impureté (protéines, leucrose, glucose, fructose) présentes dans les échantillons.

Cette représentation montre que D1-3B5 et D1-2B10 sont les échantillons qui contiennent le moins d'impuretés alors qu'au contraire, D1-3B2, D1-3B37 et D1-2B28 sont ceux qui en contiennent le plus (> 4%). Pour évaluer l'impact des impuretés sur les propriétés rhéologiques, thermiques et mécaniques des dextranes, il a été décidé d'ajouter une quantité connue de fructose (2%, 4% et 8%) à l'échantillon ne contenant pas de fructose, le dextrane D1-3B5. Le fructose a été choisi comme une "référence" car il s'agit de l'impureté de synthèse majoritaire dans chaque dextrane.

2.1. Effet du fructose sur les propriétés rhéologiques

Une quantité connue de fructose (2%, 4% ou 8%) a été ajoutée à une solution de dextrane D1-3B5 à 1%. Les propriétés rhéologiques de ces solutions ont été déterminées et sont représentées dans la Figure 70.

La Figure 70a correspond aux modules conservatifs G' et dissipatifs G'' en fonction de la fréquence ω et montrent que G' est toujours supérieur à G''. Il est constaté que plus la solution contient du fructose, plus les modules G' et G'' diminuent pour une fréquence donnée. Ainsi, pour une fréquence de 1 $rad.s^{-1}$, la valeur de G' d'une solution de dextrane D1-3B5 à 1% ne contenant pas de fructose est de 0,81 Pa et chute à 0,11 Pa (soit plus de 7 fois inférieur) lorsque la solution contient 4% de fructose. Cette valeur n'a pas pu être déterminée pour une solution contenant 8% de fructose, le rhéomètre n'étant plus assez sensible. La valeur de tan δ (correspondant au rapport du module dissipatif G'' sur le module élastique G') est augmentée avec l'ajout du fructose montrant une augmentation du caractère visqueux de la solution. Le fructose semble perturber les interactions entre chaînes glucosidiques, il en résulte des propriétés viscoélastiques plus faibles.

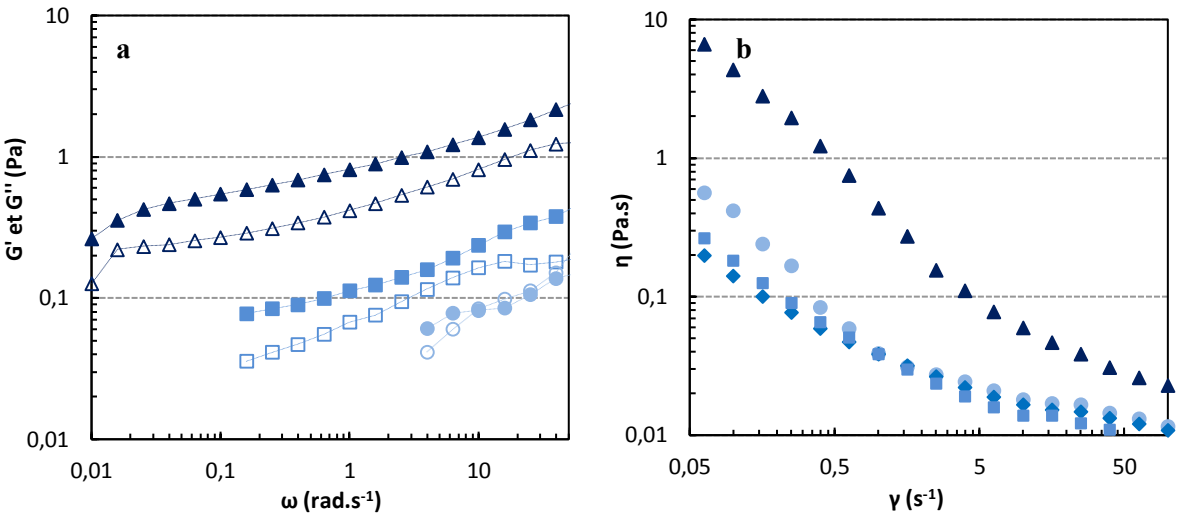


Figure 70 - Propriétés rhéologiques du dextrane D1-3B5 à 1% dans l'eau contenant du fructose à 0% (▲), 2% (♦), 4% (■) et 8% (●). a. Modules conservatifs G' (symbole plein) et dissipatifs G'' (symbole vide) en fonction de la fréquence ω. **b.** Viscosité η et contrainte τ en fonction de la vitesse de cisaillement γ.

Concernant la Figure 70b, elle représente l'écoulement en fonction de la vitesse de cisaillement. La viscosité η diminue quand la vitesse de cisaillement γ augmente ce qui correspond à un comportement rhéo-fluidifiant (ou pseudoplastique). Aussi, la viscosité diminue entre une solution ne contenant pas de fructose et celles qui en contiennent. Les courbes d'écoulement à 2%, 4% et 8% de fructose sont superposées ce qui signifie qu'un faible taux de fructose déstructure le réseau probablement en diminuant les interactions inter-moléculaires faisant diminuer la viscosité de la solution.

2.2. Effet du fructose sur les propriétés thermiques

Afin d'évaluer au mieux l'effet du fructose sur les propriétés thermiques du dextrane D1-3B5, le fructose a été ajouté en quantité connue dans la solution de dextrane de façon à obtenir un film par casting. Cette technique semble être la meilleure façon d'obtenir une répartition homogène du fructose dans une matrice solide. Les propriétés thermiques de ces films ont alors été déterminées et sont représentées sur la Figure 71 et la Figure 72.

La température de transition vitreuse étant toujours dépendante de la teneur en eau de l'échantillon, celle-ci a été déterminée par analyse thermogravimétrique sur l'échantillon ayant servi à faire l'analyse par DSC afin de pouvoir comparer ces résultats aux résultats précédemment obtenus.

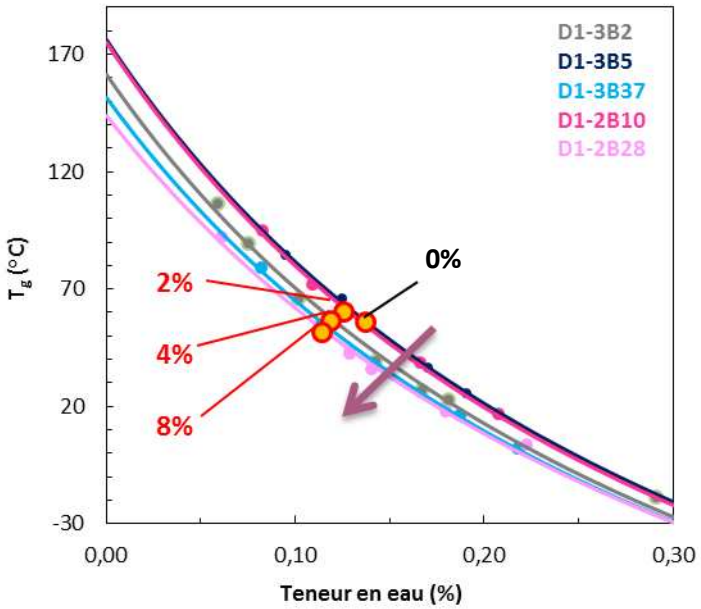


Figure 71 – Effet du pourcentage de fructose sur la température de transition vitreuse T_g de films de dextrane D1-3B5.

La Figure 71 montre que lorsque le dextrane D1-3B5 ne contient pas de fructose (0%), la température de transition vitreuse (T_g0% = 57 °C ; teneur en eau0% 13,6%) mesurée est bien superposée aux valeurs précédemment déterminées pour cet échantillon. Lorsque 2% de fructose sont présents dans l'échantillon, la température de transition vitreuse augmente légèrement et l'échantillon contient moins d'eau (T_{g2}% = 61,5 °C ; teneur en eau2% 12,5%) puis à 4 et 8% de fructose, la température de transition vitreuse diminue se superposant sur les courbes des dextranes contenant le plus de fructose, D1-3B37 et D1-2B10 (T_g4% = 57,7 °C ; teneur en eau4% 11,8% et T_g8% = 52,8 °C ; teneur en eau8% 11,3%). L'ajout de fructose a pour effet de diminuer la teneur en eau des films de dextrane. La T_g des films est une résultante de couple teneur en eau / teneur en fructose mais il semble que le fructose diminue la T_g. La Figure 71 montre clairement que les différences de température de transition vitreuse observées entre les 5 échantillons de dextranes branchés à différents types et taux de branchement sont principalement dues aux impuretés de synthèse présentes dans l'échantillon. Il n'y a donc pas d'impact du type et du taux de branchement sur la température de transition vitreuse. Aussi, ce dextrane D1-3B5 avait la propriété de recristalliser et les températures de recristallisation et l'enthalpie de recristallisation en fonction de la quantité de fructose et de la teneur en eau de l'échantillon sont reportées dans la Figure 72

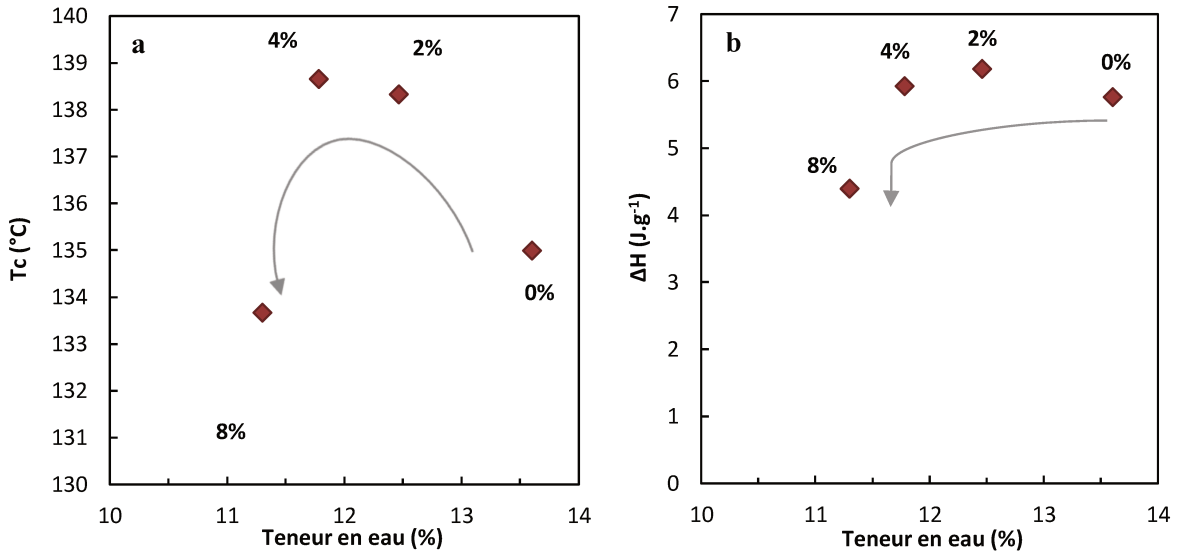


Figure 72 - Propriétés thermiques du dextrane D1-3B5 contenant du fructose à 0%, 2%, 4% et 8%. a. Température de recristallisation en fonction de la teneur en eau**. b.** Enthalpie de recristallisation en fonction de la teneur en eau.

La Figure 72a représente la température de recristallisation T_c en fonction de la teneur en eau du dextrane D1-3B5 à différents taux de fructose. Lorsque l'échantillon ne contient pas de fructose, la température de recristallisation est de $T_{c0\%}$ = 135 °C pour 13,6% d'eau. On observe que plus l'échantillon contient du fructose, moins il contient d'eau indiquant que le fructose diminue le volume libre disponible à l'eau. La température de recristallisation de l'échantillon à 2 et 4% de fructose augmente légèrement par rapport à l'échantillon n'en contenant pas ($T_{c2\%}$ = 138,3 °C ; teneur en eau 12,5% et $T_{c4\%}$ = 138,7 °C ; teneur en eau 11,8%) puis à 8% de fructose, la température de recristallisation diminue ensuite légèrement ($T_{c8\%}$ = 133,7 °C ; teneur en eau 11,3%). La Figure 72b montre que l'enthalpie de recristallisation se trouve affectée à partir d'une certaine quantité de fructose dans l'échantillon. Entre 4 et 8%, l'enthalpie diminue indiquant que l'échantillon est moins apte à recristalliser, le fructose venant gêner l'organisation des chaînes linéaires du polymère.

2.3. Effet du fructose sur les propriétés mécaniques

Des films de dextranes D1-3B5 contenant des quantités connues de fructose (0%, 2%, 4% et 8%) ont été préparées par casting à 40 °C d'une solution à 2% en dextrane dans le but de déterminer l'impact du fructose sur leurs propriétés mécaniques. Les modules d'Young des différents films sont représentés sur la Figure 73 ci-dessous.

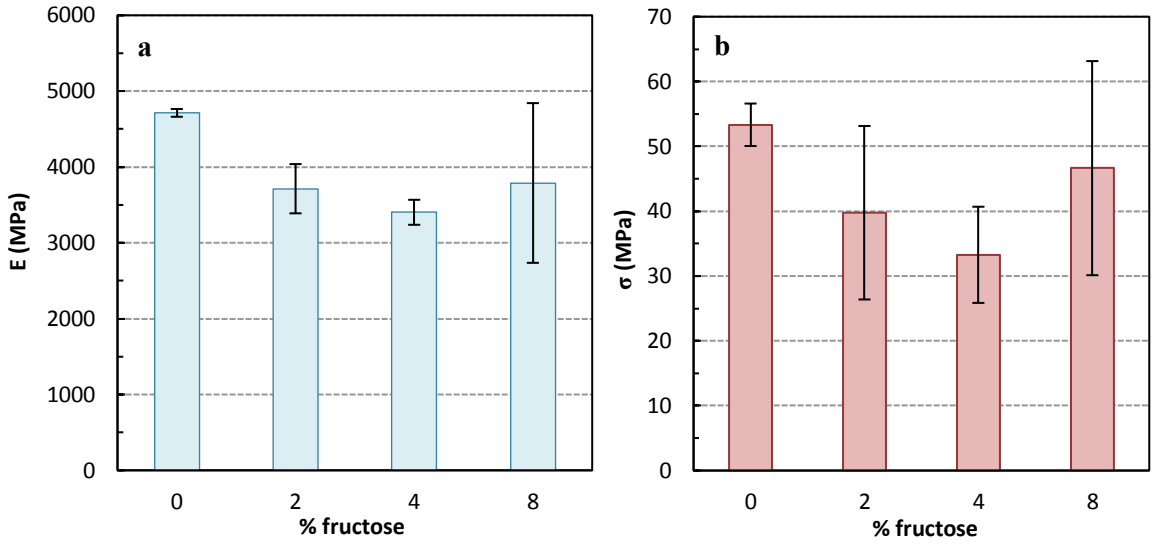


Figure 73 - Propriétés mécaniques de films de dextrane D1-3B5 obtenus par casting contenant du fructose à 0%, 2%, 4% et 8%. a. Evolution du module d'Young E en fonction du taux de fructose**. b.** Evolution de la contrainte à la rupture σ en fonction du taux de fructose.

Le module d'Young E du film de dextrane D1-3B5 ne contenant pas de fructose est de 4713 MPa ± 51 MPa. Lorsque le dextrane D1-3B5 en contient 4%, la valeur de module chute alors à 3403 MPa ± 165 MPa. Le module d'Young est alors diminué de 30% par rapport à l'échantillon n'en contenant pas. Il en est de même pour la contrainte à la rupture σ et l'allongement à la rupture.

La diminution des propriétés mécaniques pourrait être dû à un effet d'antiplastification de la même façon que ce qui a été observé sur le système amidon/glycérol (Lourdin *et al.*, 1997). Un tel effet pourrait être montré par l'étude des relaxations basses températures. Dans tous les cas, l'augmentation importante de l'écart-type avec lorsque la quantité de fructose dans le film augmente doit être prise en compte. Elle pourrait être due à une distribution hétérogène du fructose dans le film.

Conclusion

Cette étude a montré qu'il était possible d'obtenir des dextranes de très hautes masses molaires à l'aide de la dextrane-saccharase DSR-OK. L'architecture de ces dextranes peut être modulée grâce à deux enzymes recombinantes permettant le branchement d'unité glucose en position $\alpha(1\rightarrow3)$ et/ou $\alpha(1\rightarrow2)$. Des masses molaires allant de 10^8 g.mol^{-1} à > 10^{10} g.mol^{-1} avec des rayons de giration moyens allant de 451 nm à 599 nm ont été recensées pour ces dextranes. C'est la première fois que des polysaccharides aussi gros ont été caractérisés de cette façon. Le branchement de ces dextranes a été mis en évidence par l'augmentation de la masse molaire par rapport à celle du produit de départ. Cependant des différences ont été observées entre les pourcentages d'augmentations de masses molaires calculés à partir des résultats par RMN ^{1}H et par AF4-MALLS-DRI pouvant s'expliquer par l'agrégation de l'échantillon. Ces agrégats de dextranes était très stable puisque la solubilisation de ceux-ci dans des solvants connus pour diminuer les interactions par liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes n'ont pas permis de les détruire. Les images TEM ont montré une concordance des tailles mesurées avec celles déterminées par AF4-MALLS. L'effet du branchement de ces dextranes n'a pas pu être observé sur les densités moléculaires dû à l'état agrégé des molécules mais ces valeurs se sont trouvées en accord avec les densités de dextranes déterminées précédemment (Vuillemin *et al*., 2015 ; Rolland-Sabaté *et al*., 2008) ainsi qu'avec les images de TEM montrant que le colorant n'était pas exclu de la particule indiquant une densité faible des dextranes.

Ces dextranes étaient tous amorphes dans leur état d'obtention du fait de la présence d'un taux de branchement d'au moins 2% dans chaque échantillon empêchant l'organisation des chaînes. En revanche une cristallinité après traitement thermique correspondant au polymorphe haute température décrit par Chanzy *et al*., (1981) a été observé seulement lorsque le dextrane comportait des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$. Cette recristallisation n'a pas été observée pour les dextranes branchés en $\alpha(1\rightarrow2)$ sans qu'il n'y ait d'explication. La modélisation moléculaire aurait peut-être permis de répondre à cette question. Les températures de transition vitreuse de ces cinq dextranes étaient légèrement différentes (~60 °C pour 12% d'eau) pouvant s'expliquer par un éventuel effet des branchements. Une étude a montré par la suite

que la présence d'impuretés de synthèse, n'ayant pas pu être éliminé totalement pendant les étapes de précipitation et de purification, avait une forte influence sur les propriétés thermiques de ces dextranes. Etant donné qu'ils en contiennent en quantité différentes, il est compliqué voire impossible de conclure sur un effet du branchement sur les propriétés thermiques. Afin de mettre en évidence l'implication éventuelle des divers branchements sur les propriétés mécaniques, des films de dextranes ont été obtenus par casting. Une mise au point a été réalisée pour l'obtention de films homogènes. Les films ont été souvent obtenus avec des bulles d'air, les gaz dissous étant piégés par les chaînes macromoléculaires dans la solution. Une mise sous vide de la solution a permis de les éliminer. Les propriétés mécaniques ont été déterminées à l'aide d'un appareil d'analyse mécanique dynamique contrôlé en humidité. Les polysaccharides étant très sensible à l'eau, il est important de bien contrôler l'hygrométrie au moment de l'analyse. Aucune analyse de films de dextrane n'avait été réalisée avec cette technique. Nous avons montré une corrélation entre les chutes de modules des dextranes aux alentours de 50-60% d'humidité relative avec les valeurs de température de transition vitreuse mesurées. Aussi, malgré l'importance de la dispersion des données, il semble y avoir une influence de la position de branchement ($\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow2)$) sur les valeurs de modules. Les modules $E_{\alpha(1\rightarrow3)} < E_{\alpha(1\rightarrow2)}$ ainsi les liaisons en $\alpha(1\rightarrow2)$ pourraient apporter de la rigidité aux matériaux. Ceci est toujours à prendre avec précaution étant donnée l'impact qu'a eu la présence des impuretés de synthèse sur les propriétés physiques des dextranes.

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DE DEXTRANES COMMERCIAUX BRANCHES A L'AIDE D'ENZYMES SPECIFIQUES

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de l'apport de branchement sur un dextrane commercial ayant une masse molaire de 500 000 g.mol^{-1} (D500) sur les propriétés en solution et sur les propriétés physiques de films et de fils. Cinq dextranes branchés ont été synthétisés par le LISBP de Toulouse à partir du dextrane commercial D500 à l'aide d'enzymes de branchement spécifiques (BRS-A et BRS-BΔ1 *cf. Chapitre 3*). Ils ont été obtenus avec différents types de branchement (α(1→2) ou α(1→3)) et à différents taux de branchement (8 à 32%). Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 28.

Tableau 28 - Caractéristiques des dextranes branchés et teneurs en impuretés de synthèse.

Echantillon	Enzyme de branchement	RMN ^{1}H[a]			Impuretés de synthèse[a]			
		α(1→6)	α(1→3)	α(1→2)	Fructose (%)	Glucose (%)	Leucrose (%)	Protéines (%)
D500		96	4	0	-	-	-	-
D500-3B8	BRS-A	92	8	0	0,00	0,00	0,00	0,21
D500-3B21	BRS-A	79	21	0	0,49	0,45	0,00	0,29
D500-2B8	BRS-BΔ1	88	4	8	0,46	0,42	0,00	0,48
D500-2B19	BRS-BΔ1	77	4	19	0,00	0,50	0,00	0,17
D500-2B32	BRS-BΔ1	64	4	32	0,56	0,65	0,22	0,36

[a] déterminé comme Faucard *et al*., (2018).

Ce travail a été réalisé en parallèle des résultats décrits dans le *Chapitre 3*. Dans un premier temps, et dans une démarche de comparaison de ces dextranes aux dextranes du chapitre précédent, leurs structures macromoléculaires ont été investiguées par AF4-MALLS-DRI et par microscopie électronique. Les propriétés thermiques ont été investiguées par calorimétrie différentielle à balayage ainsi que par thermogravimétrie. Il a été montré dans une étude antérieure (Frampton *et al.*, 2015) que le dextrane commercial de 500 000 g.mol^{-1} pouvaient être filé à partir de solutions visqueuses. Des essais ont été réalisés en ce sens en vue de déterminer les propriétés mécaniques des dextranes branchés et de faire de l'orientation moléculaire. Ces dextranes ont également été mis en forme sous forme de film par casting et sous forme de barreaux par thermomoulage. Une comparaison des propriétés mécaniques de ces trois formes sera présentée. Il est important de remarquer qu'une très faible quantité d'impuretés de synthèse (entre 0,21 et 1,79%) sont présentes dans ces échantillons, comparativement aux dextranes précédents qui en contenaient généralement de 2 à 8%.

2. Structure macromoléculaire

Les analyses de ces dextranes par couplage flux-force hydrodynamique dans un canal asymétrique couplé à un détecteur UV, à la diffusion de la lumière multi-angulaire et à un réfractomètre (AF4-UV-MALLS-DRI) ont été réalisées sur les échantillons lyophilisés et les milieux de synthèse provenant du LISBP à Toulouse ainsi que sur le dextrane commercial de départ. Les rendements de solubilisation et d'élution sont de 100% (Tableau 29), ce qui confirme que tout l'échantillon est analysé et qu'il n'y a pas de phénomène de rétention sur la membrane contrairement à ce que l'on observe pour les dextranes produits par l'enzyme DSR-OK (*Chapitre 3*) pour lesquels il y avait une légère perte d'échantillon (Table 24).

Tableau 29 - Caractéristiques macromoléculaires des dextranes commercial et branchés.

	RMN ^{1}H			AF4-UV-MALLS-DRI		
Echantillon	% Liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$	% Liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$	% Liaisons $\alpha(1\rightarrow2)$	Rdt $_{\text{solubilisation et élution}}$ (%)	$\bar{M}_w$ x 10^5 (g.mol^{-1})	Dispersité ($\bar{M}_w$ / $\bar{M}_n$)
D500	96	4	0	100	4,95	3,93
D500-3B8	92	8	0	100	5,27	3,81
D500-3B21	79	21	0	100	5,70	3,56
D500-2B8	88	4	8	100	5,16	3,84
D500-2B19	77	4	19	100	5,80	3,75
D500-2B32	64	4	32	100	6,73	3,63

Les fractogrammes présentent tous la même allure générale avec un pic majoritaire éluant autour de 16 mL muni d'un épaulement à 24 mL (Figure 74). On observe sur le signal de diffusion de la lumière (non représenté) un pic éluant à 28 mL signant la présence d'une petite quantité d'agrégats. Les $\bar{M}_w$ des échantillons s'étendent de 3.10^4 g.mol^{-1} à 1.10^7 g.mol^{-1} et ont été moyennées sur la totalité du pic (Tableau 29). Les rayons de giration s'étendent de quelques nanomètres à 50 nm (Figure 74c), cependant au-dessous de 10 nm ils ne sont pas mesurables par MALLS, ce qui explique que leur valeur moyenne ne soit pas reportée dans le tableau ci-dessus. La comparaison du signal de diffusion de la lumière à 90° (LS90) et du signal réfractométrique (DRI) montre que l'échantillon est constitué d'une petite proportion de petits dextranes (35%) entre 10 et 17 mL et d'une plus grande proportion de gros dextranes (65%) (rayons de giration > 10 nm) entre 17 et 27 mL. Lorsque le dextrane est fortement branché, les signaux LS90 et DRI se déplacent vers de plus grands volumes d'élution (Figure 74a, b), ce qui correspond à

une augmentation de volume hydrodynamique, le volume d'élution étant directement proportionnel à la taille en AF4. Ce déplacement augmente avec le degré de branchement, de même que la proportion de macromolécules de rayons de giration > 10 nm. En accord avec cette observation, les distributions de masses molaires montrent une légère augmentation des masses molaires avec le taux de branchement (Figure 74a, b), cette augmentation étant plus importante pour les dextranes branchés en $\alpha(1\rightarrow2)$ que pour les dextranes branchés en $\alpha(1\rightarrow3)$, ce qui traduirait une augmentation de densité moléculaire plus importante pour les dextranes branchés en $\alpha(1\rightarrow2)$.

La densité moléculaire apparente d_{Gapp} de ces dextranes a été calculée pour chaque volume d'élution et représentée en fonction de leur masse molaire (Figure 74d), à cause de l'erreur faite sur le rayon de giration, les valeurs de celle-ci ne peuvent cependant pas être prises en compte pour des volumes d'élution inférieurs à 18 mL et donc des masses molaires correspondantes inférieures à 3.10^5 g.mol^{-1} (Figure 74a, b, c). Cette densité moléculaire apparente d_{Gapp} est 3 et 7 fois supérieure à celle des dextranes produits par l'enzyme DSR-OK du chapitre précédent. Il est important de remarquer qu'elle diminue avec la masse molaire, comme c'est le cas pour les polymères solubles flexibles (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008) et augmente légèrement pour des masses molaires supérieures à 2.10^6 g.mol^{-1} (Figure 74e), ce qui suggère une modification de structure, en accord avec l'observation de faibles agrégats sur le signal LS90 à 28 mL. Pour des masses molaires < 2.10^6 g.mol^{-1}, la valeur de ν_G pour chaque dextrane est comprise entre 0,45 et 0,50 (pelote statistique) et pour des masses molaires > 2.10^6 g.mol^{-1}, la valeur de ν_G évolue pour atteindre 0,33 (sphère compacte) en accord avec les résultats obtenus par Rolland-Sabaté *et al*. (2008). Lorsque l'on compare les valeurs de densité obtenues pour les dextranes branchés à celle du dextrane commercial, on observe, sur la zone des masses molaires inférieures à 2.10^6 g.mol^{-1}, que les dextranes branchés en position $\alpha(1\rightarrow3)$ ont une densité moléculaire apparente légèrement inférieure à celle du dextrane commercial D500 alors que les dextranes branchés en position $\alpha(1\rightarrow2)$ ont une densité apparente supérieure à celle du dextrane commercial D500. Nous pouvons envisager que la conformation dans l'espace des branchements d'unité glucose en position $\alpha(1\rightarrow2)$ sur un dextrane permettrait à la molécule d'être plus compacte en solution alors que des branchements en position $\alpha(1\rightarrow3)$ apporteraient de la gêne stérique et ainsi une structure légèrement moins dense. Ceci pourrait aussi s'expliquer par une hétérogénéité de répartition des branchements le long de la chaîne d'un dextrane branché en $\alpha(1\rightarrow3)$ par rapport à un dextrane branché en $\alpha(1\rightarrow2)$, entraînant une conformation des chaînes différente. Nous remarquons aussi qu'à M_w > 2.10^6 g.mol^{-1}, il n'est plus possible de différencier chaque dextrane de cette manière, leurs densités moléculaires apparentes étant semblables (comme pour le cas des dextranes de DSR-OK du *Chapitre 3*).

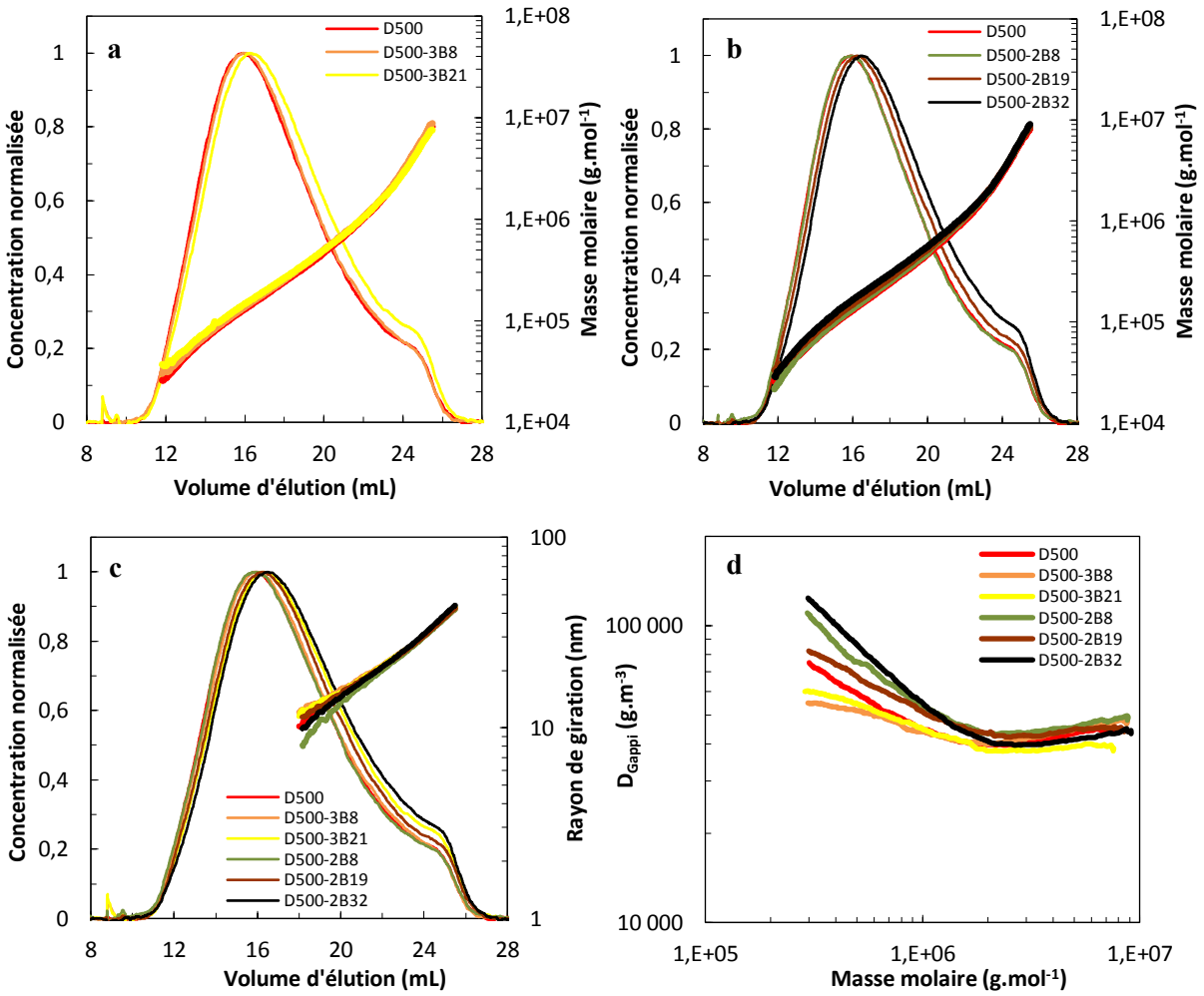


Figure 74 - Elugrammes, masses molaires, rayons de giration et densités moléculaires des dextranes commercial et branchés. a. Dextranes branchés en position $\alpha(1\rightarrow3)$, signal DRI (trait fin) et masse molaire (trait épais), **b.** dextranes branchés en position $\alpha(1\rightarrow2)$, **s**ignal DRI (trait fin) et masse molaire (trait épais), **c.** dextranes branchés, signal DRI (trait fin) et rayon de giration (trait épais), **d.** densités moléculaires apparentes d_{Gapp} des dextranes en fonction de la masse molaire.

Il est possible de calculer le pourcentage d'augmentation de masse molaire pour chaque dextrane branché par rapport au dextrane commercial D500 (Tableau 30) en utilisant les pourcentages de branchement déterminés à partir de données de RMN ^{1}H d'une part et d'autre part, à partir des masses molaires déterminées par AF4-MALLS-DRI respectivement suivant les équations ci-après.

Pour expliquer l'équation [55], on considère un exemple simple avec le dextrane D500 de départ et le dextrane D500-3B8 d'arrivée. Le dextrane D500 de masse molaire M_1 comporte 96% de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et 4% de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$. La masse des unités glucoses liées en $\alpha(1\rightarrow6)$ est donc $M_1 \times 0{,}96$. Après l'action de l'enzyme de branchement spécifique du branchement d'une unité glucose en position $\alpha(1\rightarrow3)$ sur ce dextrane, on obtient le dextrane D500-3B8 de masse molaire M_2 comportant 92% de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et 8% de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$. La masse des unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow6)$ est $M_2 \times 0{,}92$.

Cependant, la masse des unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow6)$ entre ces deux dextranes est la même. Par conséquent $M_1 \times 0{,}96 = M_2 \times 0{,}92$. On en déduit que le coefficient multiplicateur CM = M_2/M_1 de cette augmentation de masse molaire est égal à 0,96 / 0,92. Cet exemple se généralise à la formule suivante :

$$\% \nearrow M_{w\,RMN} = \frac{\%\alpha(1\rightarrow6)_{D500}\times100}{\%\alpha(1\rightarrow6)_{br}} - 100$$

$$\% \nearrow M_{w\,A4F} = \frac{\bar{M}_{w\,br} - \bar{M}_{w\,D500}}{\bar{M}_{w\,D500}} \times 100 \qquad [56]$$

[55]

avec $\%\alpha(1\rightarrow6)_{D500}$ le pourcentage de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ du dextrane commercial de départ D500, $\%\alpha(1\rightarrow6)_b$ le pourcentage de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ du dextrane branché considéré, $\bar{M}_{w\,D500}$ la masse molaire moyenne du dextrane commercial D500 et $\bar{M}_{w\,br}$ la masse molaire moyenne du dextrane branché considéré.

Une légère différence est observée lorsque l'on compare ces dernières valeurs à celles obtenues à partir des pourcentages de branchement déterminés par RMN ^{1}H qui considèrent le greffage d'une unique unité glucose à chaque nouveau branchement en $\alpha(1\rightarrow6)$ (Tableau 30). Cette différence est certainement due aux erreurs de mesure mais l'ordre de grandeur est respecté. Ces résultats montrent que dans ce cas aussi, comme pour les dextranes de DSR-OK du *Chapitre 3*, le branchement ne concerne qu'une seule unité glucose et non une longue chaîne.

Tableau 30 - Augmentation de masse molaire calculées à partir des données de RMN ^{1}H et d'AF4-MALLS-DRI.

Echantillon	% augmentation de $\bar{M}_w$ (RMN ^{1}H)	% augmentation de $\bar{M}_w$ (AF4-MALLS-DRI)
D500	-	-
D500-3B8	4	6
D500-3B21	22	15
D500-2B8	9	4
D500-2B19	25	17
D500-2B32	50	36

3. Etude du comportement viscoélastique des dextranes en solution aqueuse

Les propriétés rhéologiques des solutions de dextranes ont été déterminées. Un balayage en contrainte sur chaque solution de dextrane est réalisé afin de choisir la déformation à appliquer de manière à rester dans le domaine de réponse linéaire du matériau. Cette expérience a permis de déterminer et de fixer les conditions d'analyse où une déformation de 80% sera appliquée. La Figure 75 présente l'évolution des modules conservatifs (G') et dissipatifs (G'') de ces solutions en fonction de la fréquence pour les différents dextranes branchés.

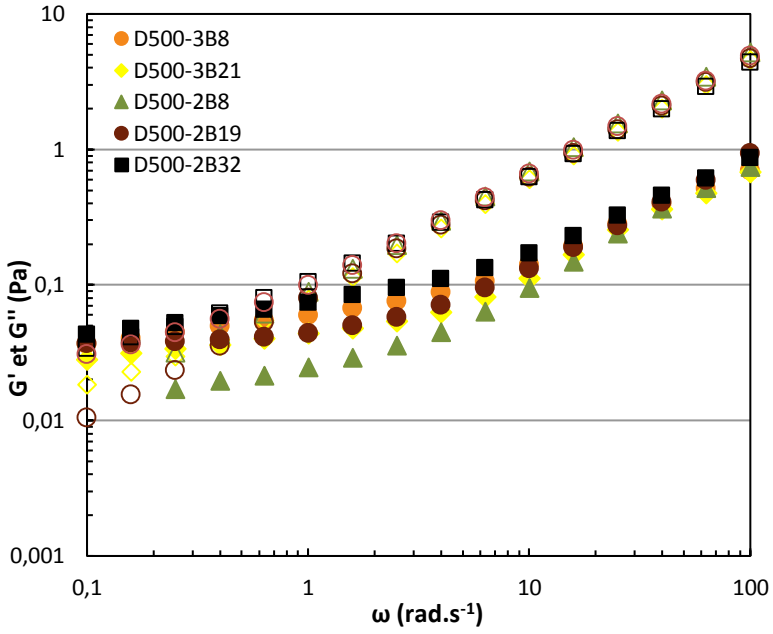


Figure 75 – Evolution du module élastique G' (symbole plein) et du module dissipatif G'' (symbole vide) des différents dextranes en solution à 20% (p/v) dans l'eau en fonction de la fréquence ω (déformation 80%).

Nous observons que le module dissipatif est supérieur au module élastique pour toutes les solutions de dextrane avec une superposition du G' et du G'' à des fréquences inférieures à 1 rad.s^{-1}. Ces résultats montrent qu'à concentration égale et pour des types et taux de branchements différents, ces dextranes présentent le même comportement de gel faible avec des modules rhéologiques identiques. Il est

important de souligner que moins de 2% d'impuretés présentes dans ces échantillons ne nous gênent pas pour l'interprétation des données.

4. Propriétés thermiques

Les propriétés thermiques de ces dextranes, commercial et branchés, conditionnés sous forme de poudre et équilibrés à 59% HR sont présentées dans le Tableau 31. Les teneurs en eau de ces dextranes se situent entre 10 et 15%, valeurs classiquement retrouvées pour des dextranes commerciaux, amidons, pullulanes, glycogènes équilibrés à cette humidité relative (Bizot *et al.*, 1997).

Tableau 31 - Récapitulatif des données thermiques du dextrane commercial et des dextranes qui en sont issus.

Echantillon	Teneur en eau (%)	T_g (°C)	ΔCp ($J.g^{-1}.K^{-1}$)	T_c (°C)	ΔH_c ($J.g^{-1}$)	T_f (°C)
D500	11,6	62,6	0,588	130,4	18,7	-
D500-3B8	12,8	54,8	0,424	-	-.	-
D500-3B21	13,5	47,0	0,478	-	-	-
D500-2B8	12,8	58,1	0,604	-	-	-
D500-2B19	12,9	59,2	0,417	-	-	-
D500-2B32	11,9	57,8	0,508	-	-	-

Les températures de transition vitreuse T_g déterminées sur les thermogrammes de la Figure 76a sont reportées dans le Tableau 31 et semblent être comparables (~ 50/60 °C). Pour le vérifier, le dextrane commercial D500 a ensuite été conditionné et équilibré à différentes humidités relatives (a_w 0,43 ; a_w 0,59 ; a_w 0,90 ; a_w 0,98) de façon à pouvoir tracer une courbe maîtresse T_g = f(teneur en eau) et y placer les données de T_g des dextranes branchés, afin de s'affranchir des disparités de teneur en eau (Figure 76b).

On remarque que les dextranes branchés se situent quasiment tous sur la courbe maîtresse ce qui indique qu'il n'y a pas d'impact du branchement sur la transition vitreuse. Le branchement d'une seule unité glucose en position $\alpha(1\rightarrow2)$ ou $\alpha(1\rightarrow3)$ sur la chaîne principale d'$\alpha(1\rightarrow6)$ (vérifié par AF4-MALLS-DRI en concordance avec les données de RMN ^1H), n'induit donc pas d'effet de plastification ou d'antiplastification interne. Bizot *et al.* (1997) avait émis l'hypothèse que dans le cas de courts branchements en position $\alpha(1\rightarrow6)$ (2 à 4 unités), liaison possédant 3 degrés de rotation, une augmentation de la mobilité et donc une baisse de la T_g étaient prévisibles.

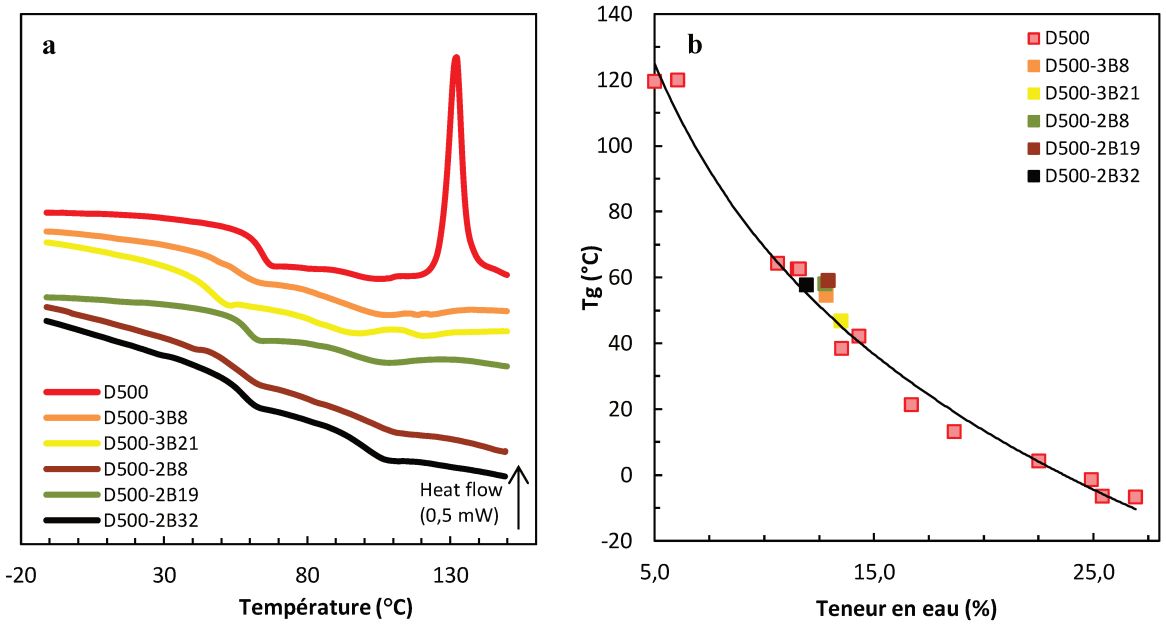


Figure 76 - Caractéristiques thermiques des dextranes commerciaux et branchés. a. Signal DSC des différents dextranes. **b.** Courbe maîtresse de la transition vitreuse en fonction de la teneur en eau du dextrane commercial D500 (trait fin d'équation $\boldsymbol{y = \frac{33{,}841x + 101{,}309}{0{,}777x + 0{,}223}}$) et superposition des transitions vitreuses des dextranes branchés.

Un pic exothermique très intense est présent entre 120 et 150 °C pour le dextrane commercial D500 (5% de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$) (Figure 76a). Il correspond à une recristallisation partielle de la phase amorphe, ce qui a été confirmé par DRX (Figure 79b). Un pic exothermique pourrait aussi être présent sur les thermogrammes des dextranes 500a et 500b entre 100 et 120 °C mais présentant une intensité très faible. Il pourrait s'agir d'une faible recristallisation de la phase amorphe mais ceci n'a pas pu être confirmé par DRX. Il est également possible qu'une répartition hétérogène des branchements conduit à des zones linéaires suffisamment importantes pour qu'il y ait cristallisation. En revanche, aucun pic exothermique n'est observé sur les thermogrammes des dextranes branchés en position $\alpha(1\rightarrow2)$ entre – 20 et 150 °C (Figure 76a). Il semble donc que les branchements en $\alpha(1\rightarrow2)$ inhibent toute recristallisation, même pour des faibles taux de branchement. On peut aussi remarquer sur les thermogrammes de la Figure 76a une chute de la ligne de base ou un pic endothermique entre 80 et 110 °C dont l'origine reste inconnue.

La recristallisation du dextrane commercial D500 a été étudiée plus en détails. Ce dextrane est conditionné à diverses humidités et son comportement à la cristallisation au cours d'un chauffage est déterminé par DSC (Tableau 32). Les courbes de température et d'enthalpie de recristallisation en fonction de la teneur en eau ont été tracées (Figure 77). La température de recristallisation décroît avec l'augmentation de la teneur en eau dans l'échantillon jusqu'à semble-t-il obtenir un plateau pour des teneurs en eau supérieures à 20 %. On remarque que l'enthalpie de recristallisation décroît linéairement

avec l'augmentation de la teneur en eau de l'échantillon (Figure 77b). On observe des points moins bien définis à des teneurs en eau supérieures à 20 % pouvant être en lien avec le plateau observé pour la température de recristallisation T_c.

Tableau 32 - Données thermiques du dextrane commercial D500.

a_w	**Teneur en eau** (%)	T_{g2} (°C)	ΔCp_2 ($J.g^{-1}.K^{-1}$)	T_{g3} (°C)	ΔCp_3 ($J.g^{-1}.K^{-1}$)	T_c (°C)	ΔH_c ($J.g^{-1}$) Dextrane sec	**% amorphe/cristallin**
sec	5,0	122,0	0,520	105,8	0,164	194,9	28,06	32/68
0,59	11,6	62,6	0,434	30,2	0,218	130,4	21,12	49/51
0,75	14,3	42,2	0,394	-	-	115,3	15,93	61/39
0,90	22,5	4,3	0,375	-	-	92,5	6,22	85/15
0,98	24,9	- 1,3	0,406	- 21,0	0,217	95,8	7,75	81/19

Nous avons aussi remarqué une évolution de la température de transition vitreuse entre le 2ème et le 3ème passage. En effet, lors du premier passage jusqu'à 90 °C, nous observons au voisinage de la T_g un pic endothermique de relaxation d'enthalpie liée au vieillissement physique (non représenté ici). Ce pic est alors éliminé lors du deuxième passage réalisé immédiatement après le premier, jusqu'à 200 °C. La transition vitreuse a lieu aux alentours de 60 °C et la recristallisation aux alentours de 130 °C pour un dextrane conditionné à a_w 0,59. Lors du troisième passage de − 40 à 200 °C, l'échantillon est semi-cristallin. En cristallisant, il y a un transfert d'eau vers la phase amorphe ce qui conduit à une diminution de la température de transition vitreuse (Figure 78).

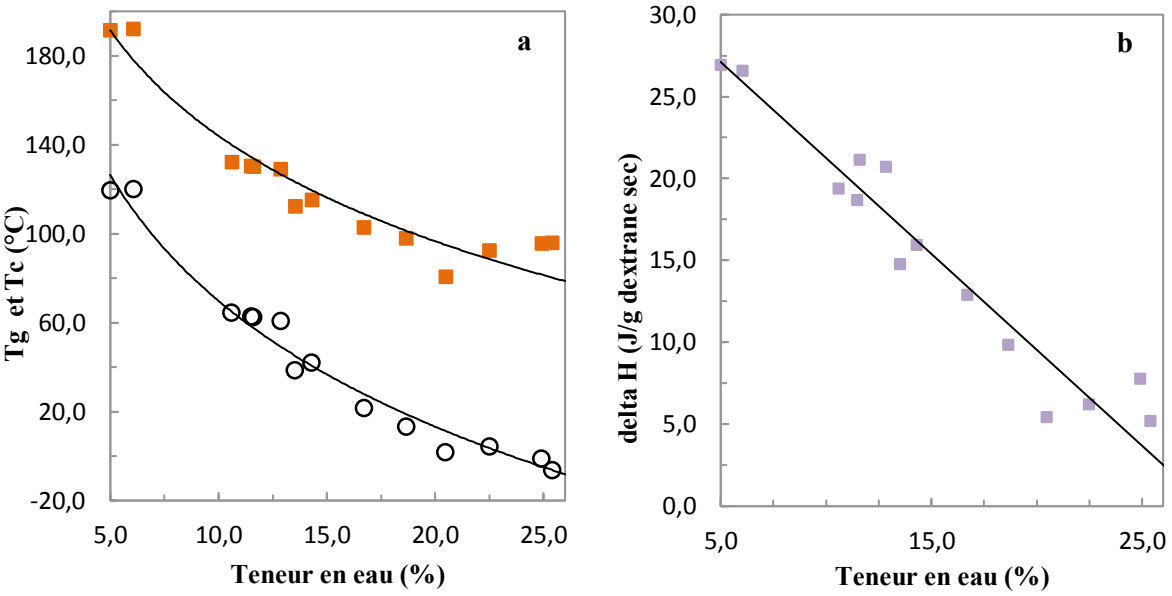


Figure 77 – Evolution des paramètres thermiques du dextrane commercial D500 en fonction de la teneur en eau. a. Courbes maîtresses et données expérimentales de la température de transition vitreuse T_g (○) et de la température de recristallisation T_c (■) en fonction de la teneur en eau. **b.** Influence de la teneur en eau sur l'enthalpie de recristallisation ΔH_c.

En partant des données de ΔCp à T_g avant et après cristallisation (Tableau 32), il est possible de remonter au taux de cristallinité, en sachant que les échantillons sont 100 % amorphes au départ (déterminé au préalable par DRX). Ce taux de cristallinité est calculé selon l'équation suivante pour le dextrane sec :

$$Taux\ de\ cristallinité_{D500\ sec} = 1 - \frac{\Delta Cp_3}{\Delta Cp_2} \qquad [57]$$

où ΔCp_2 et ΔCp_3 correspondent à la variation du flux de chaleur au passage de la transition vitreuse au 2ème et 3ème passage respectivement, exprimée en $J.g^{-1}.K^{-1}$.

D'après les mesures obtenues par DSC, le dextrane commercial D500 recristallise à 68% lorsque l'échantillon de départ contient 5% d'eau. Du fait de l'erreur plus importante faite sur la détermination du ΔCp des dextranes à forte teneur en eau, les taux de cristallinité des autres dextranes ont été calculés comme suit :

$$Taux\ de\ cristallinité_{D500i} = \frac{\Delta H_{D500i} \times Taux\ de\ cristallinité_{D500\ sec}}{\Delta H_{D500sec}} \qquad [58]$$

avec ΔH_{D500i} et $\Delta H_{D500sec}$ les enthalpies de recristallisation du dextrane considéré i et du dextrane sec respectivement.

Le dextrane D500 conditionné à 59% HR recristallise à 51% et cette cristallinité diminue jusqu'à 15-20% lorsque l'échantillon contient 25% d'eau.

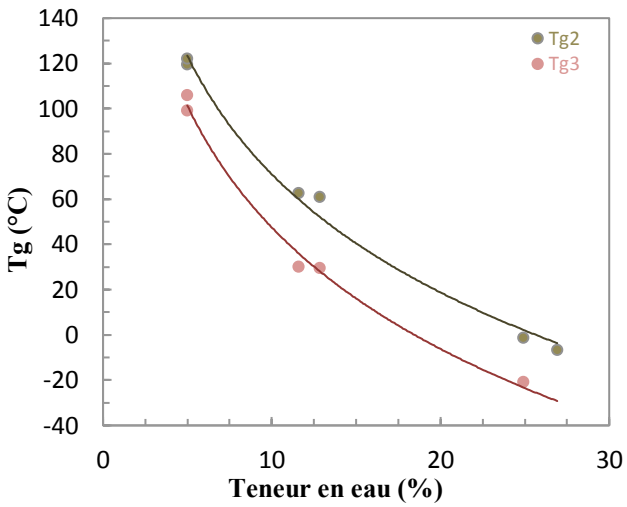


Figure 78 - Evolution de la température de transition vitreuse entre le deuxième et le troisième passage.

Il est aussi important de remarquer que comme pour les dextranes du *Chapitre 3*, ces dextranes ne possèdent pas de température de fusion T_f et ce, sur une gamme de température allant jusqu'à 200°C, l'échantillon se dégrade avant.

5. Propriétés de recristallisation

Une analyse par diffraction des rayons X a été réalisée sur le dextrane commercial 500 000 $g.mol^{-1}$ ainsi que sur les cinq dextranes issus du dextrane commercial ayant été branchés en position $\alpha(1\rightarrow2)$ ou $\alpha(1\rightarrow3)$ avec différents taux de branchements. Tous ces dextranes sont pulvérulents au moment de la réception (état « natif »). Il apparaît que même après traitement thermique des dextranes branchés, ceux-ci restent amorphes et ne recristallisent pas (diffractogrammes non-représentés pour les dextranes branchés) en accord avec les résultats obtenus en calorimétrie.

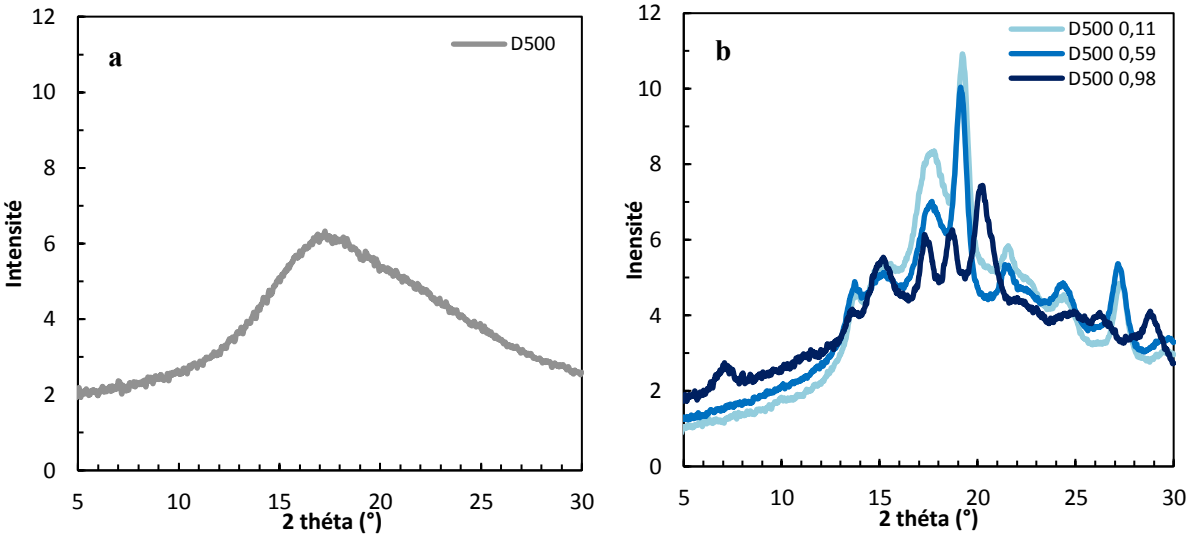


Figure 79 - Données DRX du dextrane commercial D500. a. Diffractogramme du D500 amorphe ; **b.** Evolution du diffractogramme du D500 en fonction de la teneur en eau.

La cristallinité du dextrane commercial D500 a été étudiée à trois teneurs en eau. Afin d'obtenir trois teneurs en eau différentes, le dextrane a été conditionné et équilibré à différentes humidités relatives : a_w = 0,11, 0,59 et 0,98. Lorsque ce dextrane est conditionné et équilibré à a_w 0,59, celui-ci est amorphe à l'état natif et recristallise vers 130 °C (Figure 79a.).

Les paramètres de cristallinité d'un dextrane bactérien de DP compris entre 60 et 120 ont été déterminés par Chanzy *et al.* (1980, 1981). Le dextrane existe sous deux polymorphes cristallins : un polymorphe basse température (BT) (cristaux cubiques ; paramètres de maille a = 2,563 nm, b = 1,021 nm, c = 1,616 nm) et un polymorphe haute température (HT) (cristaux lamellaires ; paramètres de maille a = 0,922 nm, b = 0,922 nm, c = 0,78 nm, $\alpha = \gamma = 90°$ et $\beta = 91,3°$).

L'analyse DRX montre que la signature spectrale du dextrane commercial D500 sec correspond au polymorphe haute température du dextrane mis en évidence par Chanzy *et al.* (1980, 1981) (Figure 79b). En outre, plus le dextrane contient de l'eau, plus son taux de cristallinité diminue (Tableau 33), comme l'ont montré précédemment les propriétés thermiques. Nous observons aussi qu'entre un dextrane conditionné à a_w 0,59 et un dextrane conditionné à a_w 0,98, la signature spectrale change. Le dextrane conditionné à a_w 0,98 ayant recristallisé correspond au polymorphe basse température (Tableau 33).

Tableau 33 - Structure du dextrane commercial D500 semi-cristallin à différentes teneurs en eau.

Conditionnement (a_w)	**Etat natif**	**Structure après chauffe à 150 °C**	**Taux de cristallinité (%)**	**Polymorphe**
0,11	Amorphe	Semi-cristallin	30	**HT**
0,59			25	**HT**
0,98			25	**BT**

Cette étude n'a pas pu être réalisée sur les dextranes branchés car leurs diffractogrammes n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque cristallinité. Nous pensions que les dextranes branchés en position $\alpha(1\rightarrow3)$ recristalliseraient de manière plus importante que ne laisse voir le faible signal obtenu en DSC.

6. Influence du type de branchement sur les propriétés mécaniques des différents matériaux

Il a été montré récemment que le dextrane commercial D500 a des propriétés de filabilité (Frampton *et al.*, 2015). Des fils de dextrane commercial D500 et de dextranes branchés ont été fabriqués afin de déterminer leurs propriétés mécaniques. Nous avons étudié les dextranes sous forme de fil avec comme objectif principal de provoquer l'orientation de la structure par étirement. Malheureusement, aucune orientation moléculaire n'a été mise en évidence par diffraction/diffusion des rayons X en 2D. Cependant les modules d'Young E, la contrainte σ et l'allongement à la rupture ε des différents fils ont pu être déterminés par micro-traction (Figure 80a, b et c).

Le module d'Young E des fils de dextrane commercial D500 est de 2460 ± 300 MPa. Ceux des fils de dextranes branchés se situent entre 2200 et 3200 MPa. Il semblerait qu'un faible taux de branchement conduit à l'augmentation du module alors qu'un taux élevé conduit à sa diminution. Cette observation est valable aussi bien pour des dextranes branchés en position $\alpha(1\rightarrow3)$ qu'en position $\alpha(1\rightarrow2)$. Compte-tenu de l'importance des barres d'erreur, cette observation doit être utilisée avec prudence. Les fils de dextranes branchés ont les mêmes contraintes à la rupture σ (~ 30 MPa) et les mêmes allongements à la rupture ε à l'incertitude près (~ 1,0%) mais ces valeurs sont divisées par 2 pour la contrainte et divisées par 4 pour l'allongement par rapport aux valeurs du dextrane commercial D500 (~ 60 MPa et 4,0%) (Figure 80).

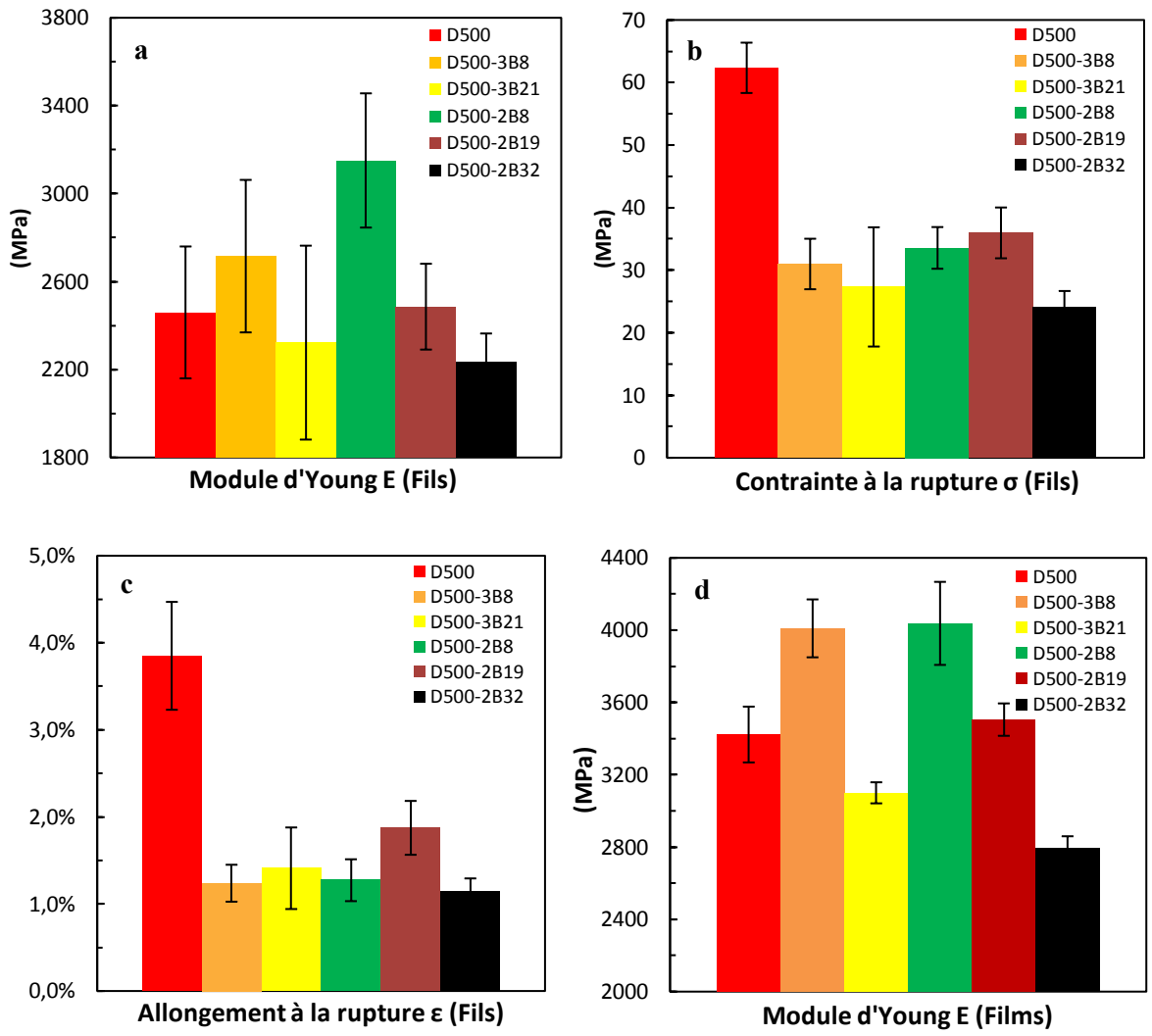


Figure 80 – Microtraction sur les fils et les films de dextrane commercial et branchés. a. Evolution du module d'Young E des fils en fonction du branchement ; **b.** Evolution de la contrainte σ à la rupture des fils en fonction du branchement ; **c.** Evolution de l'allongement ε à la rupture des fils en fonction du branchement ; **d**. Evolution du module d'Young E des films en fonction du branchement.

Ceci peut s'expliquer de différentes manières :

- Les impuretés (protéines, glucose, fructose, leucrose) présentes dans les dextranes branchés, entre 0,21 et 1,79% contrairement au dextrane commercial D500 qui n'en a aucune, constituent des amorces de rupture.
- Des difficultés de mesures de section du fil, des difficultés d'obtention de fil sans bulles d'air (rupture favorisée à ces endroits) ont été rencontrées et peuvent engendrer une incertitude sur les résultats.
- De façon à maintenir les fils dans les mors de l'appareil, deux points de colle ont servi à fixer les fils aux extrémités. Souvent, la rupture a eu lieu en bordure du point de colle servant au maintien entre les mors (Figure 81a).

Ces résultats sont à prendre avec beaucoup de précautions et pourraient certainement être améliorés en éliminant dans un premier temps les fines bulles présentes dans la solution de départ.

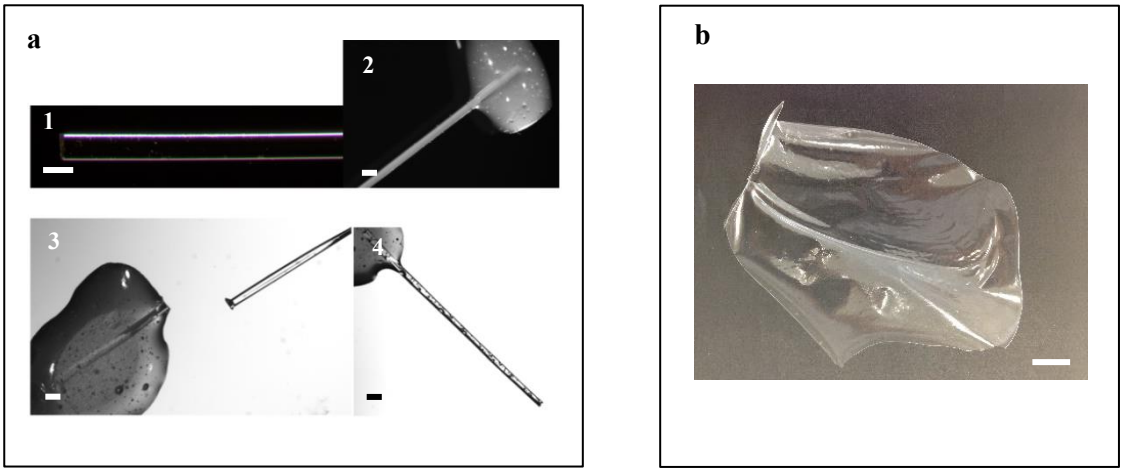


Figure 81 – Photos des différents matériaux fabriqués à partir des dextranes commercial et branchés a. Fils de dextranes (Unité : 100 µm) (1. dextrane commercial D500 ; 2. Fil D500-3B8 opaque ; 3. Rupture dans la colle du D500-3B21 ; 4. Présence de bulles dans le fil de D500-2B32) ; **b.** Films du dextrane commercial D500 (unité : 1 cm).

A partir des mêmes dextranes, des films ont été fabriqués par casting d'une solution à 2% (w/v) dans l'eau à 40 °C. Les films obtenus étaient tous transparents, relativement souples mais assez cassants s'ils sont manipulés sans précaution (Figure 81b). Ces films ont été étudiés par micro-traction et seuls les modules d'Young E sont représentés sur la Figure 80d. L'évolution des résultats de contrainte et d'allongement à la rupture en fonction du branchement obtenus avec les films (non représentée) est semblable à celle des fils.

Le module d'Young E des films de dextrane commercial D500 est de 3420 ± 180 MPa. Ceux des films de dextranes branchés se situent entre 2800 et 4010 MPa. Ces valeurs de module d'Young sont supérieures à celles obtenues pour les fils. Le module d'Young E étant une propriété intrinsèque du matériau, celui-ci ne devrait pas évoluer entre un fil et un film du même dextrane. Ces différences peuvent aussi s'expliquer par un matériau inhomogène en épaisseur ou par d'éventuelles erreurs de mesure, par exemple. Le module d'Young avec le taux de branchement évolue de la même façon que pour les fils. Un faible taux augmente le module alors qu'un taux important le diminue, avec des écarts type plus faibles pour les films que pour les fils. Les matériaux sous forme de films paraissent plus adaptés pour la détermination des propriétés mécaniques, dans ce cas. Les forts branchements pourraient induire une désorganisation, une gêne diminuant les interactions non-covalentes de type liaisons hydrogène faisant ainsi diminuer le module d'Young E. Le fait de brancher ce dextrane commercial D500 à différents types et taux de branchement n'a pas amélioré les propriétés mécaniques par rapport

au dextrane de départ que ce soit le module d'Young E, la contrainte à la rupture σ ou bien l'allongement à la rupture ε. Cela les a même fortement diminués.

Cependant, il a été démontré précédemment que les dextranes branchés ne recristallisent pas ce qui pourrait être intéressant pour des applications nécessitant le chauffage de la matière (agroalimentaire, cosmétique ou emballage). Afin de pouvoir en tirer ces bénéfices, la détermination des propriétés mécaniques du dextrane commercial D500 à l'état amorphe et à l'état semi-cristallin s'est avérée nécessaire et les résultats sont représentées sur la Figure 82a.

Pour cela, des barreaux de dextrane D500 ont été fabriqués par thermomoulage à deux températures différentes à partir de la poudre équilibrée à a_w 0,59. Le premier échantillon donnant lieu à un barreau amorphe, a été obtenu par thermomoulage du dextrane D500 à 100 °C (température inférieure à T_c = 130 °C) alors que le deuxième échantillon semi-cristallin a été obtenu par thermomoulage à 150 °C (température supérieure à T_c = 130 °C) (Figure 82b). Ces analyses ont été réalisées sur un troisième type de matériaux car il n'a pas été possible d'obtenir des films ou des fils semi-cristallins de façon contrôlée. La méthode de thermomoulage était la plus appropriée. Ceux-ci ont été conditionnés à a_w 0,59 avant l'analyse.

Les propriétés de ces deux types de barreaux (amorphe et semi-cristallin) ont été déterminées par micro-traction. Ces essais ont été répétés trois fois pour chaque type de barreau. Les valeurs de module d'Young E obtenues à une humidité relative de 65% sont de 1450 MPa ± 20 MPa pour le matériau amorphe et de 1730 MPa ± 15 MPa pour le matériau semi-cristallin. Ces modules d'Young sont bien inférieurs à ceux trouvés précédemment.

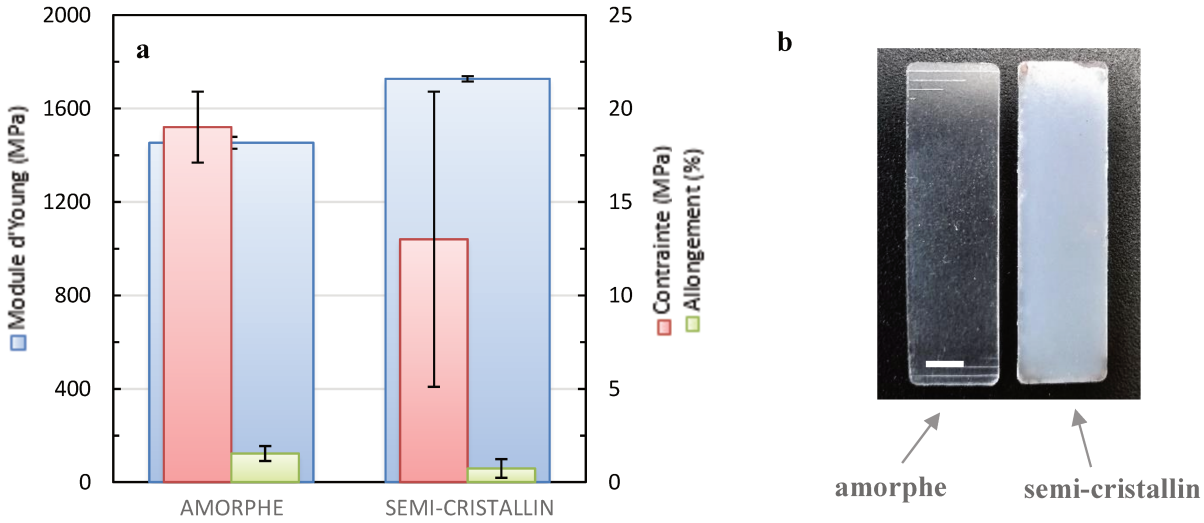


Figure 82 – Effet de la structure du dextrane commercial D500 thermomoulé sur les propriétés mécaniques. **a.** Evolution du module d'Young E, de la contrainte σ et de l'allongement ε à la rupture en fonction du matériau considéré ; **b.** Photos du thermoulé amorphe et semi-cristallin (unité : 0,5 cm).

Ceci pourrait s'expliquer par l'enchevêtrement des chaînes moins important lors d'une mise en forme par voie fondue (thermomoulage) en comparaison d'une voie par solution (casting ou filage). Les valeurs de contrainte à la rupture σ sont de 19 MPa ± 2 MPa pour un allongement ε de 1,5% ± 0,4% pour le matériau amorphe et une contrainte à la rupture de 13 MPa ± 8 MPa pour un allongement de 0,7% ± 0,5% pour le matériau semi-cristallin. De ces résultats, il est possible de conclure que le matériau semi-cristallin est plus fragile de part ces zones cristallines hétérogènes rendant le matériau plus cassant.

7. Conclusion

Cette étude montre qu'il a été possible de brancher le dextrane commercial de 500 000 $g.mol^{-1}$ à l'aide d'enzymes spécifiques et d'obtenir ainsi des dextranes avec des types et des taux de branchement variés. Le couplage AF4-MALLS-DRI a permis de déterminer les distributions en masses molaires et en taille permettant d'approcher les densités apparentes des macromolécules. Les masses molaires moyennes varient de $4{,}95.10^{5}$ $g.mol^{-1}$ pour le D500 à $6{,}73.10^{5}$ $g.mol^{-1}$ pour le D500-2B32, dextrane le plus branché. Ces augmentations de masses molaires entre le dextrane commercial de départ et les dextranes branchés sont en accord avec l'augmentation de liaisons dans le système déterminée par RMN ^{1}H ce qui permet de supposer qu'un branchement correspond à une seule unité glucose greffée. En revanche, la densité moléculaire apparente varie lorsque le dextrane présente des branchements en position $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow2)$. Comparé aux dextranes du chapitre précédent où il était difficile de conclure sur un effet du branchement sur le comportement en solution des dextranes du fait de la présence d'agrégats moléculaires, dans le cas présent, la densité moléculaire apparente varie fortement

entre un dextrane présentant des branchements en position $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow2)$. Cette densité moléculaire apparente augmente fortement lorsque l'on passe d'un dextrane branché en $\alpha(1\rightarrow3)$ à un dextrane branché en $\alpha(1\rightarrow2)$ pour un même taux de branchement ce qui laisse à penser qu'il pourrait y avoir une hétérogénéité de répartition des branchements le long de la chaîne. Pour répondre à cette question, une hydrolyse enzymatique par une dextranase qui va couper toutes les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ couplée à l'analyse des fragments libérés par chromatographie échangeuse d'anions haute performance couplée à de la détection à ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) pourrait être intéressante en vue de remonter à la structure de branchement de ces dextranes. Il est démontré dans ce travail que les branchements n'influent pas sur la température de transition vitreuse mais en revanche qu'ils ont un impact sur les propriétés de recristallisation du dextrane. Le dextrane commercial, très faiblement branché, va recristalliser sous l'influence de la température et de sa teneur en eau, en deux polymorphes distincts : le polymorphe haute température ou le polymorphe basse température. En revanche, il n'a pas été possible d'observer de recristallisation sur les dextranes branchés ce qui suggère que l'apport d'un branchement empêche la recristallisation. Par la suite, différents types de matériaux (fils, films et barreaux thermomoulés) ont été produits avec ces dextranes afin d'en déterminer leurs caractéristiques mécaniques. L'apport du branchement a un léger impact sur les modules d'Young puisque le module diminue lorsque le taux de branchement augmente, ce qui est observé avec les fils et les films malgré des écarts-type assez conséquents dans le cas des fils. La contrainte et l'allongement à la rupture des matériaux sont fortement affectés pas ces branchements puisque la contrainte est divisée par 4 et l'allongement par 2 entre un dextrane branché et le dextrane commercial. Les propriétés du dextrane commercial semi-cristallin ont été déterminées grâce à l'obtention de barreaux thermomoulés à haute température (150 °C) et celles-ci se sont montrées affaiblies par rapport au dextrane amorphe. L'incapacité des dextranes branchés à recristalliser pourraient par exemple remplacer l'utilisation des dextranes commerciaux pour des applications où la recristallisation peut être gênante.

CHAPITRE 5 : CARACTERISATION D'α-GLUCANES CONTENANT DIFFERENTS TYPES DE LIAISONS OSIDIQUES

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet du type de liaisons osidiques présentent dans la chaîne de différents polysaccharides, afin d'essayer de trouver une corrélation avec leur structure macromoléculaire en solution et/ou leurs propriétés. Ces polysaccharides sont synthétisés par le LISBP de Toulouse à l'aide d'enzymes spécifiques. Les différentes caractéristiques de ces échantillons sont répertoriées dans le Tableau 34 ci-dessous.

Tableau 34 - Caractéristiques des polysaccharides étudiés et teneurs en impuretés de synthèse.

Echantillon	Enzyme de branchement	RMN ^{1}H			Impuretés de synthèse			
		$\alpha(1\rightarrow6)$	$\alpha(1\rightarrow4)$	$\alpha(1\rightarrow3)$	Fructose (%)	Glucose (%)	Leucrose (%)	Protéines (%)
Dextranes	DSR-M	*Large gamme de dextranes synthétisés et détaillée dans la partie suivante*						
Alternane	ASR	62	0	38	2,09	0,19	1,95	0,75
A/GS-X	GS-X	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B/GS-X	GS-X	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mutane GTF-J	GTF-J	0	0	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mutane GTF-Si	GTF-Si	25	0	75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. : non déterminé

Une large gamme de dextranes a été synthétisée à partir de l'enzyme DSR-M connue pour produire des dextranes de faibles masses molaires d'environ 10^4 g.mol^{-1} (Passerini *et al*., 2015) et branchés à l'aide des enzymes de branchements BRS-A et BRS-BΔ1. L'alternane a été obtenu à l'aide de l'alternane-saccharase ASR et il est constitué de 62% de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et 38% de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$. Les polysaccharides A/GS-X et B/GS-X sont des α-glucanes synthétisés à partir de l'enzyme GS-X. Pour l'obtention de A/GS-X, l'enzyme GS-X a été purifiée alors que pour l'obtention de B/GS-X l'enzyme GS-X n'a pas été purifiée faisait partie d'un extrait contenant des enzymes de *E. coli* pouvant avoir des actions sur la synthèse du polysaccharide. L'analyse par RMN ^{1}H n'a pas permis de déterminer avec précision la proportion de liaisons osidiques de ces deux polysaccharides, des pics correspondant aux déplacements chimiques de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$ ont été observés. Ces échantillons seront appelés reutéranes par la suite. Des essais de perméthylation sont en cours pour obtenir des informations de structure plus précises. Deux mutanes ont été produits à l'aide de deux glucanes-sucrases, GTF-J et GTF-Si. Un mutane linéaire contenant 100% de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ a été synthétisé avec l'enzyme GTF-J alors qu'une hétérogénéité dans les liaisons a été obtenue grâce à l'enzyme GTF-SI, avec 25% de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et 75% de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$. La détermination des impuretés est en cours pour les

reutéranes et mutanes. Dans un premier temps, leurs structures macromoléculaires ont été investiguées par AF4-MALLS-DRI ainsi que par microscopie électronique. Les propriétés thermiques ont été investiguées par calorimétrie différentielle à balayage ainsi que par thermogravimétrie pour en déterminer leurs températures de dégradation. Une analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) a permis d'obtenir la morphologie de ces polysaccharides.

2. Dextranes produits par l'enzyme DSR-M

L'enzyme DSR-M est connue pour synthétiser des dextranes de faibles masses molaires (Passerini *et al*., 2015 ; Claverie *et al*., 2017). Un dextrane a donc été synthétisé à partir de cette enzyme DSR-M isolée de *Ln. Citreum* NRRL B-1299, et a ensuite été branché à l'aide d'enzymes de branchement spécifiques des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow2)$ (BRS-A et BRS-BΔ1 *cf. Chapitre 3 et 4*). Les caractéristiques des dextranes produits sont présentées dans le Tableau 35. Excepté pour le dextrane M-100, ces échantillons contiennent une quantité non négligeable d'impuretés de synthèse pouvant s'élever jusqu'à 8,51% au total pour M-3B47.

Tableau 35 – Caractéristiques des dextranes produits par l'enzyme de synthèse DSR-M et des enzymes de branchement BRS-A et BRS-BΔ1.

Echantillon	Enzyme de synthèse/branchement	RMN ^{1}H[a]			Impuretés de synthèse[a]			
		$\alpha(1\rightarrow6)$	$\alpha(1\rightarrow3)$	$\alpha(1\rightarrow2)$	Fructose (%)	Glucose (%)	Leucrose (%)	Protéines (%)
M-100	DSR-M	100	0	0	0,13	0,00	0,00	0,00
M-3B19	DSR-M/BRS-A	81	19	0	1,72	0,00	0,22	2,68
M-3B29	DSR-M/BRS-A	71	29	0	2,33	0,68	0,79	1,20
M-3B47	DSR-M/BRS-A	53	47	0	1,97	0,16	1,85	4,51
M-2B34	DSR-M/BRS-BΔ1	66	0	34	1,63	0,00	0,53	0,82

[a] déterminé comme Faucard *et al*., (2018).

2.1. Caractéristiques en solution

Les analyses de ces dextranes par AF4-UV-MALLS-DRI ont été réalisées sur les échantillons lyophilisés et les milieux de synthèse provenant du LISBP. Les rendements de filtration des solutions réalisées à partir des poudres de dextranes sont de 100% ce qui confirme que les échantillons n'ont pas été perdus sur le filtre et ont donc été solubilisés correctement dans le solvant d'analyse (Tableau 36). Cependant, les rendements d'élution des solutions injectées dans le système de AF4 varient entre 67 et 89% ce qui indique qu'il y a eu une perte de l'échantillon au cours de l'analyse. La membrane du canal a un seuil de coupure de 10 kDa, les impuretés de synthèse passent donc au travers, potentiellement des dextranes de masse molaire avoisinant ~ 10 kDa passent également, ce qui pourrait expliquer cette perte d'échantillon. Une autre possibilité serait l'existence d'interactions avec la membrane. Les rendements d'élution n'ont pas été déterminés sur les solutions réalisées à partir du milieu de synthèse. Il s'est avéré que l'échantillon M-100 n'était pas soluble dans l'eau, même après chauffage de la solution. Ainsi, son équivalent M-100Sy correspondant au milieu de synthèse recueilli juste avant l'étape de précipitation

de l'échantillon a pu être analysé ainsi que deux autres milieux de synthèse M-3B47Sy et M-2B34Sy correspondant respectivement aux échantillons M-3B47 et M-2B34.

Tableau 36 - Caractéristiques macromoléculaires des dextranes obtenus à partir de DSR-M à l'état de poudre ou en milieu de synthèse.

	Echantillon	Rdt $_{filtration}$ (%)	Rdt $_{élution}$ (%)	$\bar{M}_w$ x 10^4 (g.mol^{-1})	$\bar{R}_H$ (nm)
POUDRES	**M-100**	-	-	-	-
	M-3B19	100	74	1,89 ± 0,04	n.d.
	M-3B29	100	67	1,97 ± 0,02	n.d.
	M-3B47	100	84	2,26 ± 0,10	3,3
	M-2B34	100	89	2,37 ± 0,07	3,3
MILIEU DE SYNTHESE	**M-100Sy**	100	n.d.	1,50 ± 0,16	3,2
	M-3B47Sy	100	n.d.	2,23 ± 0,21	3,3
	M-2B34Sy	100	n.d.	2,13 ± 0,13	3,2

Les fractogrammes présentent tous la même allure générale avec un pic majoritaire éluant autour de 16 mL (Figure 83). Comme pour les dextranes du *Chapitre 4*, on observe sur le signal de diffusion de la lumière (non représenté) un pic éluant entre 30 et 35 mL signant la présence d'une petite quantité d'agrégats. Un faible signal UV à 280 nm est présent au tout début de l'élution (14 mL) caractéristique de la présence de protéines dans l'échantillon. Les $\bar{M}_w$ des échantillons, moyennées sur la totalité du pic (Tableau 36), sont comprises entre 1,50.10^4 g.mol^{-1} à 2,37.10^4 g.mol^{-1}.

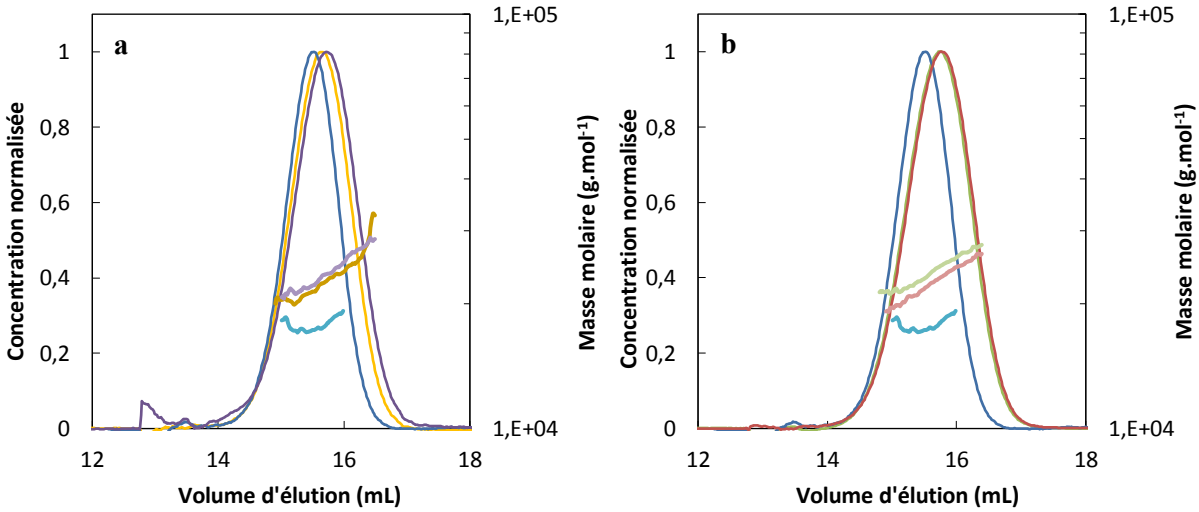


Figure 83 – Elugrammes et masses molaires des dextranes produits par l'enzyme DSR-M. a. milieux de synthèse correspondant aux échantillons M-100Sy (bleu), M-3B47Sy (violet), M-2B34Sy (jaune), signal DRI (trait fin) et masse molaire (trait épais). **b.** échantillons M-3B47 (rouge) et M-2B34 (vert) et milieu de synthèse M-100Sy (bleu), signal DRI (trait fin) et masse molaire (trait épais).

Lorsque le dextrane est fortement branché, les signaux DRI se déplacent vers de plus grands volumes d'élution (Figure 83a, b), ce qui correspond à une augmentation de volume hydrodynamique. Ce déplacement augmente avec le degré de branchement. En accord avec ces observations, les masses molaires augmentent avec le taux de branchement (Figure 83a, b). De même que pour les dextranes des *Chapitres 3 et 4* (série des dextranes de DSR-OK et des dextranes branchés à partir du dextrane commercial D500), cette augmentation qui est plus importante pour les dextranes branchés en $\alpha(1\rightarrow2)$ que pour les dextranes branchés en $\alpha(1\rightarrow3)$, pourrait être due à une densité moléculaire légèrement plus importante pour les dextranes branchés en $\alpha(1\rightarrow2)$.

En revanche, les rayons de girations trop faibles de ces dextranes (< 10 nm) ne sont pas mesurables par MALLS. Grâce à l'injection de pullulanes standards, les rayons hydrodynamiques R_H ont pu être calculés tout au long du pic et sont représentés sur la Figure 84. Les R_H varient entre 2,5 et 4,0 nm et augmentent avec un taux de branchement croissant.

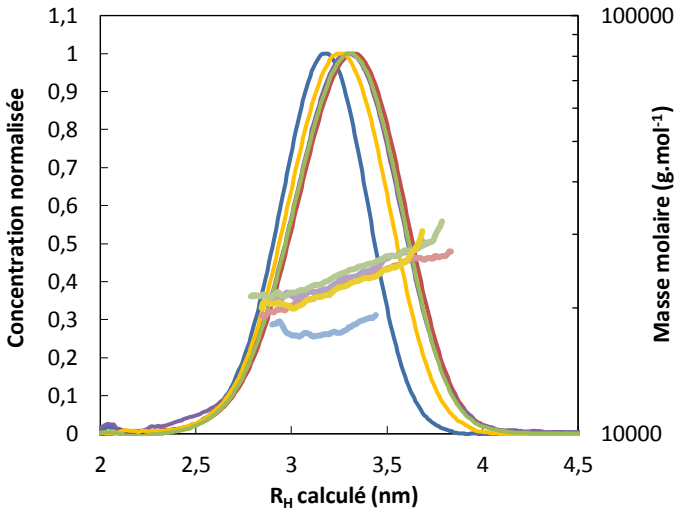


Figure 84 – Concentration normalisée et masse molaire en fonction du rayon hydrodynamique calculé des échantillons M-100Sy (bleu), M-3B47Sy (violet), M-2B34Sy (jaune), M-3B47 (rouge) et M-2B34 (vert).

La comparaison des résultats obtenus à partir des poudres et des milieux de synthèse a permis de constater qu'une très faible différence de masse molaire était observée et que la masse molaire du dextane M-100 pouvait être considérée proche de celle du milieu de synthèse correspondant M-100Sy.

De la même façon que dans les *Chapitres 3 et 4*, il est possible de calculer le pourcentage d'augmentation de masse molaire pour chaque dextrane branché par rapport au dextrane M-100 en utilisant les pourcentages de branchement déterminés à partir des données de RMN ^{1}H d'une part et d'autre part, à

partir des masses molaires déterminées par AF4-MALLS-DRI respectivement suivant les équations [55] et [56] (Tableau 37).

Tableau 37 - Augmentation de masse molaire calculée à partir des données de RMN ^{1}H et d'AF4-MALLS-DRI.

Echantillon	% augmentation de $\overline{M}_w$ (RMN ^{1}H)	% augmentation de $\overline{M}_w$ (AF4-MALLS-DRI)
M-100	-	-
M-3B19	23	26
M-3B29	41	31
M-3B47	89	51
M-2B34	52	58

Comme c'était le cas pour les dextranes branchés à partir du dextrane commercial D500 (*Chapitre 4*), une légère différence est observée lorsque l'on compare les valeurs obtenues à partir des pourcentages de branchements déterminés par RMN ^{1}H et les valeurs de masses molaires déterminées par AF4-MALLS-DRI. Il est souvent constaté que les pourcentages sont plus faibles par AF4-MALLS-DRI que par RMN ^{1}H pour une même échantillon avec un écart qui se creuse lorsque le dextrane est fortement branché. Ces différences observées peuvent s'expliquer par la présence d'impuretés de synthèse dans les échantillons venant gêner les analyses.

2.2.Structure cristalline

Les échantillons à l'état de poudre ont été caractérisés par diffraction des rayons X. Tous les dextranes sont amorphes sauf le dextrane M-100 dont le taux de cristallinité est de l'ordre de 30%. Cela pourrait expliquer son insolubilité dans l'eau. Sa signature spectrale est représentée sur la Figure 85. Les valeurs des angles 2θ des 5 bandes présentes sont de 14,5°, 19,4°, 22,2°, 25,5° et 29,0°. Cette signature ne correspond pas aux polymorphes haute température ou basse température connus pour les dextranes (Chanzy *et al*., 1980 et 1981). Il pourrait s'agir d'une forme non déterminée ou bien d'un mélange entre un polymorphe haute température et basse température mais ceci n'a pas pu être déterminé.

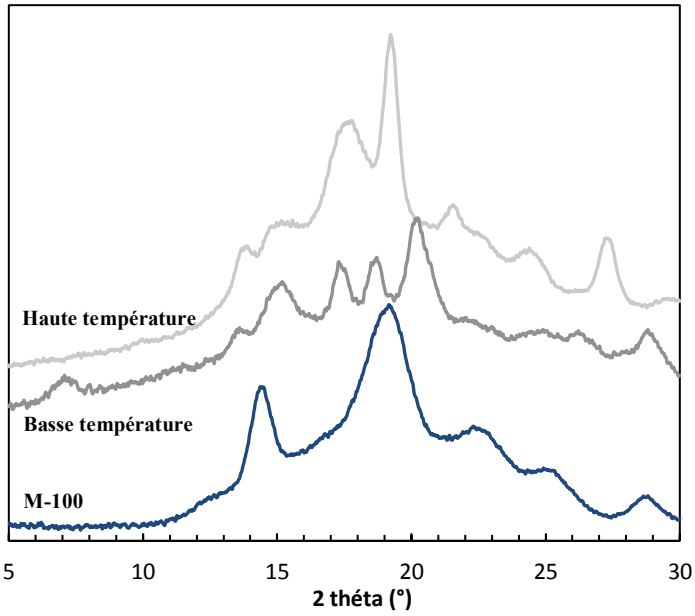


Figure 85 - Diffractogrammes du dextrane M-100 obtenu par diffraction des RX ainsi que les polymorphes haute température et basse température obtenus avec le dextrane D500 (*Chap. 4*).

2.3.Propriétés thermiques et mécaniques

Les propriétés thermiques de ces dextranes de faibles masses molaires, conditionnés sous forme de poudre et équilibrés à 59% HR sont présentées dans le Tableau 30. Les teneurs en eau de ces dextranes se situent entre 10 et 15 %, valeurs classiquement retrouvées pour des *α*-glucanes équilibrés à cette humidité relative (Bizot *et al*., 1997). Cependant il est important de constater que les teneurs en eau sont légérement supérieures à celles obtenues avec les dextranes des *Chapitres 3 et 4* excepté pour le dextrane M-100 qui est semi-cristallin. Dans ce cas, l'espace disponible entre les chaînes est limité laissant un moindre accès aux molécules d'eau.

Tableau 38 - Récapitulatif des données thermiques du dextrane M-100 produit à partir de l'enzyme DSR-M et des dextranes branchés issus de celui-ci.

Echantillon	Teneur en eau (%)	T_g (°C)	ΔCp ($J.g^{-1}.K^{-1}$)	T_c (°C)	ΔH_c ($J.g^{-1}$)	T_f (°C)
M-100	9,1	-	-	-	-	48,6
M-3B19	13,9	43,8	0,575	-	-.	-
M-3B29	13,9	42,3	0,567	-	-	-
M-3B47	14,1	37,8	0,657	-	-	-
M-2B34	13,7	44,2	0,354	-	-	-

D'après les thermogrammes obtenus pour chaque dextrane (non représenté), le dextrane M-100 ne possède pas de température de transition vitreuse mais présente un pic endothermique caractéristique d'une fusion à 48,6 °C. Ce pic correspond à la fusion des zones cristallines déjà présentes dans le dextrane à l'état natif. La température de transition vitreuse des dextranes branchés semblent être comparables (~ 37/44 °C pour ~ 14% d'eau). Ces valeurs de températures de transitions vitreuses sont superposées à celles déterminées pour les dextranes branchés à partir du dextrane commercial D500 (*Chap. 4*) et sont représentées sur la Figure 86.

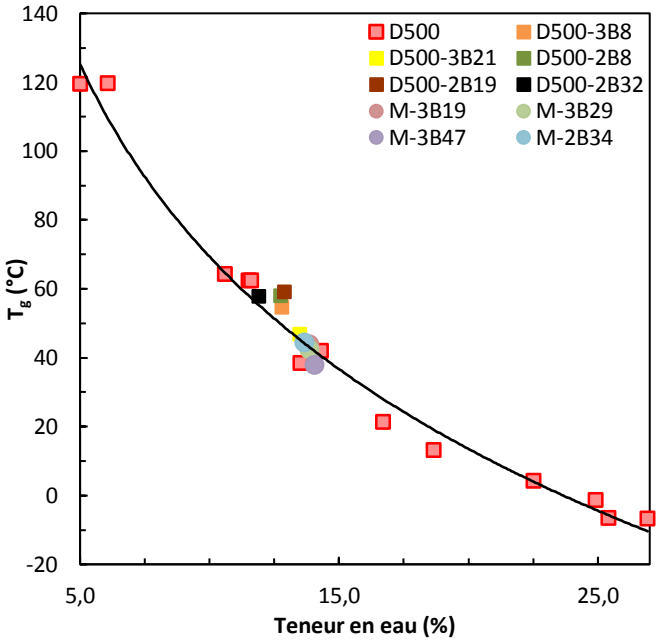


Figure 86 – Caractéristiques thermiques des dextranes branchés obtenus à partir de l'enzyme DSR-M représentant la température de transition vitreuse T_g en fonction de la teneur en eau (superposition des données obtenues dans le *Chapitre 4*).

Les températures de transition vitreuse des dextranes branchés sont superposées à la courbe maîtresse (D500 commercial) ce qui indique qu'il n'y pas d'impact de la masse molaire sur la transition vitreuse. Précédemment, nous avons démontré l'impact que pouvait avoir les impuretés de synthèse sur la transition vitreuse. Ici, M-3B47 présente une température de transition vitreuse légèrement inférieure aux autres dextranes pouvant s'expliquer par la forte proportion d'impuretés contenues dans cet échantillon (8,51%). Aussi, à partir de 120 °C et notamment pour les dextranes contenant le plus d'impuretés, le signal DSC était fortement bruité correspondant à la dégradation de l'échantillon. Aucune recristallisation n'est observée pour ces dextranes qu'ils soient branchés en position $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow2)$ en accord avec les données thermiques des dextranes du *Chapitre 4*.

Des essais d'obtention de films par casting ont été réalisés avec ces dextranes et ne se sont pas révélés concluants. Ceci peut s'expliquer par leur faible masse molaire ; en effet, la longueur des chaînes ne doit pas être assez importante pour permettre un large réseau de liaisons inter-moléculaires, nécessaire pour le maintien du film. Leurs propriétés mécaniques n'ont donc pas été déterminées.

3. Alternane produit par l'enzyme ASR

L'alternane a été synthétisé à l'aide de l'alternane-saccharase ASR. Les mesures de ^{1}H RMN ont montré qu'il est constitué de 68% de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et 32% de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ (Tableau 39). Il contient au total 5% d'impuretés, correspondant aux résidus de synthèse, dont 2,09% de fructose.

Tableau 39 – Liaisons osidiques et impuretés de synthèse de l'alternane synthétisé par l'alternane-saccharase ASR au LISBP.

Echantillon	Enzyme de synthèse	RMN ^{1}H[a]		Impuretés de synthèse[a]			
		Liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$	*Liaisons* $\alpha(1\rightarrow3)$	Fructose (%)	Glucose (%)	Leucrose (%)	Protéines (%)
Alternane	ASR	62	38	2,09	0,19	1,95	0,75

[a] déterminé comme Faucard *et al*., (2018).

3.1. Caractéristiques macromoléculaires de l'alternane en solution

D'après des travaux antérieurs, l'alternane s'agrège en solution aqueuse, c'est pourquoi il a été caractérisé dans des solvants organiques tels que le DMSO (Striegel *et al*., 2009 ; Isenberg *et al*., 2010). Dans un premier temps, nous avons donc réalisé une rapide étude de solubilité de cette macromolécule qui a consisté à solubiliser l'alternane dans différents solvants, puis à mesurer la transmittance des solutions et à déterminer la taille des particules par diffusion quasi-élastique de la lumière en batch (Tableau 40).

La transmittance de ces solutions est souvent très proche de 100% sauf dans le mélange H_2O/DMSO 3/1 (v/v), dans le DMSO chauffé à 80 °C pendant une nuit ou encore dans KOH 0,1 M (%T<95%) indiquant la présence de particules insolubles de tailles microniques dans ces trois solutions. Le rayon hydrodynamique moyen en z $\bar{R}_{Hz}$ de l'alternane varie de 36,9 nm à 70,7 nm suivant le solvant de solubilisation et la température considérés. Il est de l'ordre de 50 nm dans le DMSO et KOH, plus élevé dans le mélange H_2O/DMSO 3/1 (v/v) (70,7 nm), et plus faible dans l'eau (42,5 et 38,5 nm) et dans HCl 1M (36,9 nm).

Tableau 40 – Transmittance (%T) à 650 nm et rayon hydrodynamique moyen en z $\overline{R}_{Hz}$ de l'alternane en solution à 0,5 g.L^{-1} à 25 °C et 80 °C, dans différents solvants.

Solvant	%T[a]	$\overline{R}_{Hz}$ (nm)
25 °C		
H_2O	98	42,5 ± 0,5
KOH 0,1 M	91	50,0 ± 1,0
KOH 1 M	100	55,6 ± 0,3
HCl 1 M	100	36,9 ± 0,2
DMSO	100	51,1 ± 0,2
H_2O/DMSO 3/1	93	70,7 ± 0,7
80 °C		
H_2O	97	38,5 ± 1,4
DMSO	87	51,1 ± 0,5

[a] Les erreurs sur les valeurs expérimentales de transmittance sont <1%.

A 25 °C, l'utilisation de KOH et de DMSO semblent ainsi conduire à une bonne solubilisation de l'alternane. HCl 1 M, s'il solubilise l'alternane, produit une diminution du rayon à cause d'une hydrolyse partielle de la macromolécule en milieu acide. La taille de l'alternane est plus faible dans l'eau (42,5 et 38,5 nm) que dans le DMSO (51,1 nm). Ceci pourrait s'expliquer par une contraction de la molécule dans l'eau favorisée par de nombreuses liaisons hydrogènes intramoléculaires, alors que le DMSO est reconnu comme solvant favorable à la formation de liaisons H molécule-solvant. En revanche, la solubilité de l'alternane diminue dans le DMSO lorsque la solution est chauffée à 80 °C. Ceci pourrait s'expliquer par une diminution des liaisons H entre alternane et DMSO, favorisant l'association intramoléculaire et produisant une contraction de l'alternane allant jusqu'à son insolubilisation (%T<95%). Ce phénomène a déjà été démontré par Basedow *et al*. (1980) et Antoniou *et al*. (2010) sur des dextranes. Etonnamment, le mélange H_2O/DMSO 3/1 est un moins bon solvant que l'eau à 25 °C pour l'alternane sans que l'on puisse trouver une explication.

Pour déterminer les distributions en masses molaires, les rayons et la conformation, nous avons donc choisi d'étudier le dextrane dans l'eau à 25 °C.

3.1.1. AF4-UV-MALLS-DRI

L'alternane synthétisé a été analysé par AF4-UV-MALLS-DRI. Celui-ci est très soluble dans l'eau et présente des rendements de solubilisation et d'élution de 100%. Un signal UV à 280 nm important est observé pouvant correspondre à la présence d'enzymes résiduelles liées ou piégées dans le

polysaccharide (Figure 87). Les élugrammes (Figure 88a, b) montrent une seule population éluant à 19,5 mL. La masse molaire augmente avec le volume d'élution ce qui indique que la totalité de l'échantillon est éluée en mode normal, et le pic est symétrique et peu large. Le Tableau 41 regroupe les caractéristiques moléculaires déterminées pour l'alternane.

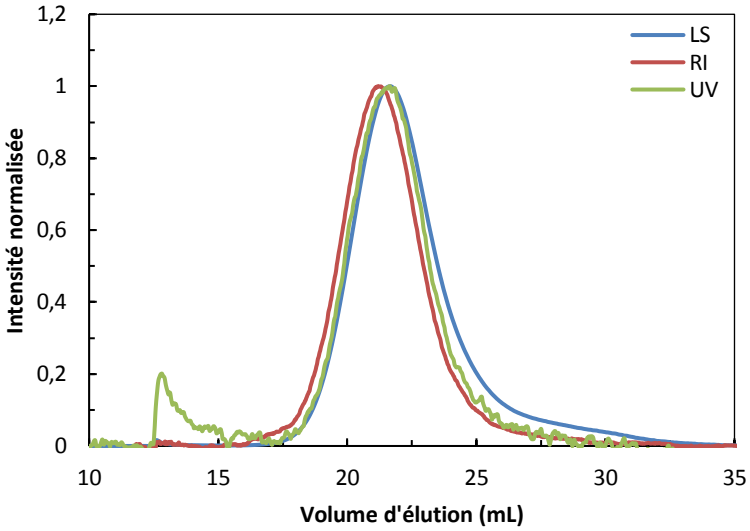


Figure 87 - Elugrammes de l'alternane montrant les trois signaux normalisés : diffusion de la lumière (bleu), réfractométrique (rouge) et UV (vert).

Tableau 41 – Caractéristiques macromoléculaires de l'alternane déterminées par AF4-UV-MALLS-DRI.

Echantillon	Rendement $_{\text{solubilisation}}$ (%)	Rendement $_{\text{élution}}$ (%)	$\bar{M}_w$ x 10^7 (g.mol^{-1})	$\bar{R}_{Gz}$ (nm)	$\bar{R}_{Hw}$ (nm)	ν_G	$\overline{d_{Gapp}}$ (g.mol^{-1}.nm^{-3})
Alternane	100	100	3,25	33,9	39,0	0,38-0,58	225,9

Le rayon de giration moyen en z $\bar{R}_G$ est de 33,9 nm pour une masse molaire moyenne en poids $\bar{M}_w$ est de 3,25.10^7 g.mol^{-1}. Les masses molaires s'étendent de 1,27.10^7 g.mol^{-1} pour un maximum de 22,4.10^7 g.mol^{-1} (Figure 88a, b). La dispersité de cet échantillon (calculée avec le ratio $\bar{M}_w/\bar{M}_n$) est de 1,1. Cette valeur est plutôt faible comparativement à d'autres biopolymères et indique une faible dispersion de la population. L'injection de quatre latex calibrés et élués avec la même méthode que l'alternane, a permis de déterminer la distribution en rayon hydrodynamique de l'alternane. Les résultats obtenus afin d'obtenir la droite de calibration sont représentés dans le Tableau 42. D'après l'équation obtenue par la droite de calibration, le rayon hydrodynamique en poids R_{Hw} peut être calculé à chaque temps de

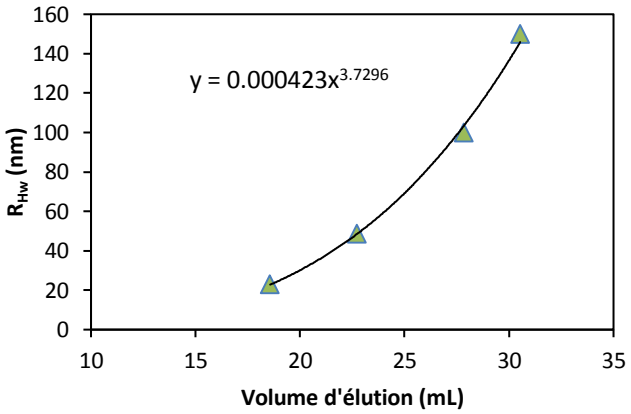
rétention (Rolland-Sabaté *et al.*, 2011) et le rayon hydrodynamique moyen en poids $\overline{R}_{Hw}$ de l'alternane est calculé selon l'équation suivante :

$$\overline{R}_{Hw} = \frac{\sum R_{Hi} \times DRI_i}{\sum RI_i} \quad [59]$$

où R_{Hi} correspond au rayon hydrodynamique calculé à chaque fraction i et DRI_i l'intensité du signal réfractométrique à chaque fraction i.

Tableau 42 – Volume d'élution Ve et rayon hydrodynamique moyen en poids $\overline{R}_{Hw}$ de sphères de latex et droite de calibration.

Sphère de latex	Ve (mL)	$\overline{R}_{Hw}$ (nm)	Ecart-type
L50	18,57	23	1,0
L100	22,73	48,5	1,5
L200	27,84	100,0	3,0
L300	30,53	150,0	3,0



Le rayon hydrodynamique moyen en poids $\overline{R}_{Hw}$ de l'alternane est de 39,0 nm. En traçant l'évolution du rayon de giration en fonction de la masse molaire, les données de structure peuvent être déterminées à partir de l'exposant ν_G de l'équation [35]. Le ν_G moyen de l'alternane solubilisé dans l'eau sur l'ensemble de la distribution est de 0,46, indiquant une conformation entre la sphère dense (0,33) et la pelote statistique (0,5−0,6). Cependant, une rupture de pente est observable autour de $3{,}5.10^7$ g.mol^{-1} (Figure 88c) ce qui indique une hétérogénéité structurale le long de la distribution. Une valeur de ν_G de 0,38 a été déterminée pour les masses molaires < $3{,}5.10^7$ g.mol^{-1} et de 0,58 pour les masses molaires > $3{,}5.10^7$ g.mol^{-1} (Figure 88c) : l'alternane aurait donc une conformation proche de la sphère aux faibles masses molaires et une conformation de type pelote statistique pour les masses molaires > $3{,}5.10^7$ g.mol^{-1}.

La densité moléculaire apparente moyenne $\overline{d_{Gapp}}$ de l'alternane est de 225,9 g.mol.nm^{-3} soit 375 141 g.m^{-3} avec une densité maximale de 266,4 g.mol.nm^{-3} (Figure 88d).

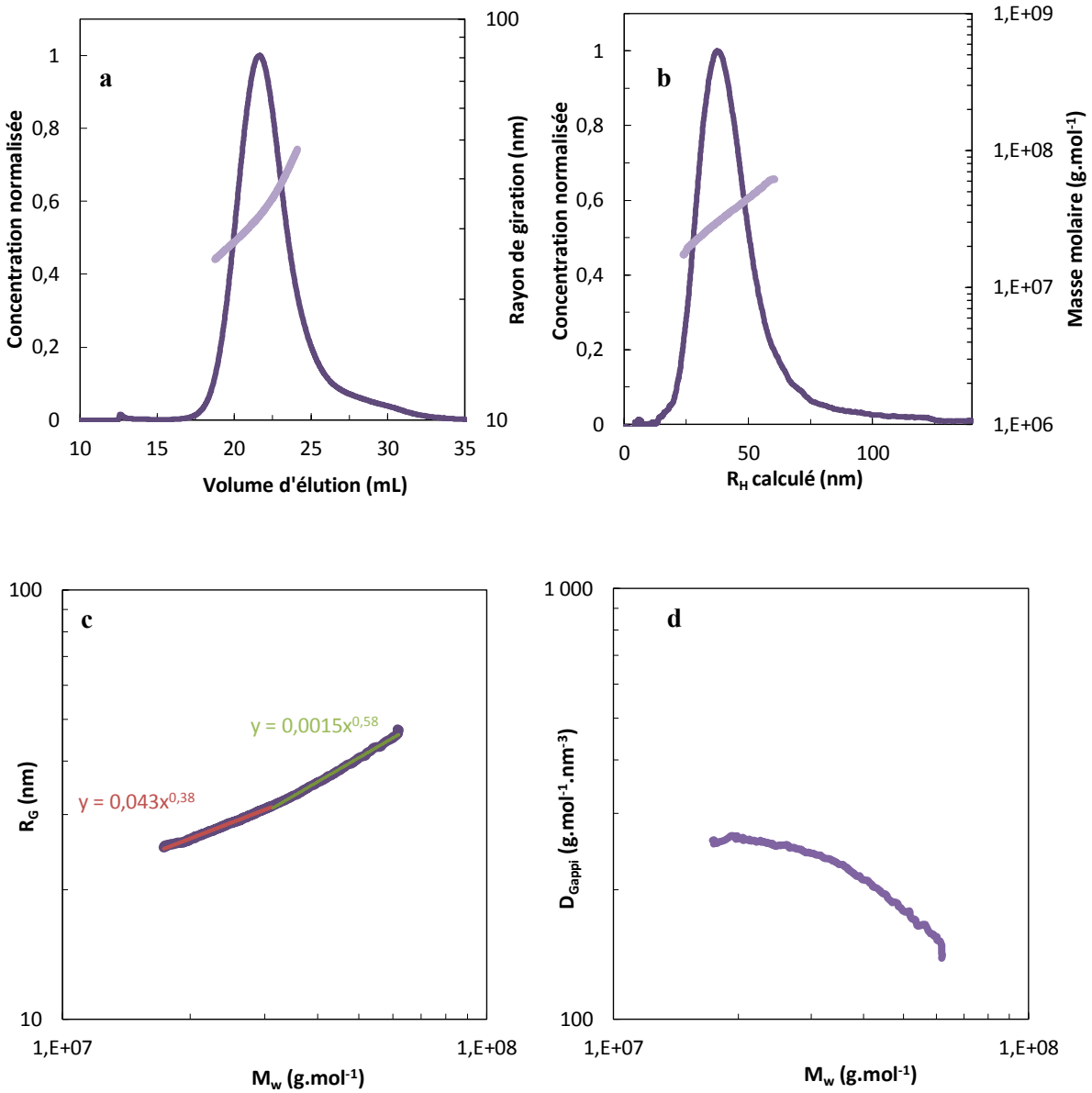


Figure 88 – Caractéristiques moléculaires de l'alternane en solution dans l'eau déterminées par AF4-UV-MALLS-DRI. a. Concentration normalisée et rayon de giration en fonction du volume d'élution. **b.** Concentration normalisée et masse molaire en fonction du rayon hydrodynamique calculé. **c.** Rayon de giration en fonction de la masse molaire. **d.** Densité moléculaire apparente en fonction de la masse molaire.

L'alternane a donc une structure très dense comparé à celle des dextranes étudiés dans les chapitres précédents (densités : D1-3B2 *Chap. 3* : 9 530 g.m^{-3} soit 5,7 g.mol^{-1}.nm^{-3} et D500$_{branchés}$ *Chap. 4 :* ~ 50 000 g.m^{-3} soit 30 g.mol^{-1}.nm^{-3}), aux dextranes commerciaux (6,6 à 13 g.mol^{-1}.nm^{-3}) (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008) ou encore à l'amylopectine (5-7 g.mol^{-1}.nm^{-3}) (Rolland-Sabaté *et al.*, 2012). Cette densité moléculaire apparente diminue avec l'augmentation de masse molaire ce qui est en accord avec une structure moléculaire non agrégée. De telles valeurs de densités ont été mise en évidence dans le cas de glycogènes (335 à 593 g.mol^{-1}.nm^{-3}) et phytoglycogènes (335 à 456 g.mol^{-1}.nm^{-3}) (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008). Ces molécules sont des polymères hyperbranchés comportant des chaînes de glucoses liés en

$\alpha(1\rightarrow4)$ pouvant comporter entre 8 et 15% de branchements en position $\alpha(1\rightarrow6)$ (Roussel *et al*., 2013). Des valeurs de densité moléculaire apparente de 432,6 à 592,8 $g.mol^{-1}.nm^{-3}$ ont également été reportées dans la littérature pour une série de polymères hyperbranchés synthétisés par voie enzymatique comportant des chaînes de glucoses liés en $\alpha(1\rightarrow4)$ comportant de 8 à 13% de branchements en position $\alpha(1\rightarrow6)$ (Rolland-Sabaté *et al*., 2014). Ces valeurs obtenues pour ces polymères de type glycogène sont cependant supérieures à celles calculées ici pour l'alternane.

3.1.2. Caractérisation par microscopie électronique en transmission

L'alternane a été observé par microscopie électronique en transmission (MET) au CERMAV (Grenoble). Des images caractéristiques de préparations colorées négativement à l'acétate d'uranyle sont présentées dans la Figure 89. On observe des particules d'alternane qui semblent sphériques et présentent une distribution de taille homogène. La distribution de taille, déterminée en mesurant le diamètre apparent de 300 particules, est représentée sur la Figure 90.

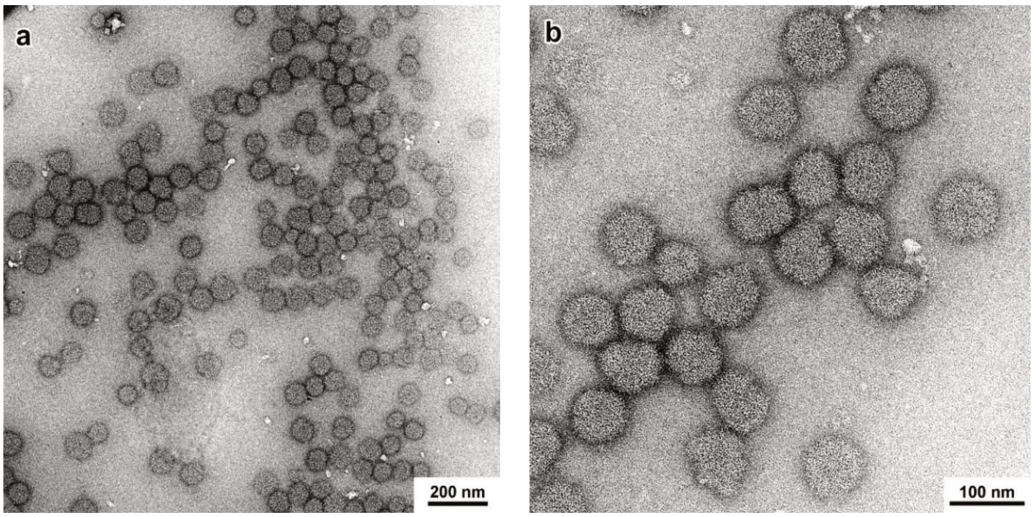


Figure 89 – Images de microscopie électronique en transmission obtenues par séchage d'une suspension d'alternane à 2 $mg.mL^{-1}$ et coloration négative à l'acétate d'uranyle.

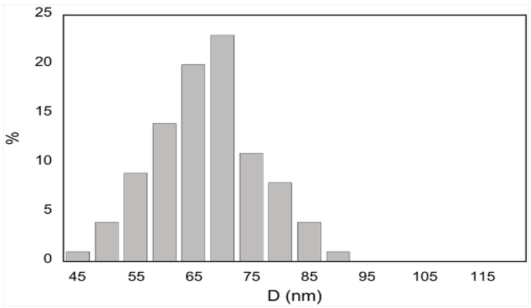


Figure 90 - Distribution du diamètre des particules d'alternane réalisée à partir des images de MET (300 particules).

Cette distribution est pratiquement gaussienne et monomodale à l'image de celle obtenue par AF4. Les valeurs de diamètre moyen en nombre $\overline{D_n}$, en poids $\overline{D_w}$ et en taille $\overline{D_z}$, sont respectivement de 70,3 nm (déviation standard de 10,5 nm), 75,4 nm et 79,7 nm, soit un rayon moyen en nombre de 35,1 nm. De très faibles écarts sont observés entre ces diamètres confirmant la faible dispersité en taille de l'échantillon. Les différentes valeurs de rayons de giration moyen en nombre $\overline{R_{Gn}}$, en poids $\overline{R_{Gw}}$ et en taille $\overline{R_{Gz}}$ déterminées par AF4-UV-MALLS-DRI sont de 30,2 nm, 31,6 nm et de 33,9 nm. Ainsi, les tailles déterminées par MET sont légèrement supérieures à celles déterminées par AF4-UV-MALLS-DRI ce qui peut s'expliquer par des effets d'écrasement des particules sur le support au cours du séchage de l'échantillon, avant les observations au MET. Ceci pourrait être atténué en faisant des observations par cryo-MET, technique qui permet, par congélation directe d'un mince film de suspension d'observer les particules figées dans leur environnement liquide (Putaux *et al*., 1999). Il est aussi possible qu'il n'y ait aucun effet d'écrasement puisque le rayon hydrodynamique moyen en poids déterminé par AF4-UV-MALLS-DRI et par MET sont très proches avec respectivement 39,0 et 37,7 nm.

Sur la Figure 89, on observe que les particules présentent un contour plus foncé. Le colorant est exclu et se trouve en périphérie de la particule. La pénétration du colorant a probablement été limitée par une densité particulaire importante, en accord avec la valeur de densité moléculaire apparente très élevée relevée pour l'alternane. Quelques particules présentes sur la Figure 89b ont un aspect de « chou-fleur ».

On relève des similarités avec les structures observées dans le cas des glycogènes et phytoglycogènes qui présentent des particules plutôt sphériques avec cette structure en « chou-fleur », des tailles similaires à l'alternane et un colorant exclu de la particule (Figure 91c) (Putaux *et al*., 1999 ; Roussel *et al*., 2013 ; Grimaud *et al*., 2013 ; Rolland-Sabaté *et al*., 2014). Les circonvolutions observées sont toutefois beaucoup plus marquées pour les glycogènes que pour l'alternane et les distributions de taille beaucoup plus larges.

La structure de l'alternane est peu connue mais il est montré qu'il possède de longues branches (Isenberg *et al*., 2010). Dans le cas du glycogène, des modèles mathématiques ainsi qu'une étude par hydrolyse acide ont permis de prédire leurs structures (Powell *et al*., 2015). Ces auteurs montrent qu'il existe des particules qu'ils nomment « α » et « β » de diamètre ~ 20 à 300 nm et ~ 20 nm respectivement. Les particules β pourraient être des particules composées de plusieurs α donnant cette structure en chou-fleur. Il pourrait y avoir ces deux types de particules dans notre cas. Powell *et al*. (2015) expliquent aussi que lorsque la particule β croît par l'addition d'unités glucosyles, la densité moléculaire locale dans la périphérie devient si élevée que les enzymes ne peuvent plus fonctionner librement, ce qui entrave la

croissance de la molécule. Cette structure est représentée sur la Figure 91a. De tels mécanismes de blocage de croissance pourraient intervenir lors de la synthèse de l'alternane, dont les masses molaires moyennes ne sont jamais supérieures à 10^8 g.mol^{-1}. Ce mécanisme d'encombrement est absent dans le cas de l'amylopectine qui présente également une structure ramifiée mais avec un taux de branchement et une distribution des points de branchement différents de ceux du glycogène (Figure 91b). Comme le glycogène, l'amylopectine est constituée de chaînes linéaires de glucoses reliés par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ reliées entre elles par des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ aux points de branchement. Elle présente un taux de ramification de 5 à 6%, inférieur à celui du glycogène. A l'heure actuelle, le modèle de structure de l'amylopectine est toujours discuté mais peut être représenté sous la forme d'une structure en grappes chacune constituée de chaînes linéaires courtes orientées parallèlement. Contrairement au cas du glycogène, la densité de chaînes en périphérie de l'amylopectine ne bloque pas la croissance de la molécule. L'amylopectine a été observée par MET après différents temps de rétrogradation dans l'eau (Putaux *et al.*, 2000). Contrairement à ce qui est observé pour l'alternane, les macromolécules apparaissent comme des réseaux plus ou moins ramifiés et peu denses, formés de « grains » dont la taille traduirait la recristallisation locale de groupes de courtes branches (Figure 91d).

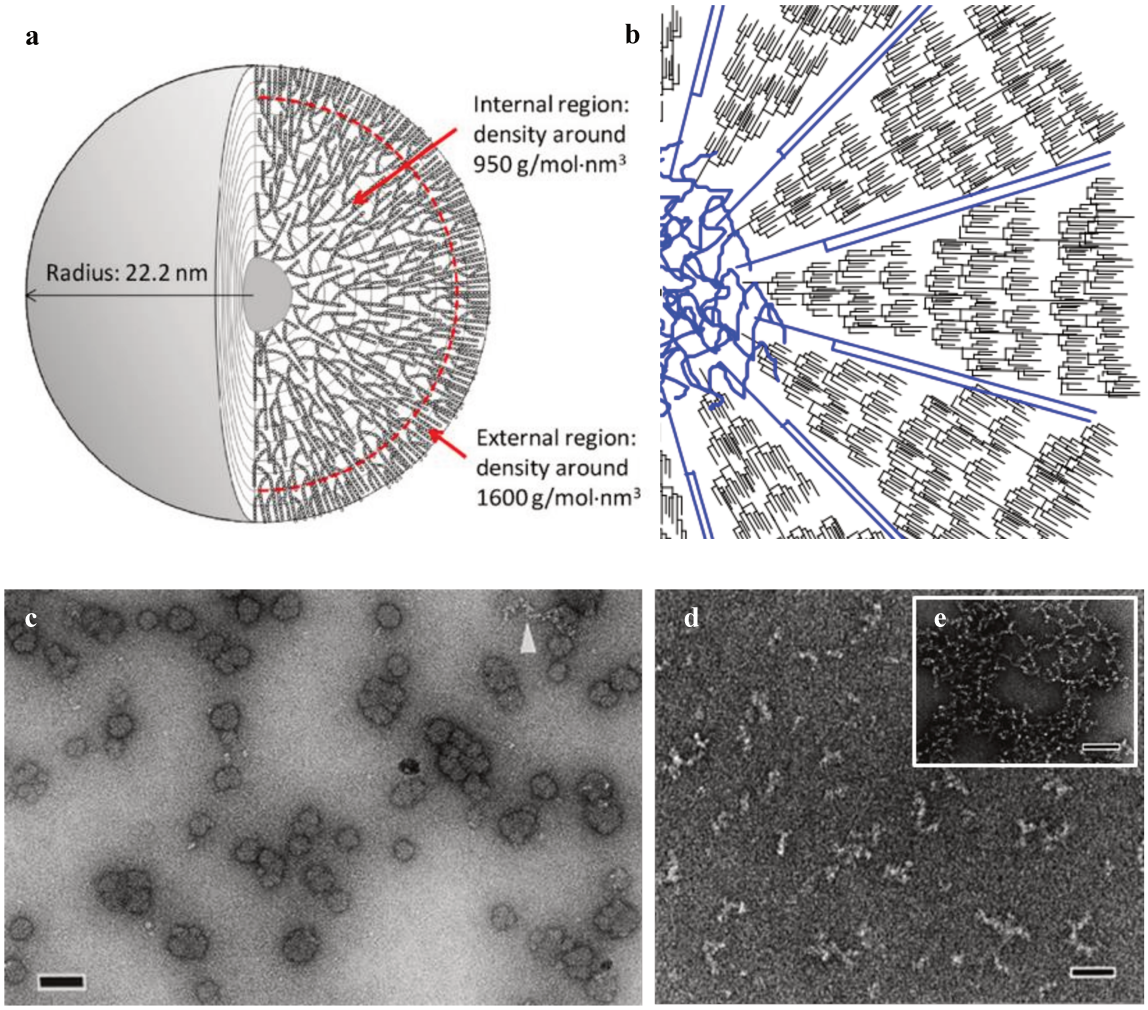


Figure 91 - a. Modèle d'encombrement d'une nanoparticule de phytoglycogène. La périphérie plus dense que le cœur est symbolisée par un cercle rouge, l'épaisseur de cette région est d'environ 3,3 nm (Huang *et al.*, 2011). b. Modèle d'un grain d'amidon représentant la structure de l'amylopectine (noir) et de l'amylose (bleu) (Wang & Copeland, 2013). c. Image MET de phytoglycogène extrait de maïs (Putaux *et al.*, 1999). d. Image MET d'amylopectine en suspension aqueuse après solubilisation et refroidissement à température ambiante et e. Observation d'un réseau d'amylopectine par MET après conservation 8 mois à 6 °C (Putaux *et al.*, 2000).

Deux hypothèses expliquant la structure dense de l'alternane peuvent être émises à ce stade : l'alternane pourrait avoir une structure de branchement complexe à l'image de celle du glycogène ou bien l'alternance de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ permettrait à la chaîne de se replier, favorisant les liaisons intramoléculaires en augmentant la densité moléculaire.

Le paramètre de ramification (ou de contraction) g_M est largement utilisé pour caractériser les polymères ramifiés en solution et a été déterminé pour l'alternane. Il est calculé à l'aide de l'équation suivante (Zimm & Stockmayer, 1949 ; Burchard, 1983) :

$$g_M = \bar{R}^2_{Gw(br)} / \bar{R}^2_{Gw(lin)} \qquad [60]$$

avec g_M et h les facteurs de contraction statique et dynamique, $\bar{R}_{Gw}$ et $\bar{R}_H$ les rayons de giration moyen en poids et hydrodynamique. Les indices br et lin correspondent respectivement aux valeurs relatives au polymère ramifié et son équivalent linéaire de même masse molaire. La valeur de g_M est toujours inférieure à 1 et plus le polymère est ramifié, plus g_M est faible (Yu & Rollings, 1987).

$\bar{R}^2_{Gw(lin)}$ a été déterminé en utilisant l'équation suivante établie à l'aide d'amyloses synthétiques en milieu aqueux par Rolland-Sabaté *et al*. (2008) étant donné que nous n'avons pas de polymères synthétiques linéaires où les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ sont alternées :

$$\bar{R}^2_{Gw(lin)} = 5{,}67 \times 10^{-3} M_w^{0,63} \qquad [61]$$

Précédemment, les paramètres de branchements d'amylopectine et de glycogène ont été déterminées par AF4-MALLS-DRI (Rolland-Sabaté *et al*., 2007) et sont représentés dans le Tableau 43.

Tableau 43 – Paramètres de branchement comme proposé par Burchard (1977, 1983).

	g_M
Amylopectine[a] (maïs normal)	0,030
Glycogène[a] (foie de lapin)	0,012
Alternane	0,010

[a] Rolland-Sabaté *et al*., 2007

Le facteur de branchement moyen g_M de l'alternane est proche du glycogène pouvant indiquer un branchement important. En effet, Seymour *et al*. (1979) avait estimé un branchement de l'ordre de 11% par la présence d'unités glucoses disubstituées en position 3 et 6. La Figure 92a représente le facteur de branchement g_i pour chaque fraction i en fonction de la masse molaire de l'alternane superposé aux valeurs de différents polysaccharides déterminées par Rolland-Sabaté *et al*. (2008). Cette figure montre que l'alternane est superposé au glycogène de foie de lapin mais avec des pentes inversées. Il en est de même pour la Figure 92b représentant la densité en fonction de la masse molaire.

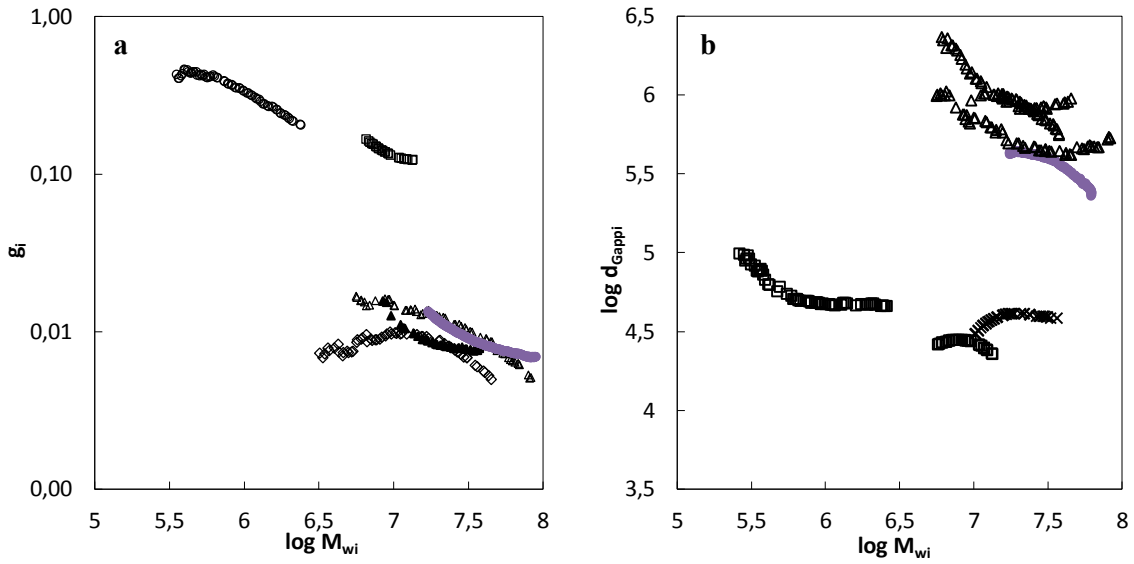


Figure 92 – a. Paramètre de branchement g_i en fonction de la masse molaire de l'alternane (violet). b. densité d_{Gappi} en fonction de la masse molaire. (données supplémentaires : dextrane D3 (○) ; dextrane D5 (□) ; amylopectine (×) ; glycogène d'huître (◊) ; glycogène de foie de lapin (Δ) ; phytoglycogène (▲) (Rolland-Sabaté *et al*., 2008)).

De par cette étude, nous pouvons estimer que l'alternane pourrait présenter un taux de ramification supérieur à celui de l'amylopectine (5 à 6%) pouvant être semblable à celui du glycogène (8 à 15%) bien qu'un équivalent linéaire de type amylose a été utilisé pour ces calculs et qu'une erreur est commise. Ces interprétations sont toutefois en accord avec une valeur de 11% déterminée par Seymour *et al.* (1979).

Rolland-Sabaté *et al.* (2008, 2014) ont montré qu'un glycogène branché à 8% dans des conditions de bon solvant à un facteur de structure ρ de 0,778 (sphère dense) et une dimension fractale d_{fg}, correspondant à l'inverse de υ_G, entre 2,4 et 2,8. Pour l'alternane, ces valeurs sont comprises entre 0,92 et 0,76 et entre 1,7 et 2,6 respectivement, pour ρ et d_{fg}, indiquant une structure proche de la sphère dense comme celle du glycogène (Burchard, 1999). Cependant il est difficile de proposer une structure plus précise à ce stade. Des analyses de perméthylation sont en cours afin de confirmer cette structure branchée de l'alternane. Une étude du nombre d'unité glucosyles présentes entre chaque point de branchement pourrait être envisagée par différentes techniques d'hydrolyse : par l'action d'enzymes spécifiques d'un type de liaison, par hydrolyse acide qui va couper les chaînes au hasard ou bien par ultrasonication qui vont couper les chaînes linéaires au milieu.

3.2.Propriétés rhéologiques de l'alternane

Le comportement viscoélastique de l'alternane a été étudié et comparé à celui du dextrane D1-3B37 du *Chapitre 3* à une même concentration de 10% (p/v) (Figure 93a) car présentant des masses molaires de même ordre de grandeur et des types et taux de liaisons osidiques similaires. Cette figure montre que les valeurs de module conservatif (G') du dextrane D1-3B2 et de l'alternane à 10% p/v sont toujours supérieures aux valeurs de module dissipatif (G'') sur la gamme de fréquence étudiée et que les modules varient en fonction de la fréquence. Aucun plateau n'est observé aux faibles fréquences et il semblerait y avoir le point de croisement des deux modules. Les mêmes allures de courbes sont observées dans les deux cas, les modules de l'alternane étant toutefois plus de 100 fois inférieurs à ceux du dextrane D1-3B2. Ceci s'explique par la différence de densité moléculaire apparente entre ces deux échantillons. La densité de l'alternane est en effet plus de 40 fois supérieure à celle du dextrane D1-3B2.

La Figure 93b montre l'évolution des modules conservatifs G' et dissipatifs G'' de l'alternane en fonction de la concentration. Les modules rhéologiques augmentent avec la concentration et G' est toujours supérieur à G'' sur toute la gamme de fréquence sauf dans le cas de la concentration de 15% (p/v) où il semble y avoir un changement de structure. A 5 et 10%, G' > G'' et tan $\delta > 0,3$ sur toute la gamme de fréquence ce qui est caractéristique d'un gel faible. Un changement de structure est observé avec une solution à 15%. La concentration d'enchevêtrement C^*_{RG}, calculée d'après les grandeurs déterminées précédemment, est de 0,32 $g.mL^{-1}$ soit 32% (p/v). Cette concentration C^*_{RG} calculée est de même ordre de grandeur que les observations faites en rhéologie. Lorsque la concentration en alternane est de 20 ou 30%, G' > G'', G' est indépendant de la fréquence et tan $\delta < 0,1$ suggérant un gel principalement élastique. Ce comportement a été observé pour des gels de carraghénane (Ikeda & Nishinari, 2001).

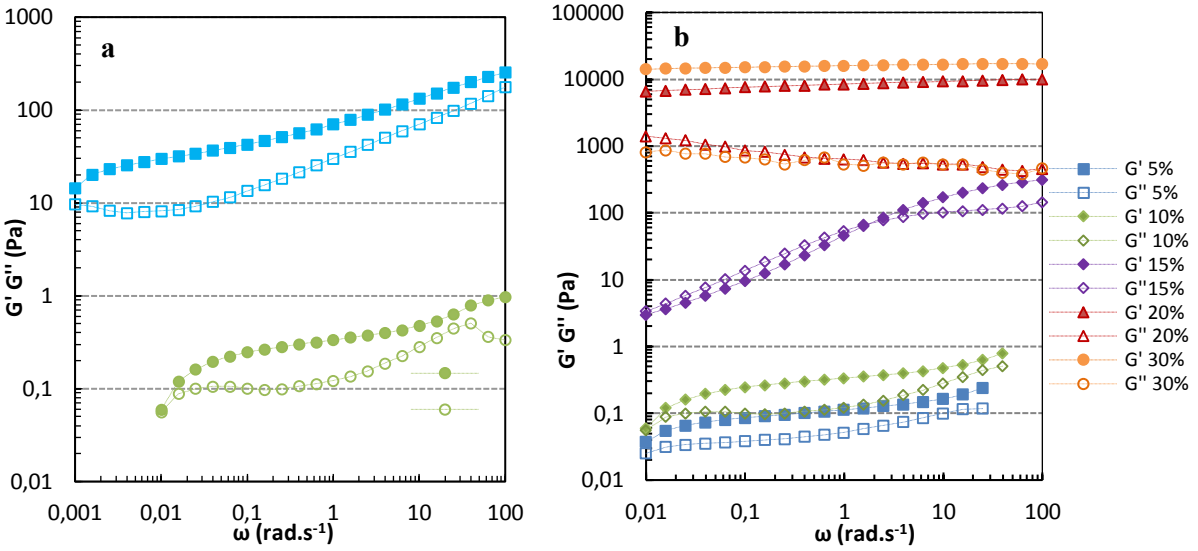


Figure 93 - Propriétés rhéologiques de l'alternane à différentes concentrations à 25 °C. a. Comparaison des spectres mécaniques de l'alternane (vert) et du dextrane D1-3B37 (bleu) (*Chap. 3*) (bleu) présentant les modules conservatifs (G') et dissipatifs (G'') à 10% (p/v). **b.** Evolution des spectres mécaniques de l'alternane en fonction de la concentration (5%, 10%, 15%, 20% et 30%).

3.3.Structure cristalline de l'alternane

La poudre d'alternane analysée par diffraction des rayons X dans son état de réception, c'est-à-dire après lyophilisation, est amorphe. Une étude plus approfondie de diffraction des rayons X, simultanément à un balayage en température de 20 à 150 °C en milieu hermétique, a ensuite été réalisée afin d'observer d'éventuelles transitions de phases. Il apparaît que l'alternane amorphe à température ambiante cristallise aux alentours de 80 °C (Figure 94).

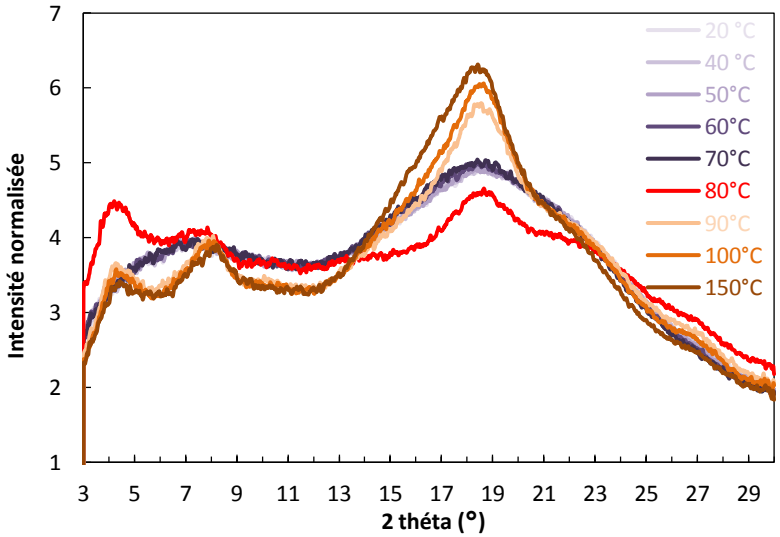


Figure 94 – Profil de diffraction des rayons X à gradient de température de 20 °C à 150 °C de l'alternane.

Cependant, cette structure cristalline n'est pas décrite dans la littérature pour l'alternane. Aucune cristallisation n'a été observée dans le cas des glycogènes qui comportent des chaînes pendantes trop courtes. Si la structure de l'alternane permet une cristallisation, alors certaines zones de la molécule doivent s'arranger pour permettre un alignement des chaînes et une cristallisation à température relativement basse (80°C). Cela impliquerait en particulier la présence de chaînes linéaires suffisamment longues.

3.4.Propriétés thermiques de l'alternane

La teneur en eau de l'alternane, préalablement conditionné et équilibré à 59 % HR et analysé par TGA, est de 13,8 % (légèrement supérieure à celles des dextranes étudiés précédemment) (Tableau 44). A cette teneur en eau, l'alternane présente une T_g de 56,3 °C et une température de recristallisation T_c de 77,9 °C (Figure 95). Alors que la T_g est sensiblement identique aux dextranes de DSR-OK, la recristallisation a lieu à plus basse température (77,9 °C vs ~120 °C) juste à la « sortie » de T_g. Cela rend difficile la détermination de la ligne de base pour l'évaluation des températures et de l'enthalpie de cristallisation. En revanche, aucune température de fusion n'est observée.

Tableau 44 - Caractéristiques thermiques de l'alternane obtenues par DSC.

Echantillon	Teneur en eau (%)	T_g (°C)	ΔCp ($J.g^{-1}.K^{-1}$)	T_c (°C)	ΔH_c ($J.g^{-1}$)	Tf (°C)
Alternane	13,8	56,3	0,470	77,9	5,0	-

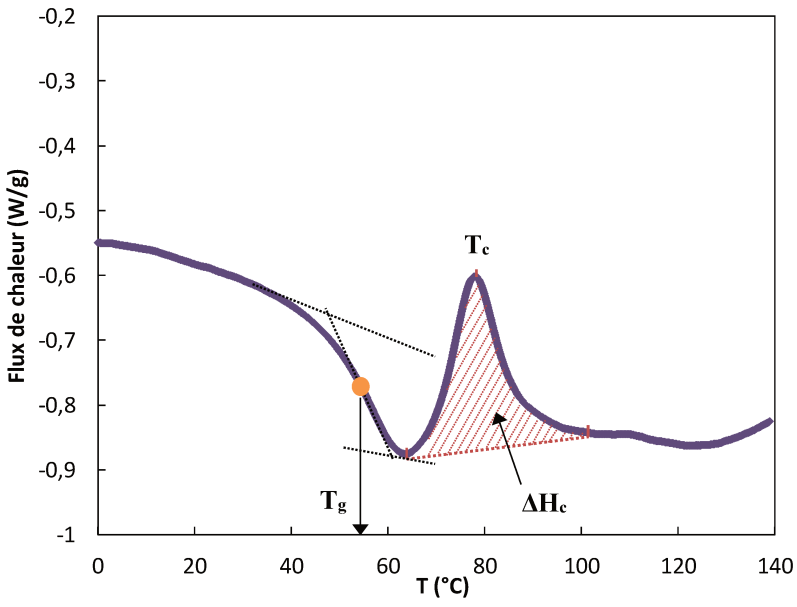


Figure 95 – Thermogramme de l'alternane obtenu par DSC entre 0 et 140 °C.

3.5.Propriétés mécaniques de l'alternane

Des films d'alternane à 2% et 4% ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour les dextranes des *Chapitres 3 et 4*. Il s'est avéré que l'alternane n'est pas filmogène, c'est-à-dire qu'aucun film qui se maintient n'a été obtenu (Figure 96). Ceci est directement lié à sa forte densité empêchant les interactions intermoléculaires.

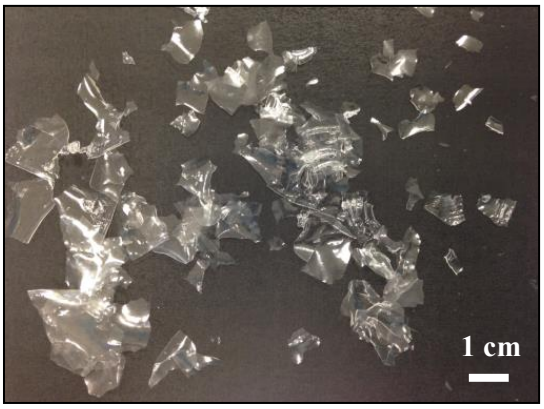


Figure 96 – Morceaux de film d'alternane préparés par casting à 40 °C.

4. *α*-glucanes produits par GS-X

Deux polysaccharides ont été produits à partir d'une enzyme GS-X de bactérie d'acide lactique produisant un *α*-glucane mixte (= différents types de liaisons osidiques) dont la structure n'est pas connue et est toujours en cours d'analyse/traitement. Dans le premier cas, l'enzyme GS-X a été purifiée et a abouti à l'*α*-glucane A/GS-X. Dans le second cas, l'enzyme GS-X n'a pas été purifiée et a abouti à l'*α*-glucane B/GS-X. Ces deux polysaccharides ont été identifiés comme ayant des propriétés mécaniques potentiellement intéressantes. Le but était de déterminer les propriétés de ces nouveaux polysaccharides et de voir si l'enzyme GS-X avait un intérêt à être purifiée, la purification de l'enzyme étant fastidieuse et coûteuse. La présence de liaisons osidiques $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$ a été montrée par RMN ^{1}H mais leurs proportions n'ont pas encore été déterminées.

4.1. Taille et conformation en solution des *α*-glucanes produits par GS-X

Tout d'abord, la structure macromoléculaire en solution a été investiguée par AF4-UV-MALLS-DRI. Les résultats sont représentés dans le Tableau 45.

Tableau 45 - Données structurales des échantillons produits par GS-X.

Echantillon	Rdt solubilisation (%)	Rdt élution (%)	$\bar{M}_w$ x 10^8 ($g.mol^{-1}$)	$\bar{R}_G$ (nm)	$\bar{\upsilon}_G$	$\overline{d_{Gapp}}$ ($g.mol^{-1}.nm^{-3}$)
A/GS-X	58	100	4,6	389	0,41	3,2
B/GS-X	45	100	15,7	448	0,26	9,4

Les rendements de solubilisation sont de 58% et 45% pour les échantillons A/GS-X et B/GS-X respectivement (Tableau 45). La moitié de l'α-glucane a été retenu sur le filtre de 0,45 µm ce qui indique que l'échantillon est constitué de très grosses particules voire agrégé en milieux aqueux. En revanche, il n'y a pas eu de phénomènes de rétention sur la membrane, les rendements d'élution étant de 100% pour les deux échantillons.

Les fractogrammes présentent la même allure générale avec un pic symétrique majoritaire éluant autour de 33 mL (Figure 97a, b). On observe un décalage du signal de diffusion de la lumière vers les forts volumes d'élution pour B/GS-X indiquant que celui-ci à un volume hydrodynamique plus important que A/GS-X. Seul le signal de diffusion de la lumière est représenté puisqu'un faible signal réfractométrique a été obtenu (proche du bruit de fond) du fait de la faible quantité injectée. S'ils étaient injectés en plus grande quantité, il y avait un mauvais fractionnement de l'échantillon. Aucun signal UV à 280 nm n'a été détecté signifiant que peu ou pas de protéines sont présentes dans l'échantillon. Les M_w des échantillons s'étendent de 1.10^8 $g.mol^{-1}$ jusqu'à 4.10^{11} $g.mol^{-1}$ et ont été moyennées sur la totalité du pic (Figure 97a). Les valeurs de $\overline{M_w}$ et $\bar{R}_{Gz}$ sont de $4{,}6.10^8$ $g.mol^{-1}$ et $15{,}7.10^8$ $g.mol^{-1}$ et 389 nm et 448 nm pour A/GS-X et B/GS-X respectivement (Tableau 45), ce dernier échantillon étant plus gros et massif. Le mécanisme d'action de l'enzyme GS-X n'est pas connu. Lorsque celle-ci n'est pas purifiée, alors il y a compétition entre l'enzyme GS-X et d'autres enzymes actives venant modifier la structure du reutérane.

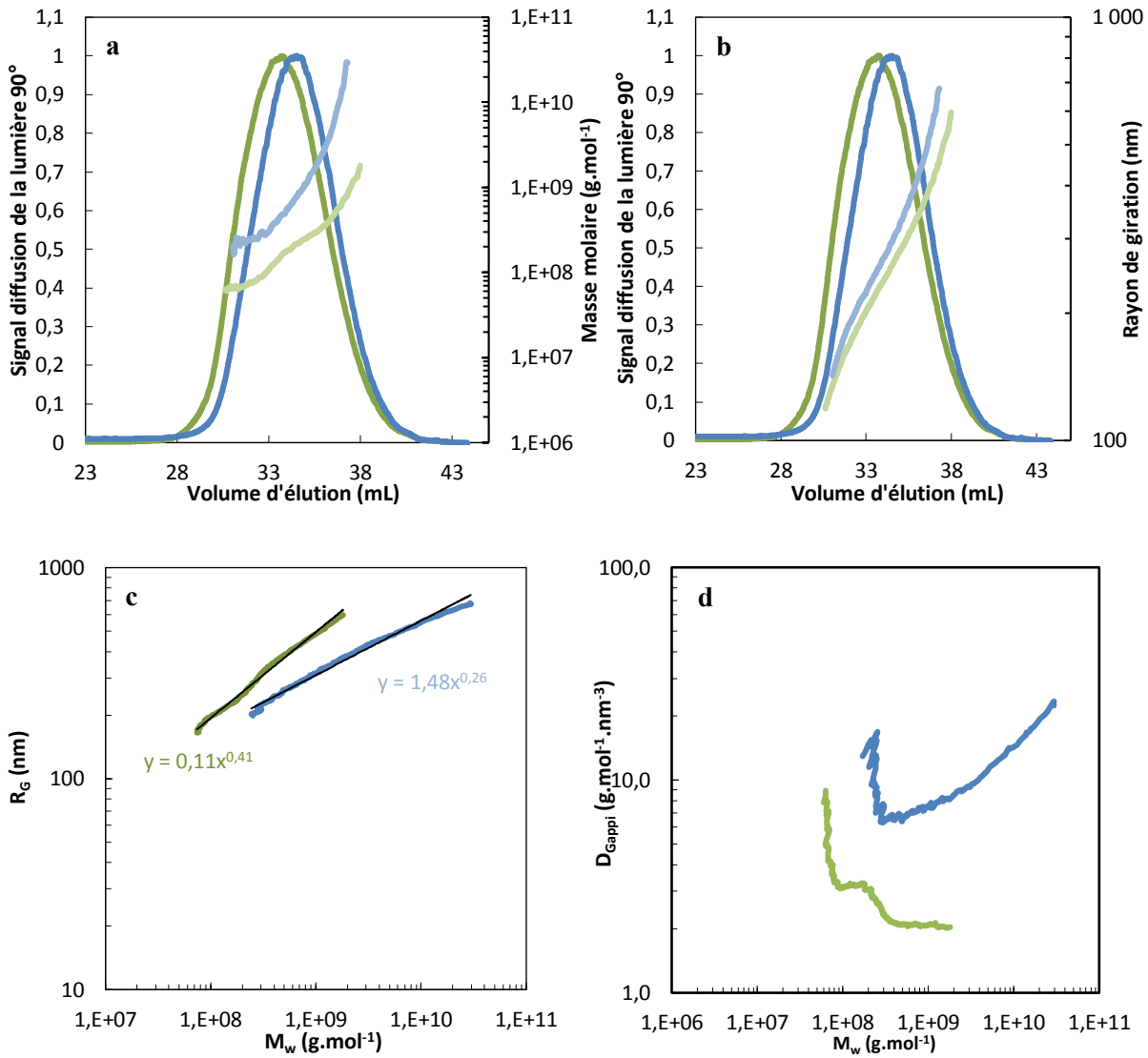


Figure 97 - Caractéristiques moléculaires de deux *α*-glucanes produits par l'enzyme GS-X purifiée et non purifiée (A/GS-X : vert ; B/GS-X : bleu) en solution dans l'eau déterminé par AF4-MALLS-DRI. a. Signal de diffusion de la lumière à 90° et masse molaire en fonction du volume d'élution. **b.** Signal de diffusion de la lumière à 90° et rayon de giration en fonction du volume d'élution. **c.** Rayon de giration en fonction de la masse molaire **d.** Densité apparente en fonction de la masse molaire.

Les densités moléculaires apparentes $\overline{d_{Gapp}}$ varient entre 3,2 et 9,4 g.mol^{-1}.nm^{-3} pour A/GS-X et B/GS-X respectivement (Tableau 45). Ces valeurs de densité sont plus faibles que celles déterminées pour les dextranes du *Chapitre 3* mais restent du même ordre de grandeur. Des valeurs de faibles densités sont reportées dans la littérature et correspondaient à des structures de type dextrane commercial fortement branché (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008). Dans le cas de A/GS-X, la densité diminue avec la masse molaire qui augmente. Un saut est observé signifiant que plusieurs populations sont présentes. La densité moléculaire de B/GS-X augmente avec la masse molaire correspondant à un état agrégé des molécules (comme dans le cas des dextranes de DSR-OK du *Chap. 3*). Ces faibles densités sont en accord avec les images de A/GS-X et B/GS-X en solution à 2 mg.mL^{-1} obtenus par MET (Figure 98). Des particules

sphériques de grosses tailles et polydisperses sont observées avec un diamètre apparent allant de 100 à 500 nm en accord avec les résultats obtenus par AF4-UV-MALLS-DRI. Ces images sont semblables à celles obtenues avec les dextranes de DSR-OK (*Chap. 3*) : particules sphériques, polydisperses, le contraste noir absorbé par les particules potentiellement agrégées est en accord avec une faible densité apparente.

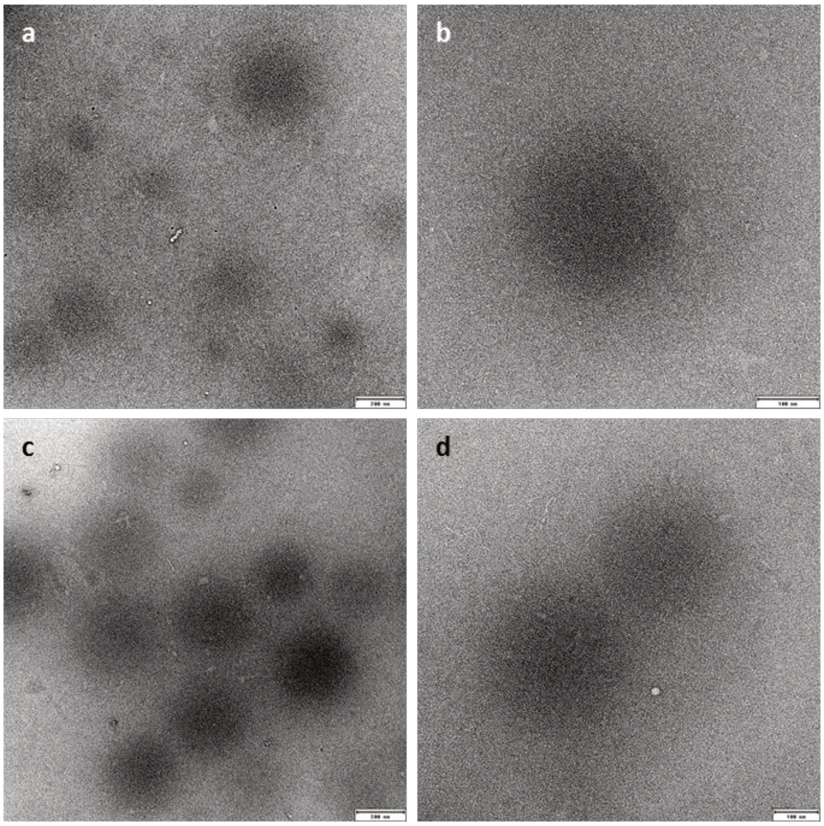


Figure 98 - Images de MET par coloration négative obtenus des solutions de A/GS-X (a, b) et de B/GS-X (c, d) à 2 mg.mL^{-1}.

Le ν_G moyen de du reutérane A/GS-X solubilisé dans l'eau sur l'ensemble de la distribution est de 0,41, indiquant une conformation entre la sphère dense (0,33) et la pelote statistique (0,5−0,6) (Figure 97c). Cependant, plusieurs sauts sont observés indiquant une hétérogénéité structurale et la présence de plusieurs populations. Une valeur de ν_G de 0,26 a été déterminée pour le reutérane B/GS-X traduisant un état agrégé (Figure 97c). Ces deux reutéranes ne présentent pas les mêmes caractéristiques pouvant s'expliquer par l'action d'enzymes actives présentes avec l'enzyme GS-X non purifiée.

4.2. Propriétés rhéologiques des *α*-glucanes produits par GS-X

Le comportement viscoélastique de solutions à 2% (p/v) de ces deux reutéranes, A/GS-X et B/GS-X a été étudié (Figure 99a). Ces deux *α*-glucanes ont un comportement en solution différent. En effet, les

valeurs de modules aux fortes fréquences sont semblables pour ces deux échantillons (G' ~ 10 Pa et G'' ~ 4 Pa) mais différent aux faibles fréquences. Pour A/GS-X, aux faibles fréquences, G'' > G' et un croisement des modules a lieu à une fréquence de 0,2 rad.s^{-1}. Au-delà de 0,2 rad.s^{-1}, G' > G''. Ces observations caractérisent un comportement de type solution macromoléculaire. Le spectre mécanique du reutérane B/GS-X a la même allure que ceux des dextranes produits par l'enzyme DSR-OK (*Chap. 3*). G' et G'' varient avec la fréquence et G' est toujours supérieur à G'' sur la gamme de fréquence étudiée. Les valeurs de modules sont très proches des valeurs obtenues avec les dextranes du *Chapitre 3* (à 1 rad.s^{-1} : $G'_{DSR\text{-}OKs}$ = 1,5-9,8 Pa suivant le dextrane considéré et $G'_{B/GS\text{-}X}$ = 5,3 Pa). De plus, tan δ > 0,3 sur toute la gamme de fréquence ce qui est caractéristique d'un gel faible.

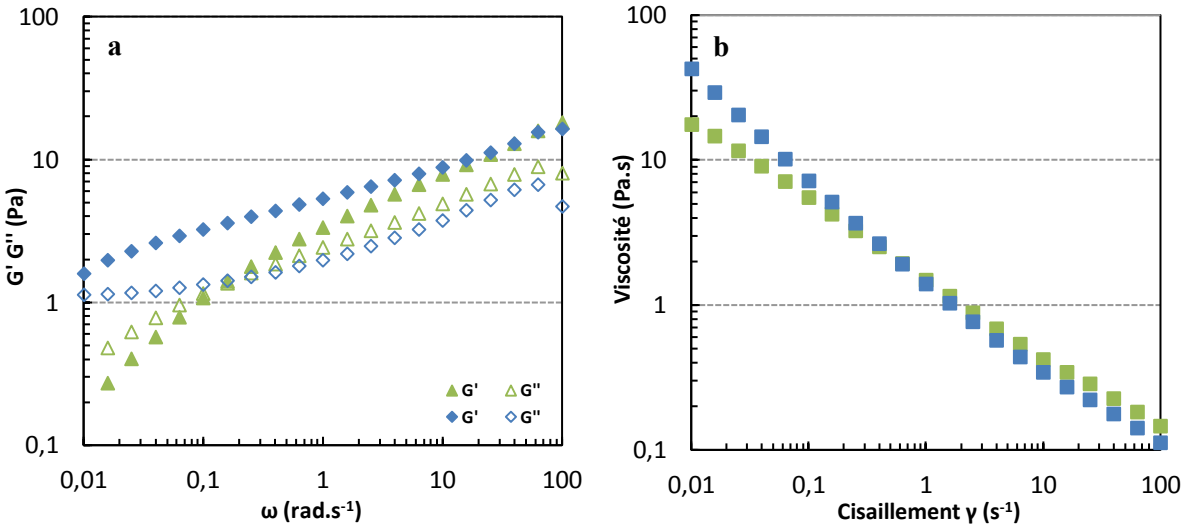


Figure 99 - Propriétés rhéologiques des *α*-glucanes A/GS-X (vert) et B/GS-X (bleu). a. Spectre mécanique présentant les modules conservatifs (G') et dissipatifs (G'') avec une déformation appliquée de 2%. **b.** Viscosité η en fonction de la vitesse de cisaillement γ.

Les courbes d'écoulements de ces deux *α*-glucanes sont présentées sur la Figure 99b et montre un comportement rhéo-fludifiant. Aucune contrainte seuil n'a été mise en évidence indiquant que les échantillons coulent sans qu'il y ait besoin d'appliquer une contrainte minimale. La viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente. Ce type de comportement a été observé dans le cas des dextranes obtenus à partir de l'enzyme DSR-OK (*Chap. 3*) et peut être attribué à des macromolécules entremêlées pouvant s'aligner avec le champ de contrainte dans le sens de l'écoulement.

4.3. Structure cristalline des *α*-glucanes produits par GS-X

Ces deux *α*-glucanes ont été caractérisés à l'état de poudre par diffraction des rayons X. Ils sont tous les deux amorphes (Figure 100).

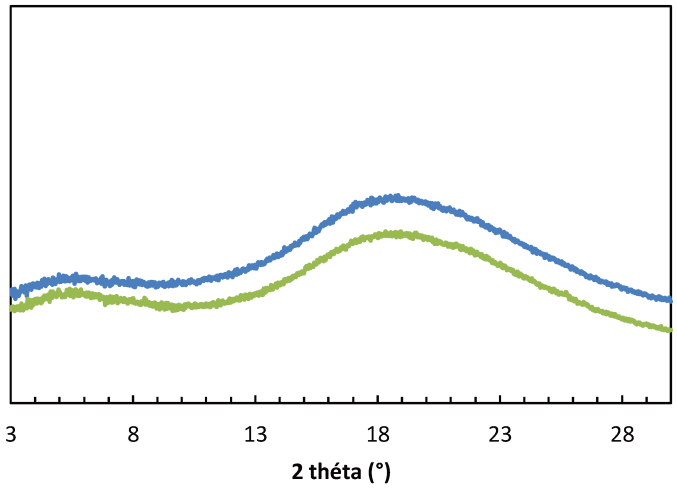


Figure 100 - Diffractogrammes des échantillons A/GS-X (vert) et B/GS-X (bleu) obtenus par diffraction des rayons X.

4.4. Propriétés thermiques des *α*-glucanes produits par GS-X

Les propriétés thermiques de ces deux *α*-glucanes ont été investiguées par DSC et TGA (Figure 101). Les valeurs de température de transition vitreuse ont été déterminées à 74,8 °C pour 12% d'eau et 71 °C pour 11,6 % d'eau respectivement pour A/GS-X et B/GS-X. Aucune recristallisation de ces échantillons n'a été observée. L'épaulement du signal visible aux alentours de 190 °C correspond à la dégradation de l'échantillon, observable à l'ouverture de la capsule DSC.

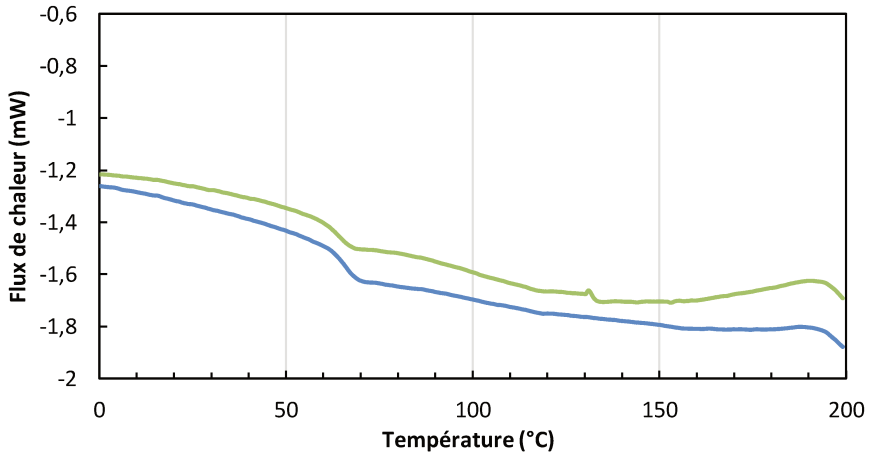


Figure 101 - Thermogrammes obtenus entre 0 et 200 °C des échantillons A/GS-X (vert) et B/GS-X (bleu) conditionnés à RH 59%.

4.5.Propriétés mécaniques des *α*-glucanes produits par GS-X

Des films ont été obtenus par casting afin de déterminer les propriétés mécaniques aux grandes déformations de ces deux *α*-glucanes. Des répétitions de traction de ces films ont été réalisées, les courbes contrainte en fonction de l'allongement sont présentées dans la Figure 102.

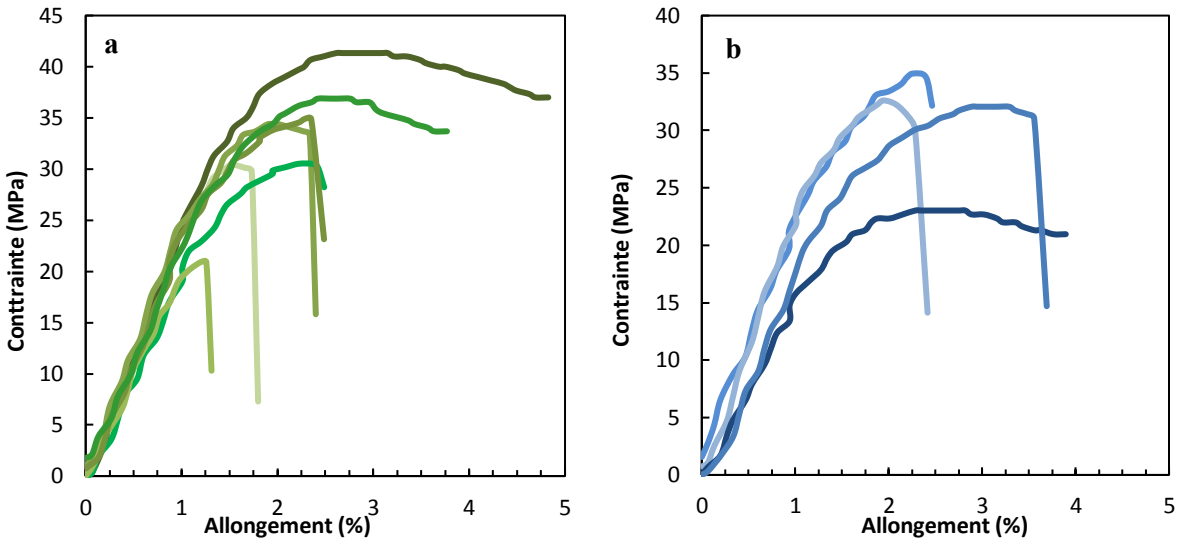


Figure 102 – Propriétés mécaniques aux grandes déformations de films d'α-glucanes produits avec l'enzyme GS-X et obtenus par casting. a. A/GS-X. **b.** B/GS-X.

La Figure 102 montre une hétérogénéité de rupture des films d'α-glucanes produits avec l'enzyme GS-X, hétérogénéité souvent rencontrée dans le cas de films de biopolymères. Le module d'Young E de A/GS-X est de 2220 ± 190 MPa et celui de B/GS-X est de 1900 ± 350 MPa ce qui signifie que la rigidité du film A/GS-X est légèrement supérieure à celle du film de B/GS-X (Tableau 46). Les contraintes à la rupture sont relativement proches avec 32 ± 6 MPa et 29 ± 4 MPa pour A/GS-X et B/GS-X, respectivement. L'allongement à la rupture est en revanche plus important pour le film de B/GS-X soit 2,8 ± 0,6% contre 1,9 ± 0,6% pour le film de A/GS-X. Le comportement mécanique qui révèle une rupture dans le domaine plastique est différent de celui des autres polysaccharides étudiés avec une rupture dans le domaine fragile.

Tableau 46 – Modules d'Young E, contraintes à la rupture et allongements à la rupture des films d'*α*-glucanes produits à partir de l'enzyme GS-X.

	Module d'Young E (MPa)	Contrainte (MPa)	Allongement (%)
A/GS-X	2220 ± 190	32 ± 6	1,9 ± 0,6
B/GS-X	1900 ± 350	29 ± 4	2,8 ± 0,6

En revanche, les valeurs de module d'Young E et de contrainte à la rupture de ces films d'*α*-glucanes sont jusqu'à plus de deux fois inférieures aux valeurs trouvées pour les films de dextranes des *Chapitres 3 et 4* ($E_{D1\text{-}3B5}$ = 4 700 MPa ; E_{D500} = 3 400 MPa). Or, nous avons vu précédemment que les impuretés de synthèse ont un rôle important sur les propriétés mécaniques ; il sera important de connaître leur proportion afin de pouvoir conclure sur ce point.

5. Mutanes

Les mutanes ont été produits à partir des enzymes GTF-J et GTF-Si et contiennent 100% de liaisons *α*(1→3) pour le mutane GTF-J et 75% de liaisons *α*(1→3) et 25% de liaisons *α*(1→6) pour le mutane GTF-Si d'après les mesures de RMN ^{1}H. Le mutane GTF-J s'est avéré insoluble dans l'eau même après avoir chauffé la solution à 80°C. Le mutane GTF-Si était en partie soluble dans l'eau malgré la persistence d'une petite partie insoluble. En revanche, ils étaient tous les deux solubles dans le DMSO et dans KOH 1M. N'ayant pas à disposition de chaîne chromatographique fonctionnant en solvant organique tel que le DMSO, ces mutanes ont été caractérisés par HPSEC-MALLS-DRI avec un éluant KOH 0,1M mais leurs masses molaires n'ont pas pu être déterminées du fait de la non répétabilité des données. Les chromatogrammes ne sont donc pas représentés. Il est probable que KOH 1M ait hydrolysé en partie les mutanes provoquant cette mauvaise répétabilité.

Les poudres de mutanes analysées par diffraction des rayons X, dans leur état de réception, sont semi-cristallines (Figure 103). Ceci peut expliquer leur insolubilité dans l'eau. Le mutane GTF-J présente une cristallinité à 15% et le spectre obtenu n'est pas référencé dans la littérature. Le mutane GTF-Si présente une cristallinité de 25 % et le spectre obtenu est semblable à celui du dextrane M-100 (*Chap. 4*) cependant, il ne correpond ni au polymorphe haute température ni au polymorphe basse température connus pour les dextranes (Chanzy *et al*., 1980 et 1981). La présence de cette signature spectrale dans le mutane GTF-Si peut signifier que l'enzyme a pu synthétiser des chaînes de dextranes linéaires uniquement constituées de liaisons *α*(1→6) ce qui peut expliquer la présence de liaisons *α*(1→6) à hauteur de 25% dans cet échantillon.

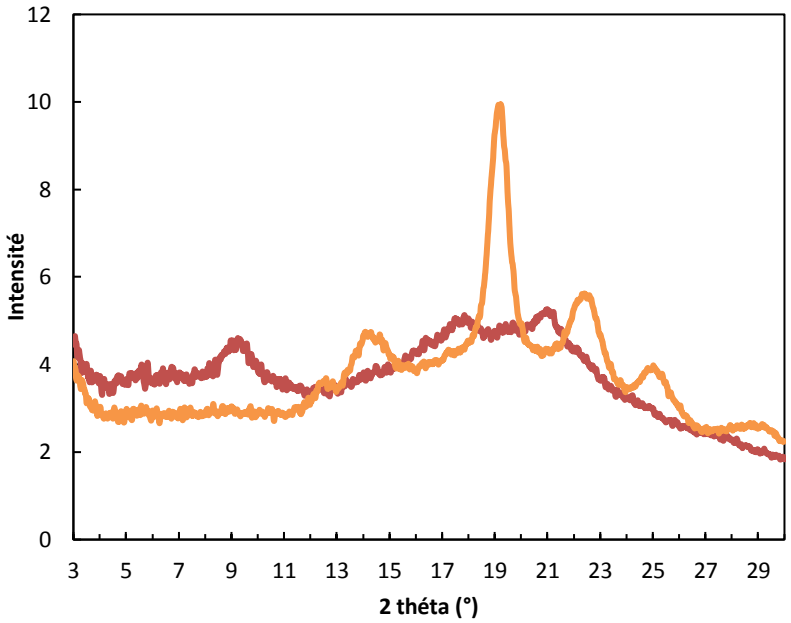


Figure 103 - Spectre de diffraction des rayons X du mutane obtenu par GTF-J (rouge) et GTF-Si (orange).

Après avoir fait un balayage en température de 0 à 120 °C, aucune température de transition vitreuse ni de recristallisation n'ont pu être déterminées sur les thermogrammes de ces deux mutanes. Comme nous l'avons constaté pour le dextrane M-100, une température de fusion est en revanche observée à 36,7 °C pour 10,8 % d'eau pour le mutane GTF-Si ($T_{f\,M\text{-}100}$ = 48,6 °C pour 9,1% d'eau) (Figure 104).

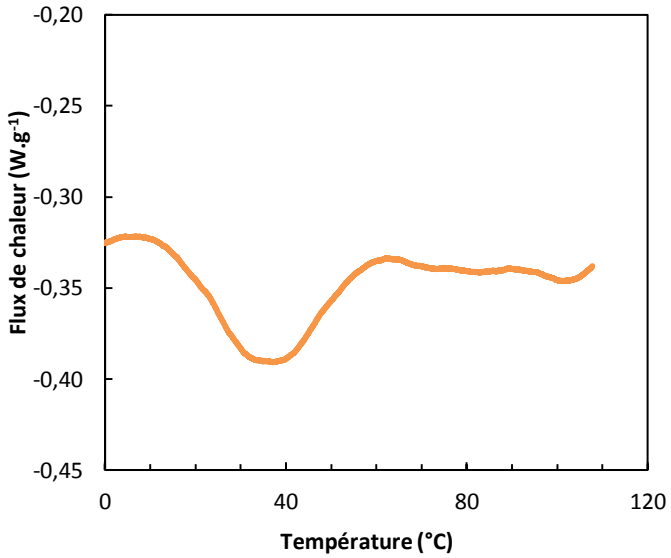


Figure 104 – Thermogramme du mutane GTF-Si obtenu entre 0 et 120 °C.

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ce travail était de déterminer les caractéristiques macromoléculaires et les propriétés de divers α-glucanes produits par synthèse enzymatique et possédant divers types et/ou taux de liaisons osidiques dans la chaîne principale ou dans les branchements. Cette approche avait pour but de cibler des blocs aux propriétés contrastées afin d'envisager l'obtention de copolymères originaux. Pour cela, des dextranes de différentes masses molaires allant de $1{,}5.10^4$ à $4{,}35.10^9$ g.mol^{-1} et possédant divers taux de branchement (de 2 à 47%) en position $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow2)$ ont été synthétisés et étudiés puis comparés à d'autres polysaccharides tel que l'alternane, les mutanes ou bien encore les reutéranes. Les caractéristiques macromoléculaires de tous les α-glucanes, mutanes exceptés, ont été étudiées par couplage AF4-MALLS-DRI car cette technique est plus adaptée à leur taille élevée ; ils ne pouvaient pas en effet, dans la majorité des cas, être caractérisés par un système de chromatographie classique comme l'HPSEC.

La première partie de ce travail a été de développer des méthodes permettant le fractionnement et la caractérisation des α-glucanes notamment pour les masses molaires très élevées comme les dextranes produits par l'enzyme DSR-OK, l'alternane produit par l'enzyme ASR et les reutéranes produits par l'enzyme GS-X. Ainsi, leur distribution en masse molaire, en taille et leur conformation en solution ont été déterminées. Les rayons de giration moyens n'ont pas pu être déterminés pour les dextranes obtenus à partir de l'enzyme DSR-M et pour les dextranes branchés à partir du dextrane commercial D500 du fait de leur rayon de giration trop faible, non accessible par diffusion de la lumière statique. La Figure 105 montre la dispersion des échantillons étudiés en fonction de leurs masses molaires et de leurs rayons de giration.

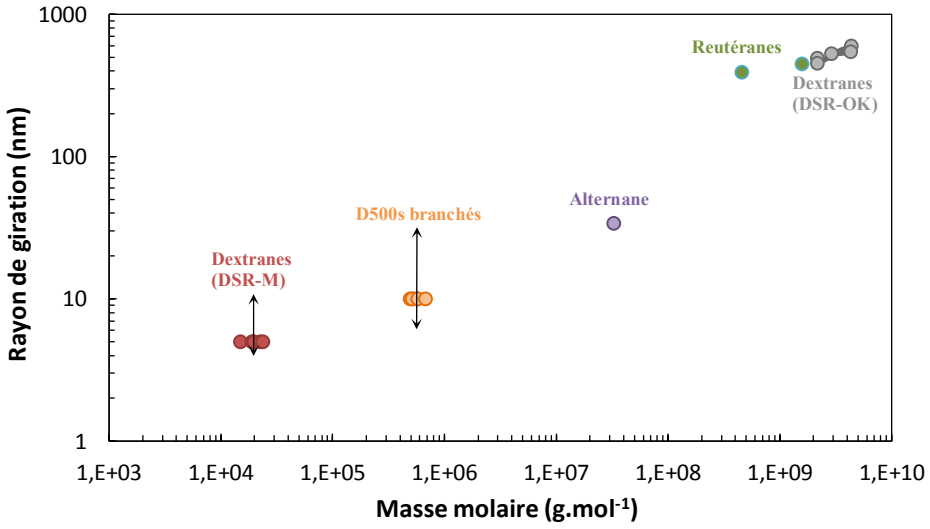


Figure 105 - Rayons de giration en fonction de la masse molaire des α-glucanes dans l'eau.

Tableau 47 – Bilan des caractéristiques des échantillons du projet produits par synthèse enzymatique.

	α-glucanes	*Enzymes*	Liaisons osidiques			Solubilité dans l'eau	Caractéristiques en solution				Comportement rhéologique	Structure	Propriétés thermiques			Filmabilité	Propriétés mécaniques films	
			α(1→6)	α(1→3)	α(1→2)		$\bar{M}_w$ (g.mol^{-1})	$\bar{R}_G$ (nm)	ν_G	$\overline{d_{Gapp}}$ (g.mol^{-1}.nm^{-3})			Teneur en eau (%)	T_g (°C)	T_c (°C)		E (GPa)	σ (MPa)
	Dextranes																	
Chapitre 3	D1-3B2	**DSR-OK**	98	2	0	+	2,16.10^9	489	<0,33	5,7	gel faible	amorphe	14,1	40,5	112,1	+	3,2	
	D1-3B5	+ BRS-A	95	5	0	+	2,19.10^9	451	<0,33	7,0	gel faible	amorphe	12,2	63,2	143,4	+	2,5	
	D1-3B37	+ BRS-A	63	37	0	+	4,35.10^9	599	<0,33	7,6	gel faible	amorphe	11,2	53,2	115,8	+	2,3	
	D1-2B10	+ BRS-BΔ1	88	2	10	+	2,89.10^9	526	<0,33	6,7	gel faible	amorphe	12,5	60,6	-	+	3,8	
	D1-2B28	+ BRS-BΔ1	70	2	28	+	4,30.10^9	542	<0,33	8,5	gel faible	amorphe	12,8	43,0	-	+	3,8	
Chapitre 4	D500	**Commercial**	96	4	0	+	4,95.10^5				sol.mac	amorphe	11,6	62,6	130,4	+	3,4	26
	D500-3B8	+ BRS-A	92	8	0	+	5,27.10^5	~ 26	0,5-	~ 30	sol.mac	amorphe	12,8	54,8	-	+	4,0	26
	D500-3B21	+ BRS-A	79	21	0	+	5,70.10^5		0,33		sol.mac	amorphe	13,5	47,0	-	+	3,1	17
	D500-2B8	+ BRS-BΔ1	88	4	8	+	5,16.10^5	(M_w>	(M_w>	(M_w>	sol.mac	amorphe	12,8	58,1	-	+	4,0	20
	D500-2B19	+ BRS-BΔ1	77	4	19	+	5,80.10^5	3.10^5)	3.10^5)	3.10^5)	sol.mac	amorphe	12,9	59,2	-	+	3,5	20
	D500-2B32	+ BRS-BΔ1	64	4	32	+	6,73.10^5				sol.mac	amorphe	11,9	57,8	-	+	2,8	10
Chapitre 5	M-100	**DSR-M**	100	0	0	-	1,50.10^4	<10	n.d.	n.d.	n.d.	cristallin	9,1	T_f = 48,6		-		
	M-3B19	+ BRS-A	81	19	0	+	1,89.10^4	<10	n.d.	n.d.	n.d.	amorphe	13,9	43,8	-	-		
	M-3B29	+ BRS-A	71	29	0	+	1,97.10^4	<10	n.d.	n.d.	n.d.	amorphe	13,9	42,3	-	-		
	M-3B47	+ BRS-A	53	47	0	+	2,26.10^4	<10	n.d.	n.d.	n.d.	amorphe	14,1	37,8	-	-		
	M-2B34	+ BRS-BΔ1	66	0	34	+	2,37.10^4	<10	n.d.	n.d.	n.d.	amorphe	13,7	44,2	-	-		
Chap.5	**Alternane**																	
	Alternane	**ASR**	62	38	0	+	3,25.10^7	33,9	0,46	225,9	gel fort	amorphe	13,8	56,3	77,9	-		
Chap. 5	**α-glucanes X**																	
	A/GS-X	**GS-X pur.**	?	?	?	+	4,6.10^8	389	0,41	3,2	sol.mac	amorphe	12,0	74,8	-	+	2,2	32
	B/GS-X	**GS-X non pur.**	?	?	?	+	1,57.10^9	448	0,26	9,4	gel faible	amorphe	11,6	71,0	-	+	1,9	29
Chap. 5	**Mutanes**																	
	Mutane-A	**GTF-J**	0	100	0	-			n.d.	n.d.	n.d.	cristallin	-	-	-	-		
	Mutane-B	**GTF-Si**	25	75	0	-			n.d.	n.d.	n.d.	cristallin	-	T_f = 36,7		-		

Le Tableau 47 récapitule toute les caractéristiques déterminées sur ces α-glucanes au cours de ce projet de recherche.

1. Conformation en solution et solubilité des α-glucanes

En ce qui concerne la conformation en solution aqueuse des polysaccharides, nous allons nous intéresser aux dextranes produits par l'enzyme DSR-OK, aux reutéranes et à l'alternane puisque leur conformation en solution a pu être déterminée. Comme l'ont montré les images obtenues par MET, ces trois types de polysaccharides sont sphériques en solution, et présentent une forme bien définie dans le cas de l'alternane et moins bien définie dans le cas des dextranes et des reutéranes. La Figure 105 montre que les reutéranes et les dextranes obtenus à partir de l'enzyme DSR-OK ont des tailles relativement proches.

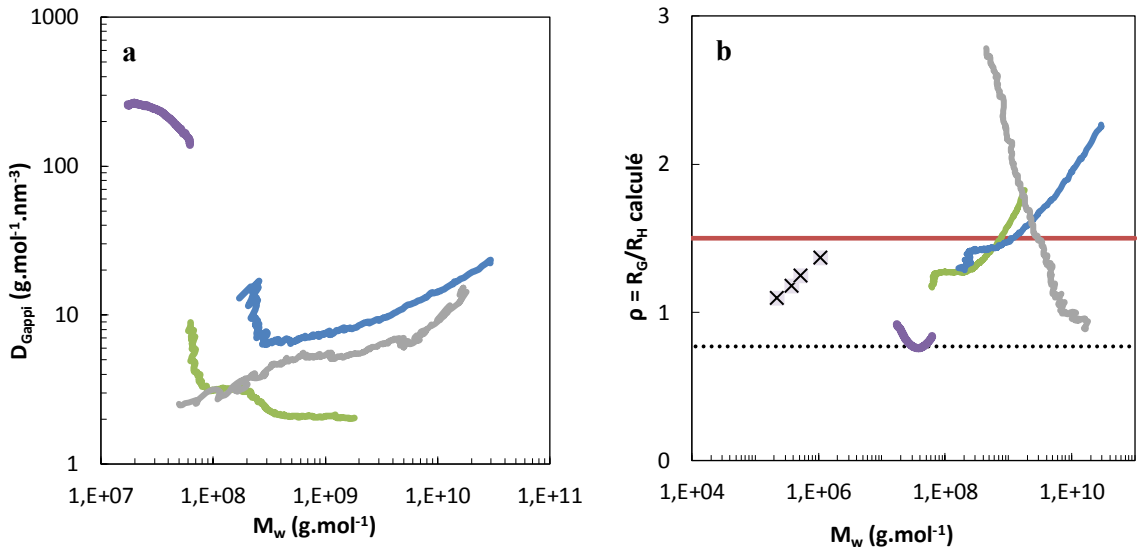


Figure 106 – a. Densité moléculaire apparente en fonction de la masse molaire. b. Paramètre de structure ρ en fonction de la masse molaire. dextrane D1-3B2 (gris), A/GS-X (vert), B/GS-X (bleu), alternane (violet), amylose (croix, Rolland-Sabaté *et al.*, 2008).

L'alternane a une structure très dense associée à une densité moléculaire de $\overline{d_{Gapp}}$ = 225,9 g.mol.nm^{-3} alors que les reutéranes et les dextranes présentent une densité moléculaire beaucoup plus faible située entre 5 et 10 g.mol.nm^{-3} (Figure 106a). Le paramètre de structure ρ de ces différents α-glucanes est présenté dans la Figure 106b. Il est très proche de 0,778 pour l'alternane traduisant une sphère dense. Des valeurs comprises entre 1,5 et 2,0 correspondent à une pelote statistique monodisperse et polydisperse respectivement. Elles sont rencontrées dans le cas des reutéranes et du dextrane D1-3B2. L'amylose linéaire constituée exclusivement de liaisons de type $\alpha(1\rightarrow4)$, quant à elle, se rapproche d'une structure de type pelote lorsque sa masse molaire augmente (Rolland-Sabaté *et al.*, 2008). Ces observations semblent montrer que l'alternance de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ dans les chaînes

provoque une densification des α-glucanes (la densité moléculaire de l'alternane est 25 à 40 fois supérieure à celle des 3 autres polysaccharides), probablement liée au repliement consécutif des chaînes sur elles-mêmes favorisant des liaisons hydrogènes intra-moléculaires. La structure dense résultante est comparable à celle observée dans le cas des glycogènes (Rolland-Sabaté et al., 2008, 2014), α-glucanes composés de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et très densément ramifiés en $\alpha(1\rightarrow6)$. Il est à prévoir qu'une telle structure soit extrêment difficile à hydrolyser par voie enzymatique du fait de sa faible accessibilité aux enzymes, et donc biodégradable sur des temps très longs.

Nous avons vu précédemment que le dextrane D1-3B2 et le reutérane B/GS-X s'ils sont globalement solubles dans l'eau sont toutefois agrégés en solution puisque le facteur puissance dans la relation $R_G = K.M_w^{\nu G}$ est < 0,33 alors qu'il se situe entre 0,40 et 0,60 pour l'alternane et le reutérane A/GS-X leur conférant une conformation entre la sphère et la pelote statistique. La Figure 106a montre que la densité moléculaire de l'alternane décroît avec l'augmentation de masse molaire alors que celles du dextrane D1-3B2 et du reutérane B/GS-X augmentent avec la masse molaire. Cette augmentation est caractéristique d'un état agrégé. Les sauts observés dans le cas du reutérane A/GS-X traduisent également la présence de plusieurs populations.

Il est difficile de conclure sur l'impact des liaisons osidiques sur la conformation de ces polysaccharides en solution ne sachant pas comment sont réparties les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$ dans les reutéranes.

2. Impact du type/taux de liaisons osidiques et de la masse molaire sur les propriétés des polysaccharides

2.1. Température de transition vitreuse

Les températures de transition vitreuse déterminées pour chaque polysaccharide sont représentées en fonction de la teneur en eau dans la Figure 107. Tout d'abord, pour un même conditionnement des échantillons à 59% HR, les α-glucanes n'absorbent pas tous la même quantité d'eau. Les dextranes de faible masse molaire (DSR-M) sont ceux qui en contiennent le plus (~ 14%). Les teneurs en eau des dextranes obtenus à partir de DSR-OK ou à partir du dextrane commercial D500 sont comprises entre 12 et 13%, celles des reutéranes entre 11 et 12% et l'alternane contient ~ 14 % d'eau. L'influence de la teneur en eau sur la T_g correspond à l'effet de premier ordre.

Nous avons vu que les T_g sont également fortement dépendantes du taux d'impuretés. Il s'agit de l'effet de second ordre. Les tendances que nous pouvons essayer de dégager sur le rôle de la structure sur la T_g sont donc très hypothétiques.

Bizot *et al.* (1997) ont montré que la température de transition vitreuse des polysaccharides augmente avec leur masse molaire. Aussi, pour les polysaccharides branchés, la longueur des branchements a un impact sur la transition vitreuse : plus ils sont longs, plus la T_g est élevée.

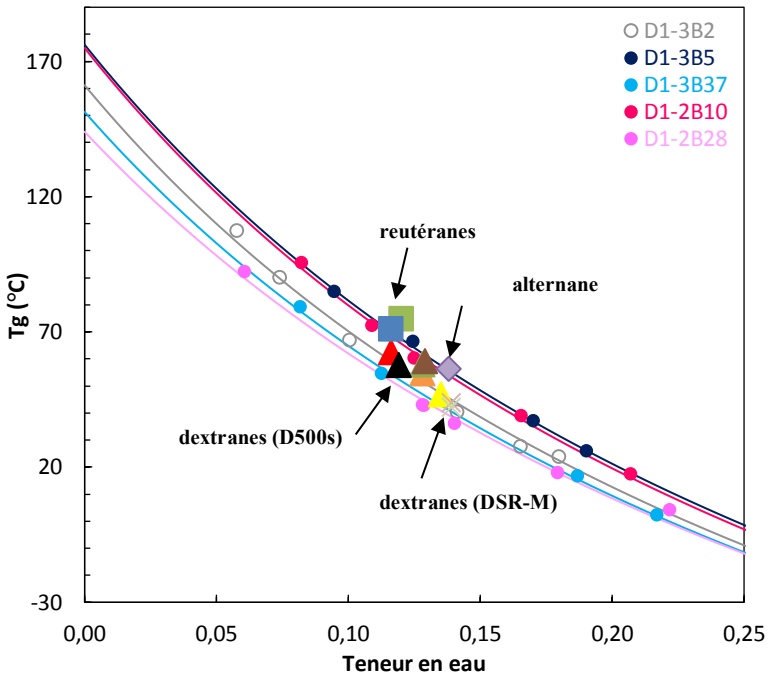


Figure 107 – Température de transition vitreuse des polysaccharides étudiés en fonction de la teneur en eau.

Les polysaccharides constitués principalement de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ (dextranes) ont les T_g les plus faibles par rapport à l'amylose constituée de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ qui a des valeurs de T_g plus élevées (Bizot *et al.*, 1997). Les reutéranes constitués de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$ ont une masse molaire légèrement inférieure à celles des dextranes de DSR-OK. Or, ils présentent les T_g les plus élevées. Une hypothèse serait que les reutéranes soient constitués de longs branchements, à l'image de la structure de l'amylopectine et/ou que l'apport de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ faisant diminuer la mobilité de la chaîne par une diminution des degrés de liberté comparé à une liaison $\alpha(1\rightarrow6)$ (Bizot *et al.*, 1997 ; Buléon *et al.*, 1998 ; Pérez & Bertoft, 2010). C'est le cas aussi pour l'alternane : sa température de transition vitreuse se trouve superposée à la courbe maîtresse du dextrane D1-3B5 qui ne contient pas d'impuretés alors que l'alternane en contient 5%. Nous avons vu précédemment que la présence d'impuretés dans un échantillon abaissait la température de transition vitreuse. S'il ne contenait pas d'impuretés, l'alternane

pourrait avoir une température de transition vitreuse supérieure à celle actuelle. De la même façon que les reutéranes, ceci s'explique par la présence de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ faisant diminuer la mobilité de la chaîne. En revanche, nous n'avons pas observé d'augmentation de température de transition vitreuse dans le cas des dextranes branchés ; l'apport d'une unité glucose en position $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow2)$ n'a pas d'influence sur la mobilité de la chaîne.

2.2. Cristallinité

Certains polysaccharides, comme le dextrane M-100 et les mutanes, sont semi-cristallins à l'état natif ce qui s'explique par la présence de chaînes constituées d'un seul type de liaisons à 100% en $\alpha(1\rightarrow6)$ ou 100% en $\alpha(1\rightarrow3)$ respectivement. Les chaînes sont donc linéaires. Ces polysaccharides se sont révélés insolubles dans l'eau. Tous les autres polysaccharides, constitués d'au moins deux types de liaisons, étaient amorphes à l'état natif. Certains comme l'alternane, les dextranes branchés en $\alpha(1\rightarrow3)$ produits par l'enzyme DSR-OK ou le dextrane commercial D500 recristallisaient au cours d'un traitement thermique à des températures différentes. Pour tous les autres α-glucanes, aucune recristallisation n'était observée. Il apparaît que lorsque des liaisons $\alpha(1\rightarrow2)$ sont présentes dans des dextranes, celles-ci auraient le pouvoir d'inhiber ce phénomène de recristallisation thermique.

2.3. Pouvoir filmogène

La capacité d'un polysaccharide à former des films est régie avant tout par sa masse molaire. Nous avons constaté que les dextranes obtenus à partir de l'enzyme DSR-M, de masses molaires ~ 2.10^4 g.mol^{-1}, ne formaient pas de films. Pour préciser le seuil de filmabilité des dextranes, des films de dextranes commerciaux de différentes masses molaires (1.10^4, 4.10^4, 7.10^4 et 1.10^5 g.mol^{-1}) ont été réalisés. Un film a été obtenu à partir d'une masse molaire de 7.10^4 g.mol^{-1} et les propriétés mécaniques de ce film ainsi que celui réalisé à partir du dextrane de 1.10^5 g.mol^{-1} étaient de même ordre de grandeur que celles du D500.

Dans le cadre de ce projet, des films de polysaccharides de $\bar{M}_w > 5.10^5$ g.mol^{-1} ont été obtenus et les propriétés mécaniques déterminées, excepté pour l'alternane qui n'est pas filmogène malgré une masse molaire élevée de $3{,}25.10^7$ g.mol^{-1}. Nous émettons l'hypothèse que le pouvoir filmogène pourrait être relié à la densité moléculaire. En effet celle-ci reste faible pour les dextranes, indiquant des molécules plutôt étendue, alors qu'à l'opposé elle est très élevée pour l'alternane, signe d'une conformation compacte. Afin d'étayer cette hypothèse, des essais de casting ont été réalisés à partir

d'une solution de glycogène d'huître (polysaccharide également très dense). Le même résultat qu'avec l'alternane a été obtenu (Figure 96). Du fait de l'alternance de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ de l'alternane dans la chaîne, les chaînes macromoléculaires sont repliées sur elles-mêmes défavorisant les liaisons inter-chaînes qui sont mises en œuvre lors de la formation des films.

3. Impact des impuretés sur les propriétés

Les impuretés de synthèse ont un rôle très important sur les propriétés rhéologiques, thermiques ou mécaniques des polysaccharides. Nous avons vu qu'il était difficile de les éliminer totalement, celles-ci pouvant se retrouver piégées à l'intérieur des chaînes macromoléculaires ce qui induit une baisse de la température de transition vitreuse et de recristallisation du matériau mais aussi des modules rhéologiques avec une déstructuration du réseau ainsi qu'une diminution des modules d'Young et de la contrainte à la rupture.

4. Choix des blocs d'intérêt pour la synthèse de copolymères à blocs

Suite à ces résultats et afin de combiner les propriétés différentes et les plus éloignées possibles des blocs, il nous a semblé intéressant d'envisager les assemblages présentés dans le Tableau 48.

Tableau 48 – Assemblages envisagés pour la synthèse de copolymères.

bloc 1 – bloc 2	Propriétés du bloc 1	Propriétés du bloc 2
Dextrane branché en α(1→2) – Dextrane branché en α(1→3) (DSR-OK)	Pas de recristallisation Soluble dans l'eau	Recristallisation vers 120 °C Soluble dans l'eau
Alternane – D500	Dense, non filmogène, recristallisation à 80 °C, Soluble dans l'eau	Peu dense, filmogène, recristallisation à 130 °C, Soluble dans l'eau
Alternane – M-100	Dense, non filmogène, recristallisation à 80 °C, Soluble dans l'eau	Cristallinité, pas de T_g, pas de T_c , insoluble dans l'eau
Amylose – alternane	Double hélice Insoluble dans l'eau à 25°C	Dense, non filmogène, recristallisation à 80 °C
Amylose – D500	Double hélice Insoluble dans l'eau à 25°C	Peu dense, filmogène, recristallisation à 130 °C

Afin d'obtenir des phénomènes d'organisation, une idée était de synthétiser un copolymère dextrane branché $\alpha(1\rightarrow3)$ et dextrane branché $\alpha(1\rightarrow2)$ à partir de l'enzyme DSR-OK et de pouvoir

recristalliser une partie, celle du dextrane branché en $\alpha(1\rightarrow3)$ et pas l'autre. Ces deux dextranes sont solubles dans l'eau. Si une partie du copolymère recristallise, il pourrait se former un « composite » dont la matrice serait la phase amorphe renforcée par la phase cristalline. Des copolymères de type alternane-*b*-dextrane pourrait être envisagés avec le dextrane D500 commercial ou le dextrane M-100 semi-cristallin. L'amylose a la particularité de pouvoir former une double hélice et est insoluble dans l'eau à température ambiante. Elle pourrait être associé à l'alternane étant un bloc relativement différent, lui-même est soluble dans l'eau et a des propriétés relativement différentes en terme de densité et de filmabilité. Ce copolymère pourrait servir à piéger des petites molécules. Pour déterminer les propriétés mécaniques des futurs copolymères, il serait souhaitable qu'un bloc dextrane ait une masse molaire supérieure à 7.10^4 g.mol^{-1} afin d'obtenir des films.

5. Complément : détermination des propriétés d'un mélange dextrane/alternane à 50/50 (p/p)

Pour comprendre les interactions qu'allaient avoir deux polysaccharides constitués d'unités glucose, ne variant seulement que par le type de liaisons osidiques, dans un mélange et afin de mieux appréhender les propriétés des futurs copolymères, le couple dextrane/alternane a été choisi. Le dextrane correspond à un dextrane commercial de masse molaire 2.10^6 g.mol^{-1} (D2000) et l'alternane d'une masse molaire de $3{,}25.10^7$ g.mol^{-1} est celui caractérisé dans le *Chapitre 5*. Dans un premier temps, un mélange de dextrane commercial D2000 et d'alternane à 50/50 (p/p) a été réalisé pour obtenir une concentration finale de 10% (p/v) dans l'eau. Puis ce mélange a été observé par microscopie confocale. Le dextrane a été au préalable marqué avec du FITC et l'alternane avec du RITC (Figure 108a). Les observations ont été réalisées après 1h de solubilisation et à l'œil, la solution paraissait limpide. La Figure 108a montre une microséparation de phase et l'alternane semble dispersé dans une matrice de dextrane qui tend à se densifier avec le temps. La séparation de phase est devenue macroscopique lorsque l'observation a été réalisée le lendemain à partir de la même solution (résultats non représentés ici).

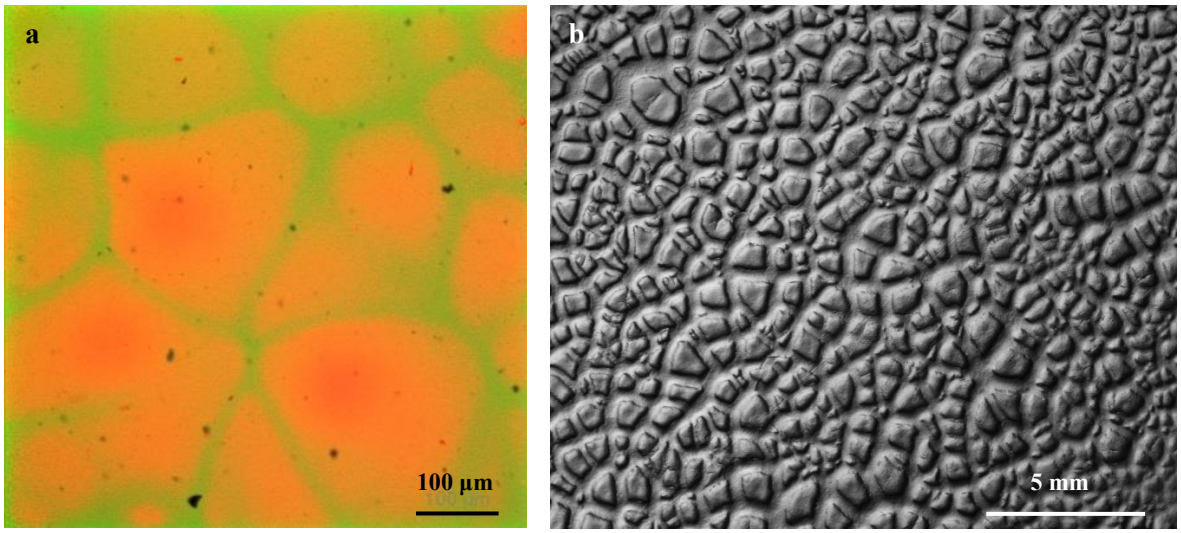


Figure 108 – Images obtenues par microscopie d'un mélange dextrane/alternane (50/50) (p/p). a. Microscopie confocale sur une solution du mélange à 10% (p/v) au total dans l'eau. **b.** Microscopie optique d'un film de mélange obtenu par casting.

Nous avons constaté précédemment que l'alternane ne formait pas de film du fait de sa densité élevée alors qu'il est possible d'obtenir un film rigide de dextrane d'environ 3 à 4 GPa lorsque sa masse molaire est supérieure à 7.10^4 $g.mol^{-1}$. Un film de ce mélange a été obtenu par casting et observé par microscopie optique (Figure 108b). Il s'agit d'un film hétérogène, montrant une macroséparation de phase où les formes géométriques sont semblables à celles observées en solution par microscopie confocale et peuvent correspondre à l'alternane. Bien que le film ne soit pas homogène, les propriétés mécaniques déterminées étaient assez faibles, avec un module d'Young inférieur à 2 GPa.

Comme montré précedemment, les modules rhéologiques de l'alternane et du dextrane seuls à une concentration de 20% (p/v) mettent en évidence deux comportements très différents : le dextrane a un comportement se rapprochant de celui d'une solution macromoléculaire alors que le comportement de l'alternane montre qu'il s'agit d'un gel (Figure 109). Lorsque ces deux polysaccharides sont en solution à une concentration de 20% (p/v) au total, un spectre mécanique intermédiaire entre une solution macromoléculaire et un gel est obtenu montrant toutefois une légère structuration puisque G' > G'' avec des valeurs de modules s'étendant entre 10 et 100 Pa (Figure 109).

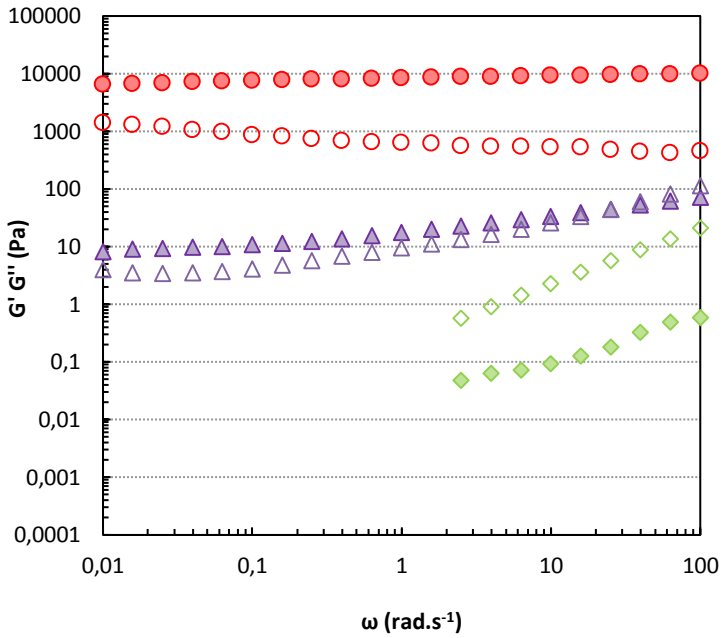


Figure 109 – Propriétés rhéologiques du dextrane (vert), de l'alternane (rouge) et du mélange dextrane/alternane (violet) à 20 % (p/v) présentant les modules conservatifs G' (symbole plein) et dissipatifs G'' (symbole creux).

Le thermogramme obtenu sur le film du mélange dextrane/alternane présente une unique température de transition vitreuse à 51,2 °C et une température de recristallisation à 121,7 °C pour une teneur en eau de 13,1%. Cette recristallisation correspond à l'organisation des chaînes de dextrane. La contribution de la recristallisation de l'alternane ne semble pas apparaître bien qu'une légère bosse est observée vers 85 °C.

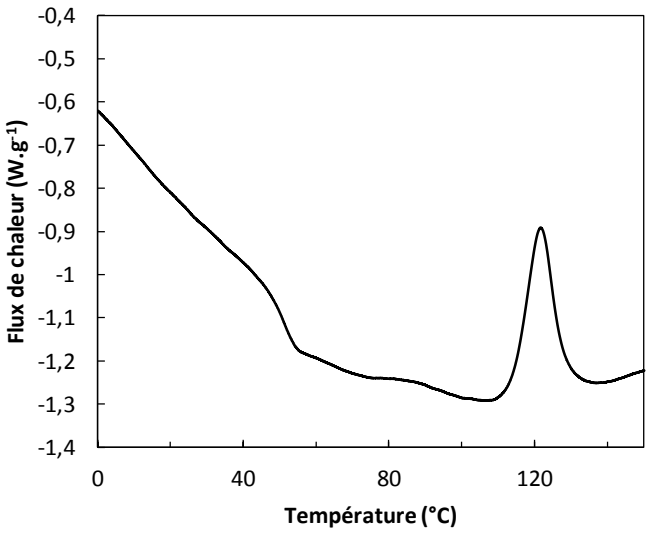


Figure 110 - Thermogramme du film de dextrane/alternane (50/50) entre 0 et 150 °C.

CHAPITRE 6 : SYNTHESE ET CARACTERISATION DU COPOLYMERE DEXTRANE-B-ALTERNANE ET AMYLOSE-B-ALTERNANE

Introduction

A partir de la détermination de la structure et des propriétés (densité, cristallisation, solubilité…) de plusieurs *α*-glucanes, les polysaccharides pouvant potentiellement produire des copolymères à blocs aux propriétés innovantes ont été identifiés (*Discussion générale*). Après un screening des enzymes sur les oligosaccharides d'intérêt correspondants, deux types de copolymères à bloc, l'alternane-*b*-dextrane et l'amylose-*b*-alternane et un copolymère tribloc amylose-b-alternane-b-dextrane ont pu être produits par synthèse enzymatique par le LISBP. Afin d'obtenir ces copolymères, il a été nécessaire de synthétiser *in vitro* le premier bloc constitutif du copolymère afin de pouvoir l'allonger à l'aide d'une seconde enzyme. Dans un premier temps, leurs synthèses ont été réalisées à petite échelle (mg) (lot 1) puis un développement de méthode a permis de les synthétiser en plus grande quantité (g) (lot 2) (Tableau 49). Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les oligosaccharides et les copolymères à bloc résultant de ces deux lots et le copolymère tribloc amylose-*b*-alternane-*b*-dextrane (Tableau 49). La première partie de ce chapitre est une publication intitulée *"Enzymatic synthesis of polysaccharide-based copolymers"* acceptée en mai 2018 dans le journal Green Chemistry. La deuxième partie de ce chapitre concerne principalement les propriétés d'organisation et les propriétés thermiques des oligosaccharides et copolymères.

Tableau 49 – Quantités disponibles en oligosaccharides et copolymères résultants des deux lots étudiés dans le *Chapitre 6*.

	Lot 1[a] (mg)	**Lot 2**[b] (g)
Oligoalternane	43	4,2
Copolymère alternane-*b*-dextrane	40	8,6
Oligoamylose	42	5
Copolymère amylose-*b*-alternane	36	10
Tribloc amylose-*b*-alternane-*b*-dextrane	4	-

[a] La quantité d'impuretés présentes dans les échantillons de ce lot n'a pas été déterminée étant donné la faible quantité produite.
[b] Les échantillons du lot 2 ne contiennent pas de fructose ni de glucose et la quantité de protéines est en cours de détermination.

Publication 2

Enzymatic synthesis of polysaccharide-based copolymers

F. Grimaud[a], P. Faucard[b], L. Tarquis[a], S. Pizzut-Serin[a], P. Roblin[c], S. Morel[a], S. LeGall[b], X. Falourd[b], A. Rolland-Sabaté[d], D. Lourdin[b], C. Moulis[a], M. Remaud-Siméon[a], & G. Potocki-Véronèse[a†]

1. Abstract

The design of enzymatic routes for the production of biosourced copolymer represents an attractive alternative to chemical synthesis from fossil carbon. In this paper, we explore the potential of glycosynthesizing enzymes to produce novel block copolymers composed of various covalently-linked α-glucans with contrasting structures and physicochemical properties. To this end, various glucansucrases able to synthesize α-glucans with different types of α-osidic bonds from sucrose were tested for their ability to elongate oligosaccharide and polysaccharide acceptors with different structures from the native polymer synthesized by each enzyme. We showed that two enzymes – namely, the alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 (specific for α(1→6)/α(1→3)-linked alternan synthesis) and the dextransucrase DSR-MΔ1 from *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (specific for α(1→6)-linked dextran formation) – were able to elongate α(1→4)-linked amylose and α(1→6)/α(1→3)-linked alternan respectively. Carrying out stepwise acceptor reactions, and after optimization of the acceptor size and donor/acceptor ratio, two types of diblock were synthesized – a dextran-*b*-alternan and an alternan-*b*-amylose – as well as the triblock copolymer dextran-*b*-alternan-*b*-amylose. Their structural characterization, performed by combining chromatographic, NMR and permethylation analyses, found that the copolymer polymerization degrees ranged from 29 to 170, which is the highest degree of polymerization ever reported for an enzymatically synthesized polysaccharide-based copolymer. The addition of dextran and alternan blocks to amylose resulted in conformational modifications and related flexibility changes, as demonstrated by small angle X-ray scattering.

[a.] LISBP, CNRS, INRA, INSAT, Université de Toulouse, F-31400 Toulouse, France.
[b.] UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, F-44300 Nantes, France.
[c.] Université de Toulouse, LGC UMR 5503 (CNRS/UPS/INPT), 118 route de Narbonne 31062 Toulouse, France.
[d.] UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université Avignon, F-84000 Avignon, France ;
†Corresponding author: email: veronese@insa-toulouse.fr; fax: +33 (0)561 559 400.
Electronic Supplementary Information (ESI) available: copolymer production yields and copolymer synthesis yields. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

2. Introduction

Due to their carbon neutrality and renewability, biosourced polymers are seen as an attractive alternative to synthetic polymers derived from fossil carbon when it comes to producing a wide range of materials. However, the intrinsic properties of natural polymers, for example in terms of rigidity and solubility, are often insufficient to meet functionality requirements for most non-food uses. In this context, the design of block copolymers is a promising strategy. Indeed, the physicochemical properties of polymers directly derive from their molecular structure and supramolecular organization, which vary considerably based on the nature of the covalently assembled building blocks that they are constructed from. Until now, the design of polysaccharide-based copolymers was mainly focused on the combination of cellulose, amylose, dextran, alginate or chitosan building blocks with synthetic blocks for obtaining hybrid materials used as surfactants, chromatography supports, or controlled release systems. (Akiyoshi *et al*., 1999 ; Enomoto *et al.*, 1996 ; Lemarchand *et al*., 2003 ; Loos & Müller, 2002 ; Schatz & Lecommandoux, 2010). Very few studies have looked at the synthesis of copolymers formed solely of blocks of different polysaccharides (Lin *et al*., 2009 ; Rinaudo, 2011). Moreover, in most of these cases, the grafting of polysaccharides (or polysaccharide primers) onto synthetic or polysaccharidic blocks was achieved by chemical reaction (Hatanaka *et al*., 2014) or polymerization from chemically modified monomers (Kobayashi, 2007). The *in vivo* or *in vitro* enzymatic synthesis of biosourced copolymers has also scarcely been investigated. Yadav *et al*. (2010) demonstrated the potential of using a glycosyltransferase for the microbial production of modified bacterial cellulose (MBC) with increased biodegradability properties. In this case, the MBC was a statistical copolymer rather than a block copolymer, since the glucosyl (Glc) and N-acetyl-glucosaminyl (GlcNAc) units were incorporated on a random basis by the cellulose synthase from *Gluconacetobacter xylinus*, which uses both UDP-Glc and UDP-GlcNAc as the glycosyl donor. On the same principle, another type of glycan-synthesizing enzyme, the $\alpha(1\rightarrow4)$ glucan phosphorylase (SP, EC 2.4.1.1) from *Aquifex aeolicus* VF5, belonging to the GT35 family of carbohydrate active enzyme (CAZy (Lombard *et al*., 2014)), was tested for the *in vitro* enzymatic synthesis of hybrid polysaccharides (Kadokawa *et al*., 2015 ; Baba *et al*., 2016 ; Yamashita *et al*., 2015 ; Shimohigoshi *et al*., 2013). The substrate promiscuity of this enzyme towards glycosyl donors (α-D-Glc-1-phosphate, α-D-GlcNAc-1-phosphate and α-D-Man-1-phosphate) was exploited to produce non-natural polysaccharides such as hetero-mannosides and aminopolysaccharides (Baba *et al*., 2016 ; Yamashita *et al*., 2015 ; Shimohigoshi *et al*., 2013). The three sugar-phosphate donors were used in the presence of a maltotriose acceptor to obtain different copolymers with

maltotriose at the reducing end, on which were grafted either α(1→4)-mannan, α(1→4)-linked glucosaminoglucans or heteromannans (composed of either Glc and GlcNAc units, or Glc and Man units). Nevertheless, the degree of polymerization of the products was limited to 30 residues (Yamashita *et al*., 2015), with a very short block of only three glucosyl residues at the reducing end. Moreover, the impact of the Glc/GlcN or Glc/Man composition on the polymer chain conformation, and therefore its physicochemical properties, was not investigated.

Retaining transglucosylases, which catalyse polymerization reactions from non-nucleotide sugars, represent another category of glycan-synthesising enzymes that could be of interest in the production of block copolymers. Some α-transglucosylases, such as dextran dextrinases (Hehre, 1951; Mao *et al.*, 2012 ; Naessens *et al.*, 2005a) (DDase; EC2.4.1.2; CAZy family GH15), 4,3-α-glucanotransferase (Gangoiti *et al.*, 2017) (4,3-α-GTase; E.C. 2.4.1.-; CAZy family GH70) and 4,6-α-glucanotransferase (Leemhuis *et al.*, 2013b ; Meng *et al.*, 2016) (4,6-α-GTase; E.C. 2.4.1.-; CAZy family GH70), have the ability to cleave the α(1→4)-linkages of maltooligosaccharides (MOSs) and successively transfer the glucosyl units from one MOS chain to an acceptor molecule. If the acceptor molecule is another MOS chain, α(1→6) (DDase and 4,6-α-glucanotransferase) (Hehre, 1951; Mao *et al.*, 2012 ; Naessens *et al.*, 2005a ; Gangoiti *et al.*, 2017) or α(1→3) (4,3-α-glucanotransferase) linkages can be formed (Gangoiti *et al.*, 2017). Besides, the 4,6-α-GTase from *Lactobacillus reuteri* 121 has been used to produce Isomalto/malto-polysaccharides (IMMPs) with a DP of up to 30 (Leemhuis *et al.*, 2014). These products contain one or more α(1→4)-linked glucosyl units at the reducing end, and at least one α(1→6) linkage at the non-reducing end. However, there are other α-transglucosylases, such as the glucansucrases (GSs) from the GH13 and GH70 families, which also appear to be very interesting candidates for producing block copolymers. GSs use sucrose, a low cost agroresource, as the glucosyl donor, and catalyse the formation of homopolymers of α-D-glucosyl units. Depending on their characteristics, a wide variety of α-glucans with different molar masses, as well as with different distributions, numbers or types of glucosidic linkage (namely α(1→2), α(1→3), α(1→4) and/or α(1→6)) can be obtained (Jeanes *et al*., 1954 ; Andre *et al*., 2010 ; Moulis *et al*., 2016).

Of the GSs, dextransucrases (DS; E.C. 2.4.1.5; CAZy family GH70) catalyse the synthesis of dextrans that are α-glucans of molar masses ranging from 10^4 to 10^9 g.mol^{-1} with at least 50% α(1→6) linkages and various branching points. Recently, a recombinant dextransucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (DSR-M) with a rather unusual specificity was characterized. Unlike other dextransucrases, which usually produce very high molar mass polymers, this enzyme produces only low molar mass

linear $\alpha(1\rightarrow6)$-linked dextran (Passerini *et al*., 2015 ; Claverie *et al*., 2017). Alternansucrase (ASR; E.C. 2.4.1.140; CAZy family GH70) specificity is also remarkable due to the mix of $\alpha(1\rightarrow6)$ and $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages found in the main polymer chain. The first ASR to be characterized, isolated from *L. mesenteroides* NRRL-B1355, produces a high molar mass alternan (Joucla *et al.,* 2006), 4×10^7 g.mol^{-1} in size (Isenberg *et al*., 2010), containing 58% $\alpha(1\rightarrow6)$ and 42% $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages (Joucla *et al.,* 2006) mainly alternated. This alternan displays interesting properties such as a high solubility in water, low viscosity and resistance to dextranase degradation (Coté *et al*., 2009). A third example are amylosucrases (AS; E.C. 2.4.1.4; CAZy family GH13), which catalyse the synthesis from sucrose of an insoluble amylose-like polysaccharide containing exclusively $\alpha(1\rightarrow4)$-linked glucosyl residues (Potocki de Montalk *et al*., 2000), the size of which does not exceed 2×10^4 g.mol^{-1} (Potocki-Véronèse *et al*., 2005). The potential of amylosucrases has also been extensively investigated in terms of the synthesis of hyperbranched α-glucans and glycodendrimers through elongation of native glycogen chains (Grimaud *et al*., 2013 ; Putaux *et al*., 2006).

In addition to polymer formation, GSs can also transfer the glucosyl unit of sucrose to a large variety of carbohydrate acceptors, including mono-, di-, and trisaccharides such as galactose, xylose, maltose, isomaltose, mannose, maltotriose, panose, cellobiose, nigerose, lactose, raffinose and melibiose, as well as aglycon molecules such as polyols or flavonoids (Moulis *et al*., 2016 ; Coté & Tao, 1990 ; Morales *et al*., 2001 ; Daude *et al*., 2013 ; Monsan *et al*., 2010 ; Robyt & Eklund, 1983). However, there are very few publications describing the glucosylation using GSs of oligosaccharides with a DP higher than 3. The first example of this involved the strict elongation of maltooligosaccharides (MOSs) with a DP of between 2 and 8 by the GTF-I and GTF-S enzymes from *S. mutans* 6715 (Fu & Robyt, 1991) and the dextransucrase from *L. mesenteroides* NRRL-B-512FM (Fu & Robyt 1990). Only up to six glucosyl units could be added to the acceptor with a DP of 8. Although the physicochemical properties of these oligomers were not characterized, these findings reveal that GSs can be used for gluco-co-oligomer formation. In this study, we have gone one step further and explored various enzymatic routes for the production of gluco-copolymers composed of di- and tri-α-glucan blocks that differ in terms of their linkage types and physical properties. To this end, various combinations of glucansucrases and acceptor blocks were screened, and the synthesis conditions optimized. The new block copolymers that were produced were then characterized in detail in order to determine their structure and conformation in solution.

3. Experimental

3.1. Enzyme Sources

The amylosucrase gene from *Deinoccocus geothermalis* DSM11300 (*Dg*AS) (accession number ABF44874) was amplified by means of PCR from a pGST-*Dg*AS plasmid template (Emond *et al*., 2008) using the two following primers: 5'-CACCATGCTGAAAGACGTGCTCACTTCTG-3' as the forward primer and 5'-TGCTGGAGCCTCCCCGGCGGTCAGC-3' as the reverse primer. The addition of a CACC sequence to the 5'-forward primer allowed the gene to be correctly inserted into the pENTR/D-TOPO® vector (Life Technologies). The recombinant gene was then transferred to the pET-53-DEST (Novagen) destination vector using the Gateway® LR Clonase® II enzyme mix (Life Technologies). Recombinant clones were selected on Luria-Bertani (LB) agar plates supplemented with 100 μg mL^{-1} of ampicillin. Plasmids were extracted using the Sigma-Aldrich GenElute HP Plasmid Miniprep kit, and verified using restriction analyses and sequencing (GATC Biotech). *Dg*AS was produced as a $(His)_6$-*Dg*AS fusion protein by the recombinant *E. coli* BL21 star strain carrying the pET-53-DEST-*dgas* plasmid, after 24 hours in a ZYM 5052 medium at 28 °C. The alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 (ASR) was produced as a $(His)_6$-ASR fusion protein by the recombinant *E. coli* BL21 strain carrying the pBad *asr C-APY-del Δthio* plasmid (Joucla *et al*., 2006). The dextransucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (DSR-M△1) was produced as a $(His)_6$-DSR-M△1 fusion protein by the recombinant *E. coli* BL21 star strain carrying the pET-53-DEST-*dsrM△1* plasmid (Claverie *et al*., 2017). $(His)_6$-*Dg*AS, $(His)_6$-ASR and $(His)_6$-DSR-M△1 were further purified by means of affinity chromatography using ProBond nickel-charged resin (Invitrogen), following the manufacturer's instructions, as described elsewhere (Claverie *et al*., 2017 ; Emond *et al*., 2008). In order to make the reading of this study easier, $(His)_6$-*Dg*AS, $(His)_6$-ASR and $(His)_6$-DSR-M△1 will be referred to hereafter as *Dg*AS, ASR and DSR-M respectively.

3.2. Enzyme activity assays

One unit of glucansucrase corresponds to the amount of enzyme that catalyses the production of one μmol of fructose per minute under the assay conditions. Assays involving ASR and DSR-M were performed at 30 °C in a 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.75 with 100 g L^{-1} sucrose, while assays involving amylosucrase (*Dg*AS) was performed at 50 °C in a 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.0 with

100 g L^{-1} sucrose. The concentration of the fructose released during the reactions was determined using the dinitrosalycilic (DNS) acid method (Summer & Howell, 1935), using fructose as the standard.

3.3. Production of acceptors

Maltooligosaccharides and the amylose block were synthesized *in vitro* from sucrose and maltose using the purified recombinant *Dg*AS, under the same conditions as those described for *Np*AS (Popov *et al*., 2009). The synthesis reaction was performed at 50 °C for a period of 24 hours in a 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.0, from 600 mM sucrose as the glucosyl donor and 100 mM maltose as the acceptor, using 1 U mL^{-1} *Dg*AS. Oligoalternans and the low molar mass (LMM) alternan block were synthesized *in vitro* using the purified ASR (Joucla *et al*., 2006). This synthesis reaction was performed at 30 °C for a period of 24 hours in a 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.75, from 1 M sucrose as the sole substrate, using 1 U mL^{-1} ASR. As described elsewhere (Joucla *et al*., 2006), under these conditions, ASR synthesizes three α-glucan populations: the HMM alternan (around 10^7 g mol^{-1}), the LMM alternan, and oligoalternans. Isomaltooligosaccharides (dextran 1,500 g.mol^{-1}) was purchased from Sigma-Aldrich. In order to prepare the blocks would serve as acceptors for elongation, maltooligosaccharides, short amylose, isomaltooligosaccharides, oligoalternans, and LMM alternans were subsequently fractionated by means of preparative size-exclusion chromatography (SEC) using a 3L column of Biogel P6DG (Biorad). Sugars were eluted with water at 60 °C using a flow rate of 10 mL min^{-1}. High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was used to determine the DP distribution of each fraction.

3.4. Oligosaccharide elongation and copolymer synthesis

Reactions were performed at 30 °C, in a 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.75 containing 1 U mL^{-1} of purified ASR or DSR-M, with acceptor concentrations of between 10 and 50 g L^{-1} and sucrose concentrations of between 50 and 150 g L^{-1}. The reaction media were stirred at 30 °C for 24 hours to allow total sucrose consumption. After 24 hours, the reaction media were heated for five minutes at 95 °C to stop the reaction. Two controls were included in the experiment. The first relates to the enzyme with sucrose and the second relates to the enzyme in the presence of the acceptor. The second control was used to determine whether the enzyme was able to modify the acceptor in the absence of sucrose. After a reaction period of 24 hours, the acceptor modification (i.e. elongation) was checked using HPAEC-PAD.

3.5. Copolymer purification

The reaction products obtained from sucrose and the amylose block acceptor using ASR were purified by means of preparative SEC, as described in the previous section. The reaction products obtained from sucrose and the alternan block acceptor using DSR-M were purified by means of preparative SEC using a HiPrep 26/60 column of Sephacryl S200 HR (GE Healthcare). Sugars were eluted at 25 °C in water using a flow rate of 1.5 mL min^{-1}. The reaction products obtained from sucrose and the alternan-*b*-amylose acceptor using DSR-M were purified using a semi-preparative 9 × 250 mm Dionex Carbopac PA100 column. A gradient of sodium acetate in 150 mM NaOH was applied at a flow rate of 2.5 mL min^{-1} as follows: 0-10 min, 0-200 mM; 10-15 min, 200-200 mM; 15-30 min, 200-300 mM. Carbohydrate detection was performed in the same way as analytic HPAEC-PAD (see below). After HPAEC-PAD separation, the samples were desalted online by using a carbohydrate membrane desalter (CMD; Dionex) according to the manufacturer's recommendations. The resulting purified polymer fractions were freeze-dried.

3.6. α-Glucan structure analysis

High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Aliquots of the reaction media were collected and diluted with water to a final concentration of 1 g L^{-1}. HPAEC-PAD analysis was performed on a 2 × 250 mm Dionex Carbopac PA100 column. A gradient of sodium acetate in 150 mM NaOH was applied at a flow rate of 0.25 mL min^{-1} as follows: 0-10 min, 0-140 mM; 10-26 min, 140-400 mM; 26-29 min, 400-500 mM. Detection was performed using a Dionex ED40 module with a gold working electrode and an Ag/AgCl pH reference.

^{1}H NMR. Freeze-dried polymer samples were re-suspended in deuterated water at a final concentration of 20 mg mL^{-1}. ^{1}H-NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer and the data were processed with TOPSPIN 3.0 software, as described elsewhere (Faucard *et al.*, 2018). The percentage of $\alpha(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow6)$ and $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages in the products was determined by integration of the respective peak areas of the anomeric proton signals. Of note, the $\alpha(1\rightarrow3)$ linkage content may correspond to different $\alpha(1\rightarrow3)$ linked glucosyl units including terminal residue (α-D-Glcp-(1→3)), monosubsituted residues (→6)-α-D-Glcp-(1→3)- or →3)-α-D-Glcp-(1→3)- units) or disubsituted residues (→3,6)-α-D-Glcp-(1→3)- units) as their anomeric signals are too close to be distinguished (Seymour *et al.*, 1992).

The percentage of the alternan-*b*-amylose copolymer made up of the amylose block was determined as follows: % of the amylose block = % of $\alpha(1\rightarrow4)$ linkages in alternan-*b*-amylose. Similarly, the percentage of the dextran-*b*-alternan copolymer made up of the alternan block was determined using the following formula: % of the alternan block = (% of $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages in alternan-*b*-dextran) / (% of $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages in the alternan block) × 100. With regard to the triblock dextran-*b*-alternan-*b*-amylose, the following formulae were used : % of amylose in the triblock = % of $\alpha(1\rightarrow4)$ linkages in the dextran-*b*-alternan-*b*-amylose; % of the alternan block in the triblock = [(% of $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages in dextran-*b*-alternan-*b*-amylose) / (% of $\alpha(1\rightarrow3)$ in alternan-*b*-amylose)] × [(% of $\alpha(1\rightarrow3)$ in alternan-*b*-amylose + % of $\alpha(1\rightarrow6)$ in alternan-*b*-amylose)] / 100; % dextran block in the triblock = 100 − % alternan block − % amylose block.

Permethylation analyses. In preparation, the samples were lyophilized and dried under vacuum at 40 °C. One mg was dissolved in 1 mL of DMSO for 20 minutes at 80 °C. Methylation was performed by adding 1 mL of NaOH-DMSO reagent and 0.5 mL of methyl iodide (Anumula & Taylor, 1992). To enhance the reaction, the samples were sonicated and vortexed for a period of two minutes. This step was repeated three times. The reaction was stopped by adding 2 mL of water, and the methylated products were extracted with 2 mL of chloroform. After vigorous vortex mixing, the samples were centrifuged for five minutes at 5,000 *g*. The aqueous supernatant phase was removed and the organic phase, after washing three times with 4 mL of water, was dried under an air ramp. An internal standard, inositol (50 µg), was added to each sample and the whole was then hydrolysed with 2 M of trifluoroacetic acid solution and converted to alditol acetate. The partially methylated alditol acetates were analysed by means of gas chromatography, on a TraceGOLD™ TG-1MS GC non-polar column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Thermo Scientific™, H_2 as carrier gas at 1.5 mL min^{-1}), and mass spectrometry (TRACE-GC-ISQ, Thermo™). The sample was injected at 240 °C. The column oven temperature was maintained at 60 °C for five minutes and gradually increased to 315 °C (3 °C/min), at which temperature it was maintained for two minutes. The ion source temperature of the electron impact (EI) mass spectrometer was 230 °C. Masses were acquired with a scan range of between m/z 100 and 500. Partially methylated alditol acetates were identified based on a combination of the analytes relative retention times (relative to inositol) and their fragmentation spectrum, before being compared against a homemade library.

The proportion of each type of osidic linkage was calculated as follows:

$$\%_{\text{linkages}}\,\mathrm{i} = \frac{\text{Area}_\mathrm{i}}{\mathrm{f} \times \sum \text{Area}} \times 100$$

where area_i is the area of the sugar i being examined, and f is its response factor (Sweet *et al.*, 1975).

Small angle X-ray scattering (SAXS). SAXS experiments were performed on the SWING beamline at Synchrotron SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France. The wavelength was set to $\lambda = 1.033$ Å. A 17 × 17 cm^2 low-noise Aviex CCD detector was positioned at 1,800 mm from the sample, with the direct beam off-centred. The resulting exploitable q-range was 0.006−0.45 $Å^{-1}$, where $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, and the scattering angle was taken to be 2θ. The samples were circulated in a thermostated quartz capillary with a diameter of 1.5 mm and a wall thickness of 10 μm, which had been placed in a vacuum chamber.

In order to obtain the oligosaccharide form factor, concentrated solutions of amylose, alternan-*b*-amylose and dextran-*b*-alternan-*b*-amylose (50 μL at 50 mg mL^{-1}) were injected into a size exclusion column (BIOSEC, Agilent) using an Agilent high-performance liquid chromatography (HPLC) system, and eluted directly into the SAXS flow-through capillary cell at a flow rate of 200 μL min^{-1}.

SAXS data were collected online for the duration of the elution time, with a frame time of 1 s, and a dead time between frames of 0.5 s. For each sample, the frames corresponding to the main elution peak were checked for the stability of the associated radius of gyration and global curve shape, and the resulting selection of curves was averaged, as described elsewhere (David *et al.*, 2009). Selected frames corresponding to the main elution peak were averaged using FOXTROT, a custom homemade application. A large number of frames were collected during the first minutes of elution, and these were averaged to account for buffer scattering, which was subsequently subtracted from the signal during elution of the polymer. Data reduction to absolute units, frame averaging, and subtraction were carried out using FOXTROT.

High-performance SEC coupled with multi-angle laser light scattering (HPSEC-MALLS). The equipment, method, data acquisition and analysis used here were the same as those described elsewhere (Sciarini *et al.*, 2015), except for the columns: three Suprema columns (8 mm × 300 mm, PSS, Germany) and a guard column (8 mm × 50 mm, PSS, Germany) were used, connected in series and maintained at 30 °C. The eluent was a 0.2 g. L^{-1} sodium azide solution, at 0.5 mL min^{-1}. Mono- and diblocks were solubilized in water at 0.5 g L^{-1}, and filtered through 0.45 μm filters before a sample (100 μL) was injected into the HPSEC-MALLS system.

4. Results and discussion

Three different GSs, specific for the synthesis of α-glucans of various structures and properties, were tested for copolymer synthesis: the DSR-M dextransucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299, the ASR alternansucrase from *L. mesenteroides* NRRL B-1355 and the *Dg*AS amylosucrase from *Deinoccocus geothermalis* DSM11300. The approach consisted in using one GS to elongate the α-glucans produced by the other two. In order to select the best GS/α-glucan combination, we first tested the ability of each enzyme to glucosylate short oligosaccharides, whose structure differed from that of their natural acceptors: α(1→6)-linked (IMOS), α(1→6)/α(1→3)-linked (OAL) and α(1→4)-linked (MOS) oligosaccharides for DSR-M, ASR and *Dg*AS respectively. Six acceptor reactions were carried out and the reaction products were analysed by means of HPAEC-PAD. A given enzyme was considered able to glucosylate a given acceptor if acceptor conversion into new products was observed, which was determined by the presence of new peaks on the HPAEC chromatogram. As can be seen from Table 50, only the three couples DSR-M/OAL, ASR/MOS and ASR/IMOS produced positive results. The acceptor reaction conditions were then optimized by varying the acceptor concentration from 10 to 50 g L^{-1}, and the sucrose concentration from 50 to 150 g L^{-1}. The best acceptor glucosylation was always obtained using an acceptor/donor massic ratio of 0.15. These conditions were selected for the next experiments. Almost total acceptor consumption, alongside the appearance of new peaks on the HPAEC-PAD chromatograms (Figure 111), proved that covalent grafting had occurred. Similar results were obtained for the three couples being tested, providing the first piece of evidence to suggest that some GSs are able to glucosylate α-linked glucooligosaccharide acceptors with DPs > 8 and structures different from those of the enzyme's natural acceptor.

Table 50 - Results of acceptor reactions performed using DSR-M, ASR and *Dg*AS, and various exogenous oligosaccharide acceptors.

		Acceptors[a]		
Enzyme	Product from sucrose only	MOS[b] DP8-14	OLA[c] DP 6-20	IMOS[d] DP 1-25
ASR	alternan (58% of *α*(1→6) and 42% of *α*(1→3))	+	n.d.	+
DSR-M	dextran (100% of *α*(1→6))	-	+	n.d.
*Dg*AS	amylose (100% of *α*(1→4))	n.d.	-	-

[a] The reactions resulting in elongation of the acceptors are indicated by the symbol "+".
[b] Maltooligosaccharides (MOS) with 100% of *α*(1→4) linkages.
[c] Oligo-alternan (OLA) with 63% of *α*(1→6) and 37% of *α*(1→3) linkages.
[d] Isomaltooligosaccharides (IMOS) with 95% of *α*(1→6) and 5% of *α*(1→3) linkages.
Linkage percentages determined by ^{1}H proton NMR.

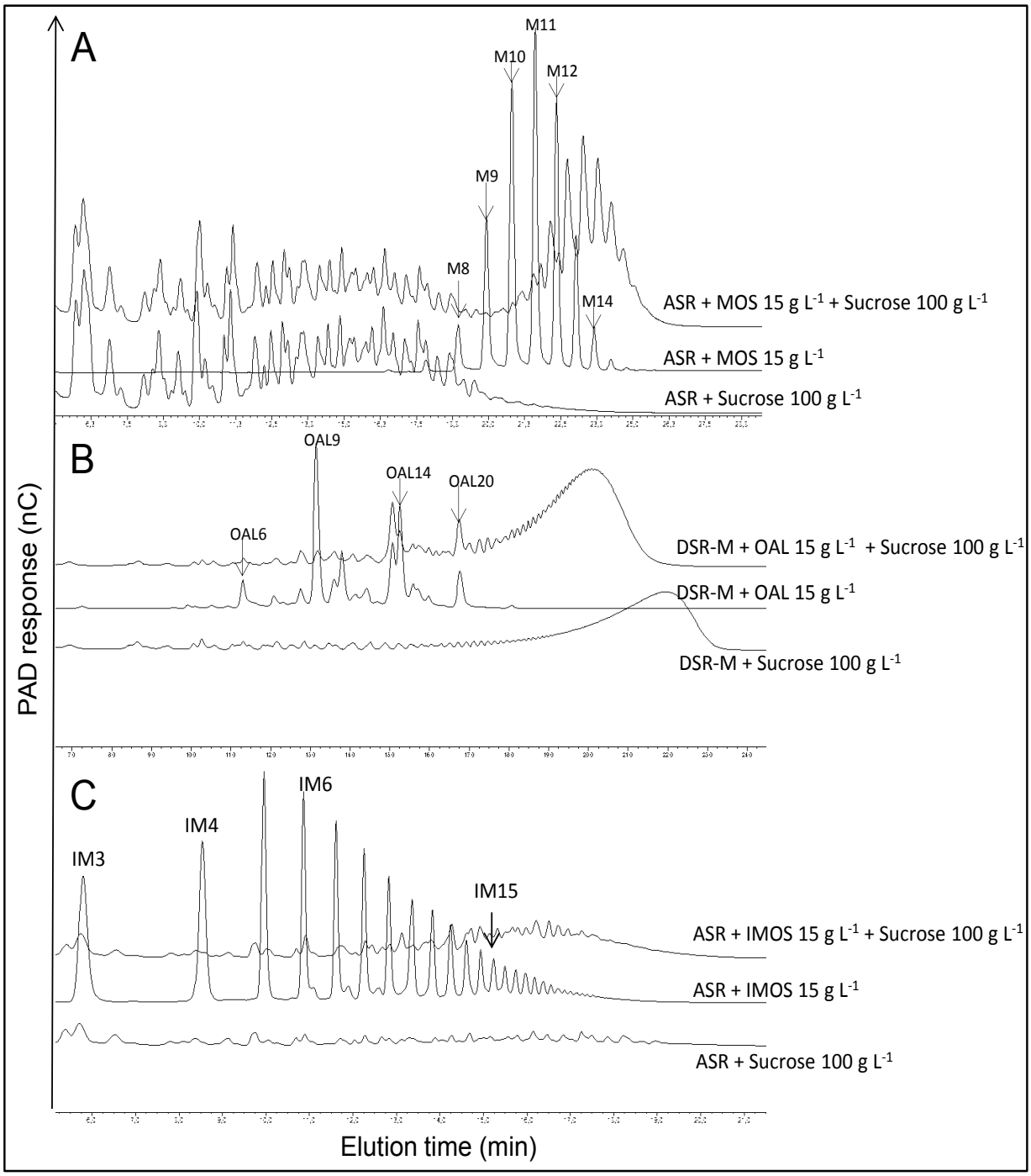


Figure 111 - HPAEC-PAD chromatograms of the acceptor reaction media involving the following couples : ASR/maltooligosaccharides **(**A), DSR-M/Oligo-alternan (B), and ASR/isomaltooligosaccharides (C). Two controls are also presented below the acceptor reaction products, these being i) the enzyme with sucrose alone, and ii) the enzyme with the acceptor alone. Only chromatograms corresponding to the final reaction times are reported here. For the control 'enzyme + acceptor', it was verified that the chromatograms obtained at the initial and final reaction times were identical.

Only MOSs of up to DP 8 were indeed shown to be glucosylated with GTF-I and GTF-S from *S. mutans* 6715 (Fu & Robyt, 1991) and the dextransucrase DSR-S from *L. mesenteroides* NRRL-B-512FM (Fu & Robyt, 1990). Subsequently, with a view to synthesizing copolymers, and not just oligosaccharides

with new structures, the potential of DSR-M and ASR to act on α-glucans with higher DPs was investigated. Accordingly, α-glucan acceptors of intermediate molar mass were prepared that could be easily separated from the natural polymers synthesized by the glucansucrases selected to perform the elongation. At this stage, and in order to limit the number of combinations, we selected the following couples: DSR-M/OAL and ASR/MOS.

4.1. Amylose block synthesis and elongation using ASR

*Dg*AS was used to produce *α*(1→4)-glucan fractions with suitable DPs, which would be tested as primers for copolymer synthesis with ASR. The synthetic reaction was performed using a sucrose donor/maltose acceptor ratio of 6. The resulting amylose-like products with DPs of between 14 and 23 were fractionated by means of SEC. This fraction (DP 14-23) was further incubated with ASR and 100 g L^{-1} sucrose. The HPAEC-PAD analysis of the reaction products showed that the initial *α*(1→4)-glucan chains were used as acceptors, leading to the formation of new compounds with higher retention times, as revealed by the clear displacement of the peaks corresponding to the initial acceptor (Figure 112A). This population is, in theory, composed of an *α*(1→3)/*α*(1→6)-glucan block at the non-reducing end, grafted to the non-reducing end of the *α*(1→4)-glucan block acceptor. It was thus considered to be an alternan-*b*-amylose copolymer.

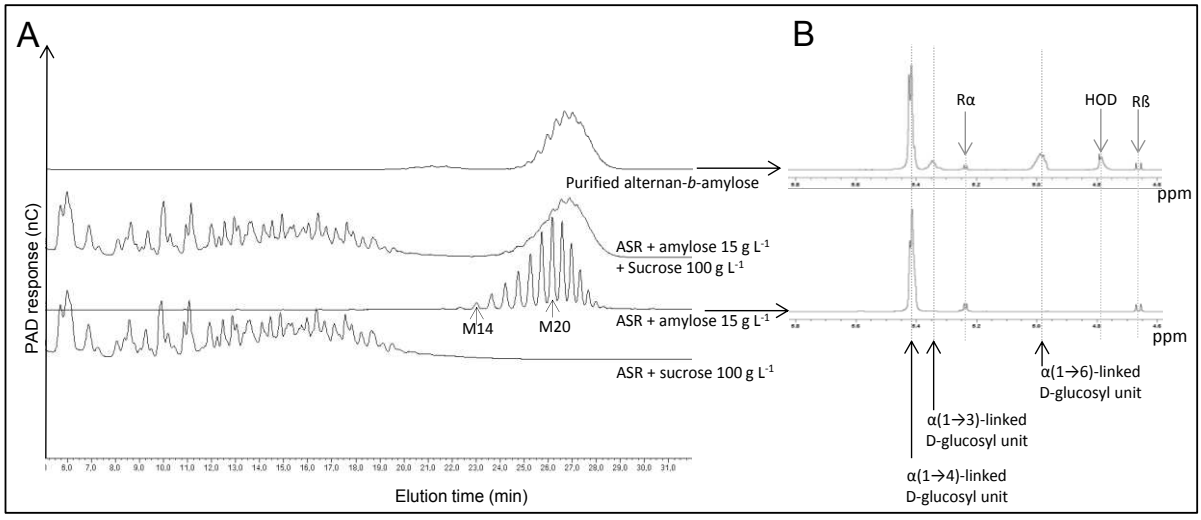


Figure 112 – HPAEC-PAD chromatograms of the copolymer synthesis reaction medium involving ASR and amylose (A), and ^{1}H NMR spectra of alternan-b-amylose and amylose (B). The chemical shifts at 5.45 ppm, 5.35 and 5 ppm were assigned to *α*(1→4), *α*(1→3), and *α*(1→6) linkages respectively. Rα and Rβ correspond to the anomeric signals of the reducing →4)-D-Glc*p* units.

To further characterize the polymer, the diblock was separated by means of SEC from the fructose side-product and the natural α-glucans produced by ASR (OAL). The purity of the fraction was evaluated by

means of HPAEC-PAD, which revealed the absence of contamination from the natural ASR products (Figure 112A). The various α-glucosidic linkages comprising the pure diblock were determined by means of ^{1}H NMR in order to evaluate the relative proportions of each glucan block (Figure 112B, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). In the alternan-*b*-amylose copolymer, $\alpha(1\rightarrow4)$ linkages made up 69%, indicating that the alternan block made up 31%. As the average DP of the initial amylose fraction was 20 (determined by HPAEC-PAD analysis), it was estimated that the amylose chains were grafted with oligoalternans with a DP of 9, assuming that all the chains were homogeneously elongated.

The structure of the copolymer was also analysed by means of permethylation. The relative proportions of each type of permethylated glucosyl units are reported in Table 52. The presence of 3 substituted, 6 substituted and 3,6 substituted glucosyl units confirms that the amylose chains were grafted with glucosyl units linked in $\alpha(1\rightarrow6)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ and branching points. This is accordance with the structure proposed for alternan (Seymour *et al*, 1979) and what has been elsewhere deduced from analysis of the ASR products obtained from sucrose and maltose (Côté & Sheng, 2006).

Table 51 - α-glucosidic linkages in the purified acceptor blocks and copolymers, identified using ^{1}H NMR. Average DPs were determined either by HPAEC-PAD (amylose), HPSEC (alternan), and HPSEC-MALLS (dextran-*b*-alternan), or calculated from the relative proportion of each block determined by ^{1}H NMR (alternan-*b*-amylose and dextran-*b*-alternan-*b*-amylose). The details of calculation of the synthesis yields and final production yields (including both the synthesis and purification steps), are provided in the supplementary information.

Samples	Enzymes	Synthesis conditions		% of α-glucosidic linkages			Average DP	Estimated synthesis yields (%)	Production yields (%)
		Donor	Acceptor	$\alpha(1\rightarrow6)$	$\alpha(1\rightarrow3)$	$\alpha(1\rightarrow4)$			
alternan	ASR	sucrose	-	62.9	37.1	0	33		
dextran-*b*-alternan	DSR-M	sucrose	alternan	91.0	9.0	0	171	44.3	8.7
amylose	*Dg*AS	sucrose	maltose	0	0	100	20		
alternan-*b*-amylose	ASR	sucrose	amylose	21.3	9.9	68.8	29	35.8	11.7
dextran-*b*-alternan -*b*-amylose	DSR-M	sucrose	alternan-*b*-amylose	61.3	4.5	34.2	59	45.2	12.9

4.2. Alternan block synthesis and elongation using DSR-M

At the same time, ASR was also used to synthesize LMM alternans directly from sucrose. After synthesis and fractionation by means of preparative SEC, a fraction with an average molar mass of 5388 g.mol^{-1} (estimated from HPSEC data with dextran calibration) was selected for extension by DSR-M (Figure 113A). An HPAEC-PAD analysis of the reaction products revealed the presence of two α-glucan populations, one corresponding to the polymer synthesized by DSR-M from sucrose only, and a second that had been eluted later than the initial alternan acceptor (Figure 113A).

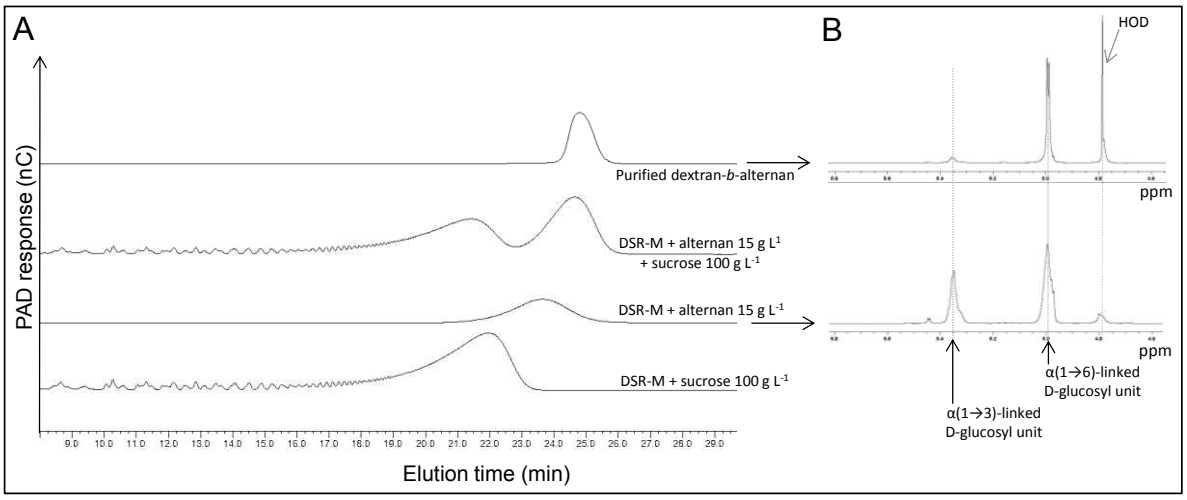


Figure 113 - HPAEC-PAD and ^{1}H NMR analysis of the copolymer synthesis reaction media involving DSR-M and alternan: (A) HPAEC-PAD chromatograms and (B) ^{1}H NMR spectra of dextran-*b*-alternan and alternan. The chemical shifts at 5.35 and 5 ppm were assigned to the $\alpha(1\rightarrow3)$ and $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages respectively.

These results indicate that the alternan block was elongated by DSR-M, resulting in a diblock referred to here as a dextran-*b*-alternan copolymer, since DSR-M is specific for linear $\alpha(1\rightarrow6)$-glucan formation. The diblock was isolated by means of preparative SEC (Figure 113A) and analysed by means of ^{1}H NMR and permethylation (Table 51 and Table 52).

According to the ^{1}H NMR analysis, the number of $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages (including the $\alpha(1\rightarrow3,6)$ branching points) decreased from 37% in the alternan acceptor to 9% in the diblock, indicating that the alternan and dextran blocks represented 24% and 76% of the diblock respectively. Methylation data confirmed the increase proportion of $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages in the diblock and the decrease of $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages and branching points. Finally, from the HPSEC-MALLS analysis of the diblock, a weight-average molar mass of 27,700 g.mol^{-1} (DP171) was determined. Since the molar mass of the alternan block was 5,388 g.mol^{-1} (DP of 33), it was calculated that the alternan and dextran blocks made up 19% and 81% of the diblock respectively. These values do not significantly differ from those obtained from the ^{1}H NMR analysis (24% and 76% respectively). Based on these results, it would appear that the DP of the alternan block in the diblock ranged from 31 to 36 and that of the dextran block from 135 to 140.

Table 52 - Summary of the different glucosyl units detected after sample permethylation.

	Glct	→3)-Glcp-1→	→4)-Glcp-1→	→6)-Glcp-1→	→3,6)-Glcp-1→
	%	%	%	%	%
alternan	8.8	21.6	0	62.3	6.9
dextran-*b*-alternan	2.5	5.1	0	88.9	3.1
amylose	6.6	0	93.4	0	0
alternan-*b*-amylose	5.4	5.2	58	28.4	1.9
dextran-*b*-alternan -*b*-amylose	2.7	1.8	33.5	60.1	1.1

4.3. Production, purification and analysis of a triblock copolymer.

As it had been proven that DSR-M was able to glucosylate LMM alternan, an attempt was made to glucosylate the alternan-*b*-amylose diblock in order to synthesize a triblock. The purified alternan-*b*-amylose copolymer was incubated with DSR-M and sucrose.

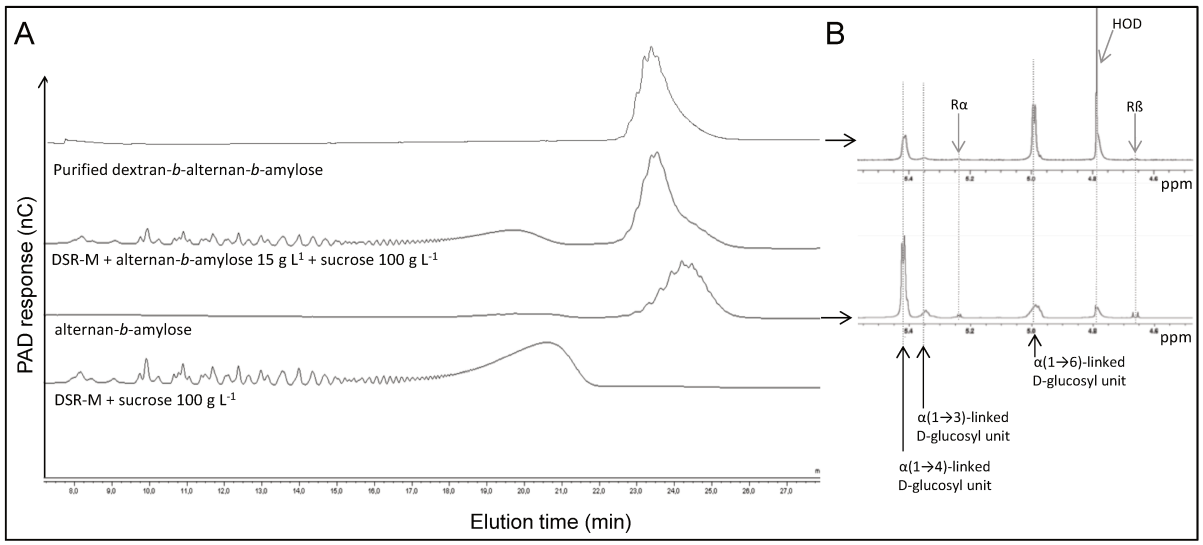


Figure 114 - HPAEC-PAD chromatograms of the purified copolymer obtained from the DSR-M/alternan-b-amylose pair (A), and ^{1}H NMR spectra of dextran-*b*-alternan-*b*-amylose and alternan-*b*-amylose (B). The chemical shifts at 5.45 ppm, 5.35 and 5 ppm were assigned to $\alpha(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ and $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages respectively. Rα and Rβ correspond to the anomeric signals of the reducing –(1→4)-D-Glc*p* units.

After the reaction, it was observed by means of HPAEC-PAD that the concentration of the alternan-*b*-amylose copolymer had decreased, indicating a covalent modification of the diblock copolymer structure (Figure 114). Surprisingly, the elution time of the modified copolymer on the HPAEC chromatogram was lower than that of the acceptor. We can exclude that DSR-M caused hydrolysis of the diblock, since no modification of the diblock was observed when the enzyme was incubated with the diblock alone. A more plausible explanation is that the decrease in the retention time was due to the higher number of $\alpha(1\rightarrow6)$-linked glucosyl units in the triblock, introduced by DSR-M.

As shown in Figure 115, HPAEC-PAD elution times indeed depend on a product's linkage composition, $\alpha(1\rightarrow4)$-linked oligosaccharides being eluted much later than those that are $\alpha(1\rightarrow6)$-linked. In order to investigate the osidic linkage composition of the triblock copolymer, the product was isolated by means of preparative HPAEC-PAD. The product purity was then verified by means of analytical HPAEC-PAD, and the linkage patter was analysed using ^{1}H NMR (Figure 114B, Table 51) and permethylation (Table 52). The results show that the proportion of $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages increased in this purified fraction, whereas $\alpha(1\rightarrow3)$ and $\alpha(1\rightarrow4)$ linkages decreased, while maintaining an almost constant $\alpha(1\rightarrow3)/\alpha(1\rightarrow4)$ linkage

ratio. This is again consistent with the elongation of the diblock by DSR-M, which is specific for the formation of $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages. Low numbers of $\alpha(1\rightarrow3,6)$-linked glucosyl units in the triblock were also detected, indicating the presence of branched molecules (Table 52).

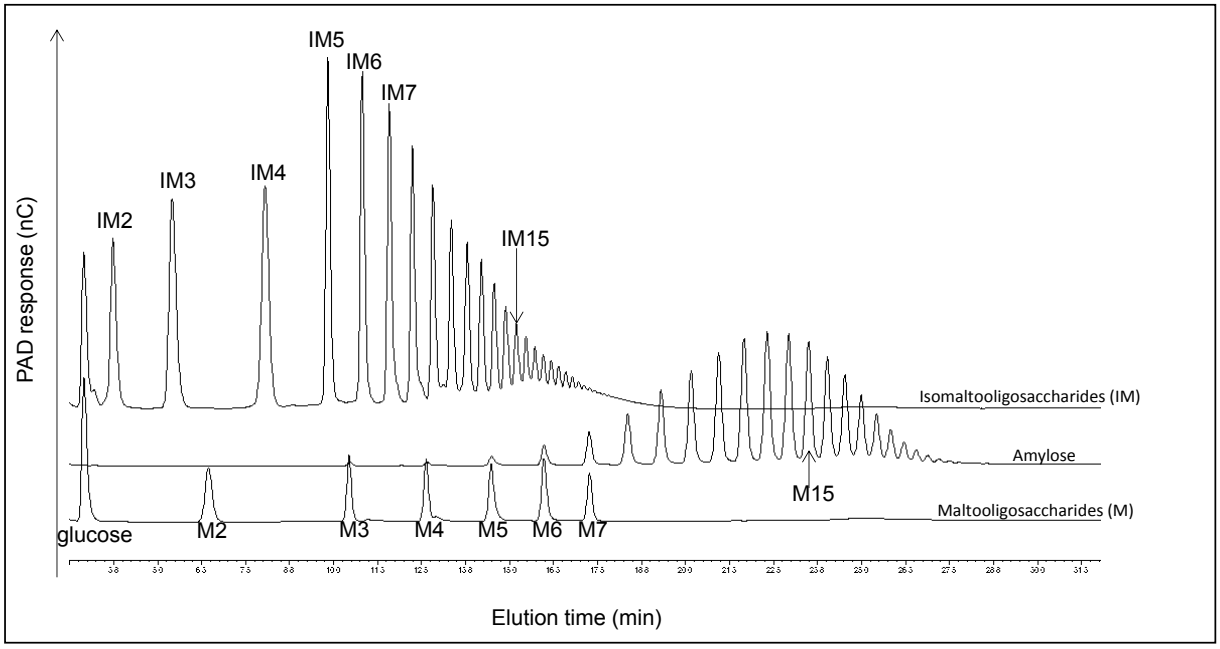


Figure 115 - HPAEC-PAD chromatograms showing the difference in the retention times between $\alpha(1\rightarrow4)$-glucans (maltooligosaccharides and amylose) and $\alpha(1\rightarrow6)$-glucans (isomaltooligosaccharides).

NMR analysis indicated that the proportion of $\alpha(1\rightarrow4)$ linkages in the triblock was 34%. It was thus deduced that the amylose block represented 34% of the triblock. Since the alternan block comprised 31% of the alternan-*b*-amylose copolymer, the proportions of the alternan and dextran blocks in the triblock were 14% and 52% respectively.

As the average DP of the initial alternan-*b*-amylose copolymer was 29, we can deduce that approximately 30 $\alpha(1\rightarrow6)$-linked glucosyl units were grafted to the alternan-*b*-amylose. Thus, the dextran-*b*-alternan-*b*-amylose copolymer should contain 59 glucosyl residues (30 in the dextran block, 9 in the alternan and 20 in the amylose block) with a calculated molar mass of 9,558 $g.mol^{-1}$. These values are average values, as it was assumed that all the chains were elongated to the same extent. Taken together, these results indicate that a triblock copolymer could be obtained by following a stepwise process using the *Dg*AS, ASR and DSR-M enzymes. Examples of structural arrangements of this triblock copolymer are presented in Figure 116.

The specific locations of the osidic linkages, especially in the alternan block, are putative as several structures could correspond to our data.

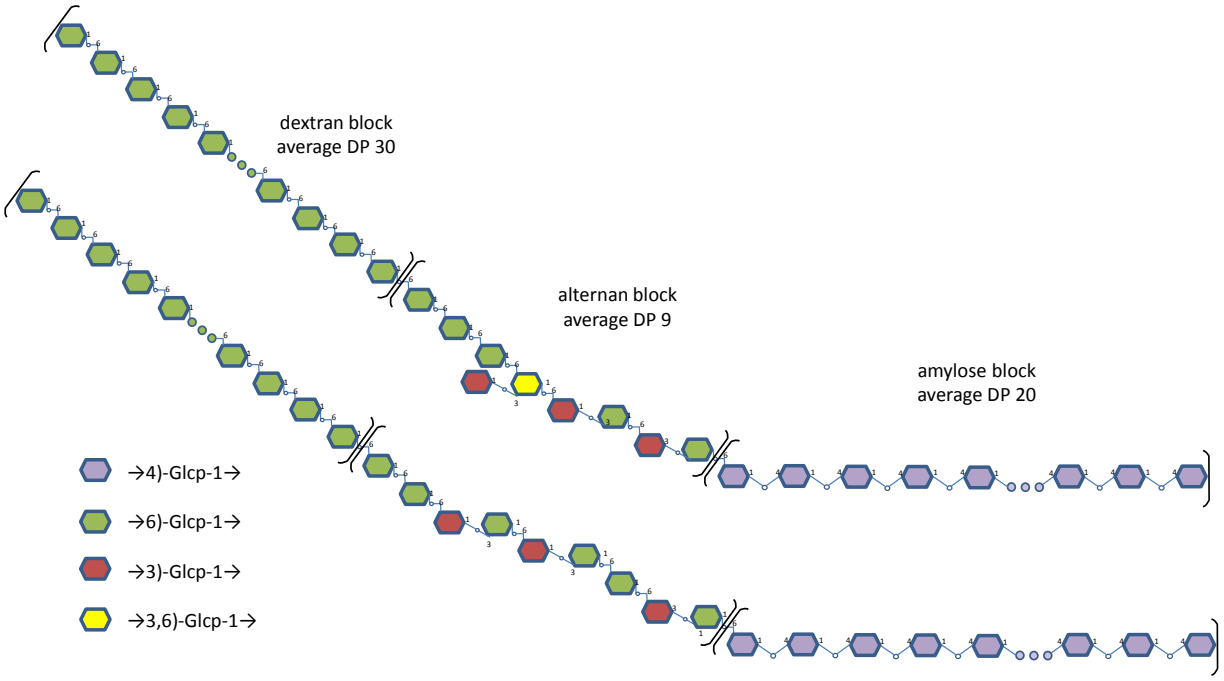


Figure 116 - Examples of structural models proposed for the triblock copolymer dextran-*b*-alternan-*b*-amylose.

4.4. Copolymer conformation in solution

SAXS was used to analyse the conformation of the initial amylose block, as well as of the alternan-*b*-amylose and dextran-*b*-alternan-*b*-amylose copolymers. The SAXS curves obtained for each polymer are shown in Figure 117.

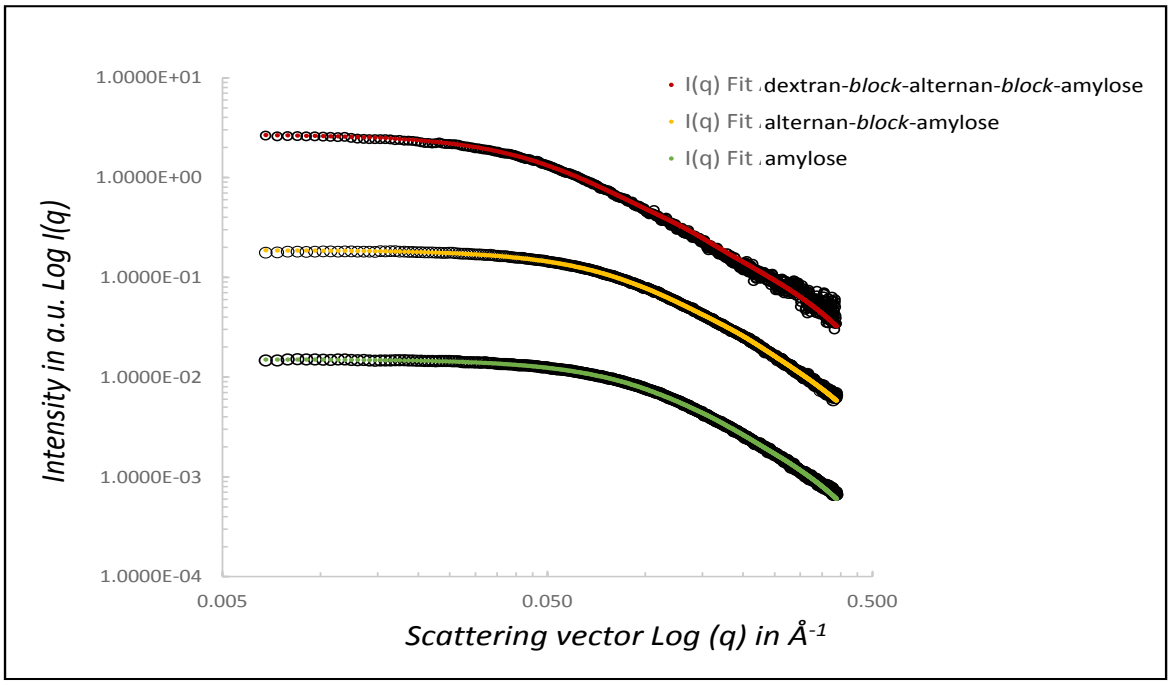


Figure 117 - SAXS curves of the purified triblock copolymer and its diblock and monoblock components.

Log I(q) versus log(q) was used in order to highlight the region of small q angles where the Guinier approximation and different power law regimes can be determined. The radius of gyration (Rg) values obtained for the amylose block, alternan-*b*-amylose diblock and dextran-*b*-alternan-*b*-amylose triblock were 15.1, 17.1 and 30.0 Å respectively. It can therefore be deduced that the addition of each block caused an increase in the copolymer Rg. The SAXS curves with a form factor corresponding to a worm-like chain were then fitted using SASfit (Breβler *et al*., 2015). The worm-like model was adjusted, taking contour length, persistence length and polymer radius as the fitting parameters.

Worm-like conformation is usually used to describe low DP polysaccharide conformation in solution, and has been previously used to investigate the conformational tracking of amylose synthesized by amylosucrase from sucrose as the sole substrate (Roblin *et al*., 2013). Here again, it was observed that the worm-like model fits very well with the data collected from the single, di- and triblocks. The contour length (RL) of the fitted worm-like chain ranged from 85.5 to 271.0 Å (Table 53).

Table 53 - Structural parameters of amylose, alternan-*b*-amylose and dextran-*b*-alternan-*b*-amylose, obtained by SAXS analysis.

	amylose	alternan-*b*-amylose	dextran-*b*-alternan-*b*-amylose
Contour length RL in Å	85.5	131.3	271.0
Persistence length (RLL) in Å	20.7	15.4	21.5
Radius (R) in Å	4.7	4.3	4.8
Gyration radius (Rg) in Å	15.1	17.1	30.0
Maximal distance (Dmax) in Å	70.0	80.0	120.0

This model was also used to estimate the polymer' DPs using a contour length (RL)/monomer size (radius) ratio. The calculated DPs were 20, 30 and 59 for amylose, alternan-*b*-amylose and dextran-*b*-alternan-*b*-amylose respectively. These values are very close to those deduced from the HPAEC-PAD and ^{1}H NMR analyses. The flexibility of the products in solution was assessed based on the persistence length (RLL) factor values. The addition of the alternan block to the amylose block increased the flexibility, as revealed by the RRL shift from 20.7 to 15.4 Å. With regard to dextran-*b*-alternan-*b*-amylose, the fitted values obtained from the worm-like model differed slightly from the experimental data for q values higher than 0.1 Å. In this specific case, the RLL value must therefore be taken with caution. Nevertheless, the log I(q) versus log(q) slope is lower for the experimental values than for the worm-like model, indicating that the addition of the dextran block increased the flexibility of the diblock copolymer. It has been previously demonstrated by means of theoretical and experimental analyses that polysaccharides (amylose, dextran, mutan and cellulose) with the same monosaccharide composition

but different linkage types present different behaviours in solution (Burton & Brant, 1983 ; Elmgren, 1987 ; Cui & Wang, 2005). Using ^{13}C NMR relaxation experiments, Tylianakis and co-workers also showed that dextran flexibility was higher than that of amylose (Tylianakis *et al.*, 1999). The higher flexibility of $\alpha(1\rightarrow6)$-linked chains is due to the presence of an extra bond in the inter-residue linkages, which grants a higher degree of freedom (Neelov, I. M. *et al.*, 2006 ; Lee, G., *et al.*, 2004). This is very consistent with our SAXS analysis results, as each copolymer block differs from the others in terms of its linkage type, which in turn affects its conformation and flexibility. The contrasting properties of each block would be expected to positively impact the applicative potential of the copolymers synthesized in this study. Due to its helical conformation, amylose could certainly prove to be of great interest in drug and flavour complexation. However, as a result of the weak solubility of amylose preparations in water, these kinds of application would require amylose functionalization, such as hydroxypropylation, in order to increase the water solubility of the inclusion complexes (Wulff *et al.*, 1998 ; Wulff *et al.*, 2005). In this study, we demonstrated that the covalent grafting of alternan and dextran blocks to amylose increases flexibility. Such copolymer structures could offer advantages with respect to the encapsulation of bioactive molecules, since the amylose block could serve as the complexing agent, while the alternan and dextran blocks could be used to increase water solubility, due to their greater flexibility.

5. Conclusions

To our knowledge, this study represents the first successful enzymatic synthesis of biosourced block copolymers from sucrose by means of a stepwise approach. Previous studies involved either a glycosyltransferase (Yadav *et al.*, 2010 ; Fu & Robyt, 1991), a glycoside-phosphorylase (Kadokawa *et al.*, 2015 ; Baba *et al.*, 2016 ; Yamashita *et al.*, 2015 ; Shimohigoshi *et al.*, 2013), or transglycosidases (Leemhuis *et al.*, 2014 ; Fu & Robyt, 1990), and produced either statistical copolymers or co-oligomers (of a total size of less than 30 glycosyl units) rather than block copolymers. Here, we demonstrated that the selected glucansucrases (DSR-M and ASR) transfer α-glucosyl residues to acceptor polymers i) with a conformation and linkage composition different from that of their natural acceptors, and ii) a size of up to 30 glucosyl residues, producing copolymers comprising up to 171 residues. The original synthesis method designed for this study successfully resulted, for the first time, in several diblock polysaccharides – dextran-*b*-alternan with a molar mass of 27,700 $g.mol^{-1}$ and alternan-*b*-amylose with a molar mass of 4,700 $g.mol^{-1}$ – and one triblock of dextran-*b*-alternan-*b*-amylose with a molar mass of approximately 9,500 $g.mol^{-1}$. Whether all GH70 enzymes are able to perform such reactions remains to be established. It was noted that ASR elongated amylose, whereas DSR-M did not, revealing that both

the enzyme's specificity and its acceptor's site topology are important. With respect to the objective of producing HMM copolymers on a large scale, the problem appears to be more complex, as the purification techniques currently available do not allow HMM polymer acceptors to be easily separated from either the HMM polymers produced by acceptor elongation or those naturally produced by many glucansucrases. Fractionation based on polymer solubility differences could be a solution, but this remains tricky. Moreover, enzyme engineering may be required in some cases to improve the accommodation of long polymer chains differing in term of their structure from those of the natural polymer. Nevertheless, the conformational analysis of the new copolymers synthesized here showed that covalent grafting of alternan and dextran to amylose increases polymer flexibility. While such properties are likely to generate interest in terms of how these copolymers might be used to encapsulate various molecules of interest, such as aromas or drugs, their potential for such uses will have to be assessed. Scaling up this fully green production process to the dozen gram level will allow us to obtain more information on the structure/property relationships of these copolymers, as well as their potential applications.

6. Acknowledgements

The HPLC analyses were performed using the equipment at the ICEO facility, which is dedicated to the screening, discovery and characterization of new enzymes. ICEO, part of the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA), is supported by grants from the Région Midi-Pyrénées, the European Regional Development Fund and the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). The permethylation analyses were performed with the equipments of the BIBS platform of Nantes (UR1268 BIA, IBiSA, Phenome-Emphasis-FR (grant number ANR-11-INBS-0012)). We are grateful to MetaSys, the Metabolomics and Fluxomics Center at the Laboratory for the Engineering of Biological Systems and Processes (Toulouse, France) for the NMR experiments. We would like to cordially thank Marion Claverie, Nelly Monties, Gianluca Cioci, Karine Cahier and Brigitte Laillet for their technical support. This work was financed by the Agence Nationale de la Recherche (grant number ANR 14-CE27-0011-02).

Résultats complémentaires à la publication

1. Propriétés d'organisation des échantillons du lot 2

1.1. Copolymère alternane-*b*-dextrane

Dans le chapitre précédent, nous avions montré que l'alternane et le dextrane pouvaient recristalliser au cours d'un traitement thermique. Pour ce qui concerne l'oligoalternane et le copolymère alternane-b-dextrane à l'état natif, l'étude par diffraction des rayons X montre qu'ils sont amorphes (Figure 119a). Leur comportement thermique a été étudié par DSC et les thermogrammes sont présentés sur la Figure 118.

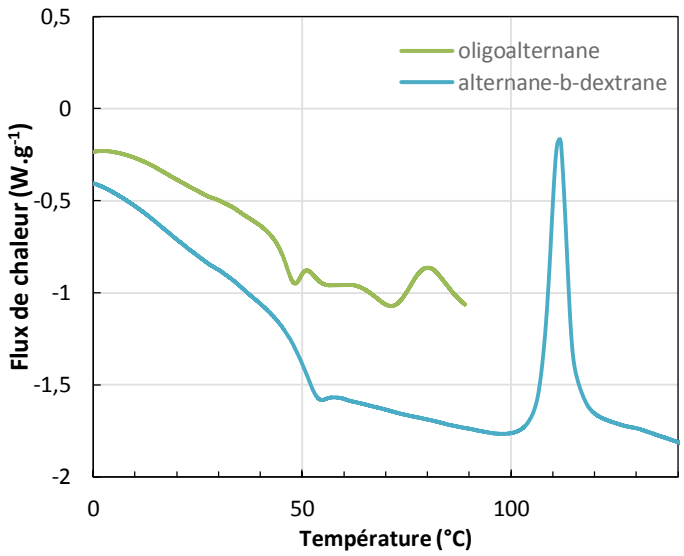


Figure 118 – Thermogrammes obtenus par DSC de l'oligoalternane et du copolymère alternane-*b*-dextrane.

Les caractéristiques thermiques de l'oligoalternane et du copolymère alternane-*b*-dextrane sont répertoriées dans le Tableau 54. La température de transition vitreuse T_g de l'oligoalternane est de 49,6 °C pour 13,7% d'eau et est légèrement inférieure à celle de l'alternane du *Chap. 5* (T_g : 56,3 °C ; 13,8% eau). Ceci s'explique par une mobilité des chaînes plus importante dans le cas de l'oligoalternane comparé à l'alternane de haute masse molaire. Ce comportement a déjà été observé dans le cas des dextranes (Icoz *et al.*, 2005) et de l'amylose (Bizot *et al.*, 1997). Une légère recristallisation a lieu à 79,9 °C avec une faible enthalpie de 3,58 $J.g^{-1}$, elle avait lieu à 77,9 °C avec une enthalpie de 5,0 $J.g^{-1}$ dans le cas de l'alternane du *Chap. 5*. La température de recristallisation est très sensible au taux d'impuretés qui était important dans le cas de l'alternane de haute masse molaire (~5 %).

Tableau 54 - Caractéristiques thermiques de l'oligoalternane et du copolymère alternane-*b*-dextrane obtenues par DSC.

Echantillon	Teneur en eau (%)	T_g (°C)	ΔCp ($J.g^{-1}.K^{-1}$)	T_c (°C)	ΔH_c ($J.g^{-1}$)	Tf (°C)
Oligoalternane	13,7	49,6	0,292	79,9	3,58	-
alternane-*b*-dextrane	13,8	51,5	0,622	111,7	14,14	-

Pour le copolymère alternane-*b*-dextrane, la T_g a lieu à 51,5 °C pour une teneur en eau de 13,8%. Une forte recristallisation se produit à 111,7 °C avec une enthalpie de 14,14 $J.g^{-1}$ mais aucune n'est présente aux alentours de 80 °C (correspondant à la recristallisation de l'oligoalternane). Celle-ci a été confirmée par diffraction des rayons X (Figure 119b) donnant la signature du polymorphe haute température du dextrane (Chanzy *et al.*, 1981). Cette recristallisation qui a lieu à une température moins élevée que pour l'homopolymère de dextrane serait formée par les chaînes linéaires en $\alpha(1\rightarrow6)$ du copolymère.

Figure 119 – Diffractogrammes du bloc oligoalternane et du copolymère alternane-*b*-dextrane. a. Etat natif des échantillons. b. Comparaison des diffractogrammes du dextrane D500 (*Chap. 4*) et du copolymère alternane-*b*-dextrane après traitement thermique à 165 °C.

1.2. Copolymère amylose-*b*-alternane

L'étude par diffraction des rayons X du copolymère amylose-*b*-alternane a montré qu'il était amorphe alors que l'oligoamylose révèle une signature de cristallinité d'une amylose de type A à 80% (Figure 120a). En parallèle, ces échantillons ont été caractérisés par RMN du solide ^{13}C CP-MAS, les spectres complets correspondants sont présentés sur la Figure 120b. Ces deux échantillons présentent des spectres typiques de matériaux amylacés avec 3 massifs principaux carbone C_1 autour de 100 ppm,

$C_{2,3,4,5}$ entre 85 et 65 ppm et enfin C_6 vers 60 ppm (Chevigny *et al*., 2016). La présence d'un triplet entre 65 et 75 ppm confirme la cristallinité de l'oligoamylose, en accord avec les résultats de diffraction des rayons X.

Figure 120 – a. Diffractogrammes du bloc oligoamylose et du copolymère amylose-*b*-alternane à l'état natif. b. Zone polysaccharidique des spectres ^{13}C CP-MAS annotés de l'amylose et du copolymère amylose-*b*-alternane.

Les déconvolutions spectrales des deux échantillons sont présentées sur la Figure 121. La région du carbone C_1, correspondant au massif ayant un déplacement chimique autour de 100 ppm, est la plus sensible aux changements dans les matériaux amylacés amorphes. Une déconvolution de ce massif de pic permet de caractériser la présence de doubles hélices de type A et de simples hélices de type V (Paris *et al*., 1999 ; Chevigny *et al*., 2016). L'intensité du pic à 102 ppm, ayant le plus grand déplacement chimique, est faible dans le cas de l'oligoamylose (10%) et forte dans le cas du copolymère amylose-*b*-alternane (47%). Ce pic est généralement associé aux conformations amorphes.

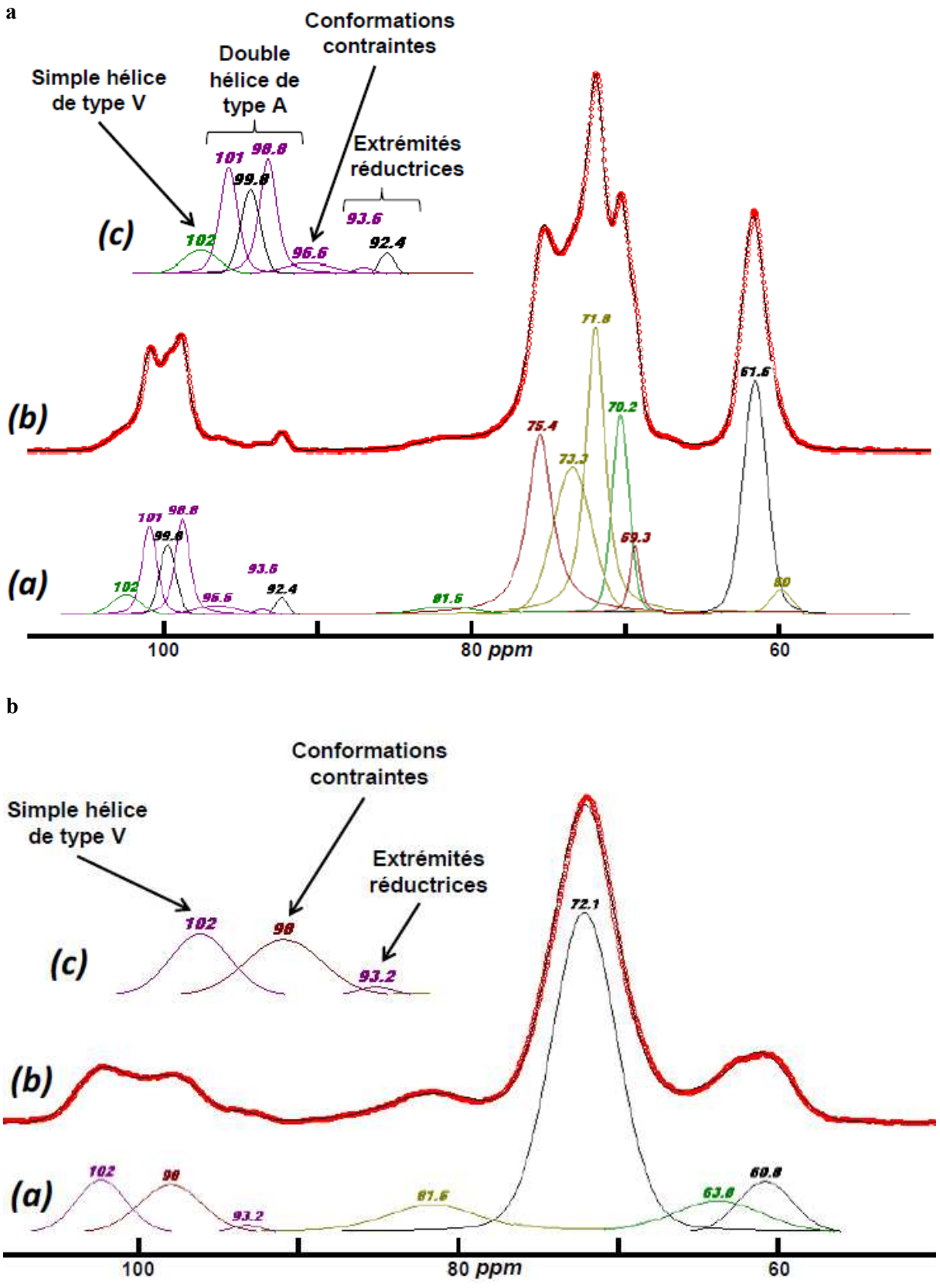


Figure 121 - Spectres ^{13}C CP-MAS de : a. l'amylose lot 2 et b. copolymère amylose-*b*-alternane. (a) spectre déconvolué. (b) spectre expérimental (points rouges) et somme de la déconvolution (trait plein). (c) attribution des différents pics du massif C_1.

Un triplet entre 101 et 98,8 ppm est caractéristique de la présence de doubles hélices de type A, il représente 79% du signal de la zone des C_1, et est visible seulement sur le spectre de l'oligoamylose, en accord avec les résultats obtenus par DRX. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 55.

Le pic présent entre 98 et 97 ppm est très important dans le cas du copolymère amylose-*b*-alternane. Il est souvent associé à des liaisons torsadées contraintes dans des conformations défavorables et est généralement observé dans des amidons amorphes, associé à des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ contraintes amorphes étant apportées, dans notre cas, par l'alternane (Morgan *et al*., 1992). Le dernier pic, présent dans les deux cas entre 93,6 et 92,4 ppm, correspond à des conformations particulièrement défavorables, et est souvent associé aux extrémités réductrices (C_1 réducteurs). Ainsi, il est possible de calculer un degré de polymérisation moyen $\overline{DP}$ selon l'équation suivante :

$$\overline{DP} = \frac{\sum aire\ des\ signaux\ des\ C_1}{aire\ des\ signaux\ des\ C_1\ réducteurs} \quad [64]$$

Un $\overline{DP}$ de 20 est trouvé pour l'oligoamylose en accord avec un $\overline{DP}$ de 17 déterminé par HPSEC-MALLS-DRI. Le $\overline{DP}$ de l'amylose-*b*-alternane déterminé par ^{13}C CP-MAS est de 28, inférieur à celui de 40 déterminé par HPSEC-MALLS-DRI. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'au-delà d'une certaine longueur de chaîne, la RMN n'est plus assez sensible dans la quantification des C_1 réducteurs.

Tableau 55 – Proportions des différentes zones du massif C_1 pour l'amylose et du copolymère amylose-*b*-alternane.

	oligoamylose	**amylose-b-alternane**
Conformations amorphes (pic à 102 ppm)	10%	47%
Doubles hélices	79%	0%
DP	20	28

De la même façon que pour le copolymère alternane-*b*-dextrane, nous avons essayé de recristalliser le copolymère amylose-*b*-alternane. Celui-ci ne recristallise pas par traitement thermique étant donné qu'aucun pic exothermique n'est présent entre 0 et 150 °C pour une teneur en eau de l'échantillon de 11,9 % (Figure 122). En revanche, une température de transition vitreuse T_g est observée pour le copolymère à 45,1 °C pour 11,8 % d'eau et non présente pour l'oligoamylose, puisque celui-ci n'a qu'une faible part amorphe (~20%).

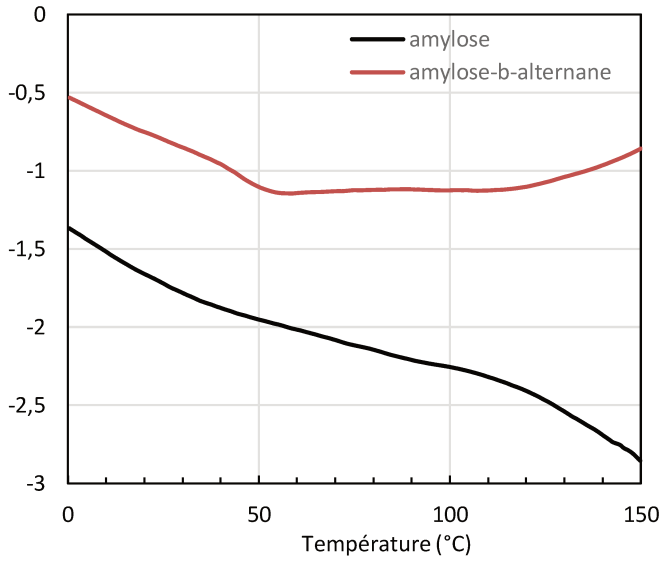


Figure 122 - Thermogrammes obtenus par DSC de l'oligoamylose et du copolymère amylose-*b*-alternane.

Des essais de cristallisation sous humidité élevée ont été réalisés. Les spectres de diffraction des rayons X sont présentés dans la Figure 123. Dans le premier cas, le copolymère est resté 5 jours dans une enceinte à 75% HR et dans le deuxième cas, le copolymère a été placé deux jours dans une enceinte à 98% HR. Lorsque l'échantillon est placé à 75% HR, il y a une modification du signal amorphe avec présence d'une légère cristallinité dans la région en 2θ vers 15 – 18°. Cette cristallinité est largement amplifiée lorsque l'échantillon est placé à 98% HR avec un pic à 5 – 6° signant le profil d'une cristallinité de type B.

Figure 123 – Diffractogrammes du bloc oligoamylose et du copolymère amylose-*b*-alternane montrant l'évolution de la cristallinité du copolymère amylose-*b*-alternane en fonction de la teneur en eau de l'échantillon.

2. Propriétés thermiques des échantillons du lot 2

Une étude de dégradation des échantillons du lot 2 a été réalisée en chauffant l'échantillon jusqu'à 800 °C par ATG (Figure 124). Pour tous les échantillons, une perte de masse, correspondant à environ 10 % de la masse de l'échantillon correspond à l'évaporation de l'eau et est caractérisée par un plateau. Une chute brutale est observée aux alentours de 250 – 300 °C pour tous les échantillons sauf pour le copolymère amylose-*b*-alternane qui a lieu à une température plus basse de 175 °C. Cet échantillon ne contient pas d'impuretés de type fructose ou glucose mais peut contenir des protéines ce qui entraînerait une dégradation du copolymère plus rapidement par réaction de Maillard. Des températures de dégradation situées entre 250 et 350 °C sont habituellement rencontrées avec les polysaccharides.

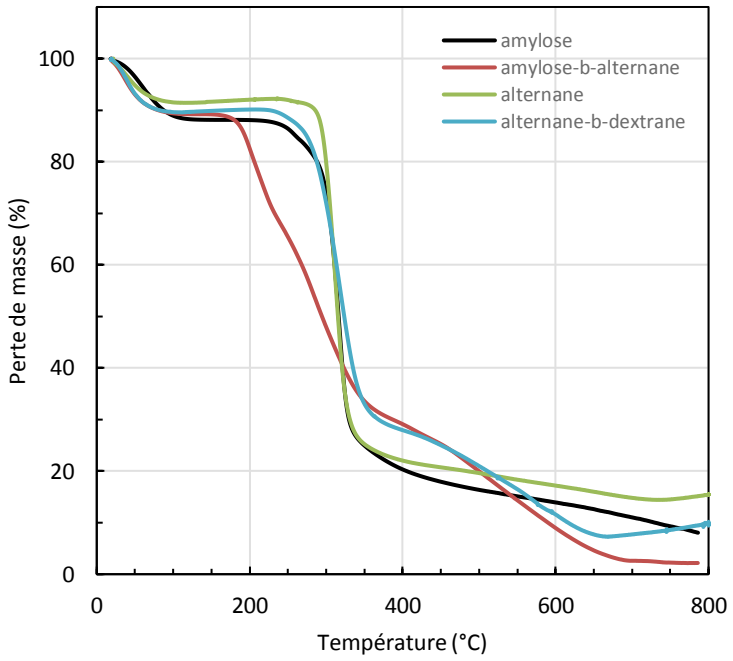


Figure 124 - Courbes de dégradation thermique obtenues par analyse thermogravimétrique des échantillons du lot 2. Perte de masse en fonction de la température (de 25 °C à 800 °C à 10 °C.min^{-1}).

3. Compléments

Une caractérisation des oligoamyloses et des copolymères amylose-*b*-alternane des deux lots ainsi que le tribloc amylose-*b*-alternane-*b*-dextrane a été réalisée par microscopie électronique à balayage (MEB) afin d'observer si une organisation avait lieu pendant les étapes de purification et/ou de séchage. Les images sont reportées dans la Figure 125. L'oligoamylose du lot 1 montre un assemblage en forme de « macaron » sans que celui-ci ne soit cristallin (Figure 125a). En surface de l'objet, il semble y avoir des empilements de « lamelles ». Ces structures n'ont jamais été observées pour des amyloses. Sur la Figure 125b correspondant au copolymère amylose-*b*-alternane du lot 1 (c'est-à-dire à l'oligoamylose

greffé par l'alternane-saccharase ASR), ces formes de macarons sont toujours présentes mais semblent liées par une matrice pouvant correspondre à la partie alternane du copolymère où les parties amyloses seraient regroupées en bloc. En revanche, les oligoamyloses du lot 2 (Figure 125c) sont des objets bien définis caractéristiques de structures cristallines comme l'ont montré les analyses réalisées par DRX et ^{13}C CP-MAS. Le copolymère amylose-*b*-alternane du lot 2 présenté sur la Figure 125d ne semble pas avoir d'organisation particulière. Ces différences observées entre les produits issus des deux lots de fabrication peuvent s'expliquer par les techniques de purification mises en oeuvre. En effet dans le cas du lot 2, les échantillons ont subi des étapes de précipitations successives dans un mélange isopropanol/eau. Les alcools sont connus pour complexer l'amylose qui forme alors un complexe cristallin. Les échantillons du lot 1 n'ont pas été précipités mais directement purifiés sur colonne, ce qui pourrait expliquer la non cristallinité des produits résultants.

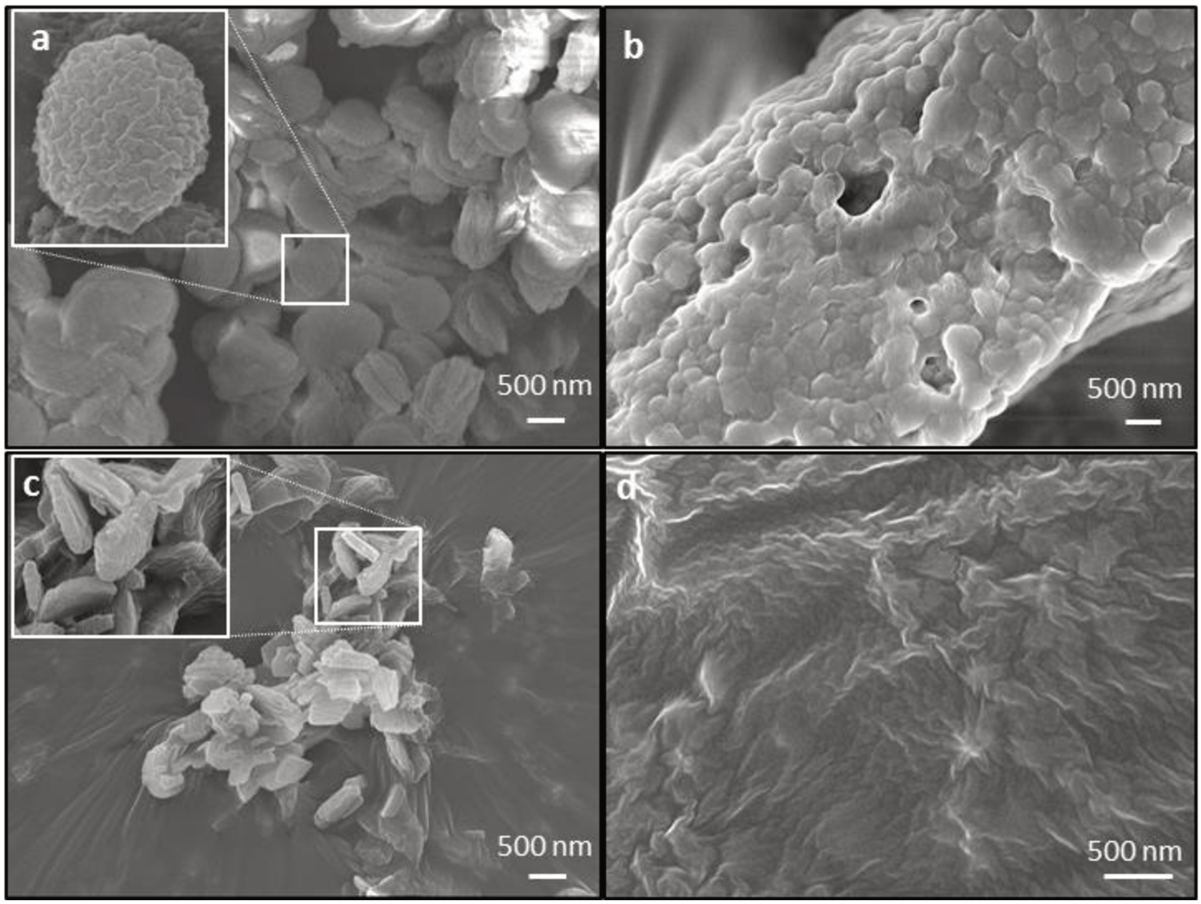


Figure 125 - Images obtenues par microscopie électronique à balayage du bloc amylose et du copolymère amylose-*b*-alternane. a. oligoamylose lot 1. b. copolymère amylose-*b*-alternane lot 1. c. oligoamylose lot 2. b. copolymère amylose-*b*-alternane lot 2.

Le tribloc amylose-*b*-alternane-*b*-dextrane a également été observé au MEB et les images obtenues sont présentées dans la Figure 126. Un échantillon présentant une structure très hétérogène allant de la forme

sphérique aux longs batônnets est observé (Figure 126a). A un grossissement plus important, la Figure 126b montre une structure poreuse qui n'a pas été observée avec les autres échantillons. Il semblerait y avoir une nano-structure pour ce tribloc.

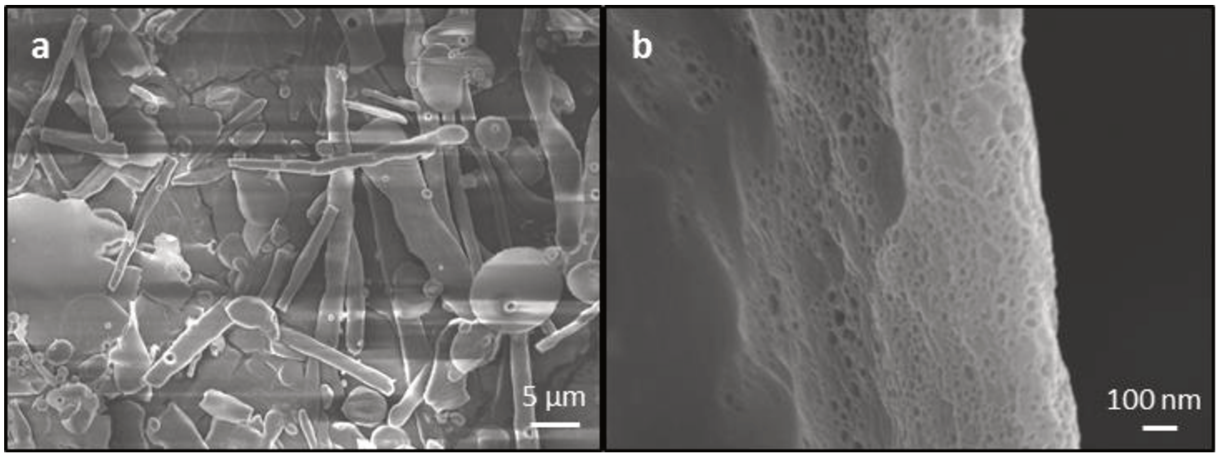


Figure 126 - Images obtenues par microscopie électronique à balayage du tribloc amylose-*b*-alternane-*b*-dextrane à deux grossissements différents.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux effectués aux cours de cette thèse avaient pour objectif de caractériser la structure moléculaire et de déterminer les propriétés rhéologiques, thermiques et mécaniques d'α-glucanes obtenus par synthèse enzymatique, à partir de saccharose, au LISBP. D'une part, il s'agissait d'approfondir la compréhension des relations structure/propriétés de ces polysaccharides et d'autre part d'envisager la synthèse de copolymères à bloc, avec des blocs aux propriétés contrastées et constitués uniquement de polysaccharides.

Une large gamme d'α-glucanes a été synthétisée et caractérisée. Au début de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact du branchement (taux et type) sur un dextrane de très haute masse molaire constitué principalement de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ (98%) produit par l'enzyme DSR-OK découvert il y a peu de temps (Vuillemin *et al.,* 2018). Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Carbohydrate Polymers*. Le branchement de dextranes de masse molaire plus faible a aussi été réalisé à partir du dextrane commercial D500 ou à partir de l'enzyme DSR-M, afin d'étudier leurs propriétés et de déterminer l'impact de ce branchement par rapport à la masse molaire du polysaccharide. Nous avons constaté que ces dextranes ne formaient pas d'agrégats en solution, que le branchement empêchait la recristallisation dans certains cas et que la masse molaire avait un rôle important dans le pouvoir filmogène de ces dextranes. En revanche, les propriétés mécaniques des dextranes branchés n'étaient toutefois pas améliorées.

Par la suite, d'autres α-glucanes comme l'alternane, les reutéranes et les mutanes, constitués de diverses liaisons osidiques dans la chaîne principale, ont été synthétisés et étudiés. Ces travaux ont montré que l'alternane constitué d'une alternance de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow3)$ était soluble dans l'eau contrairement à ce qui a pu être recensé dans la littérature et qu'il avait une densité moléculaire très élevée se rapprochant de celle des glycogènes. Ses propriétés rhéologiques sont de type gel fort aux fortes concentrations et ce comportement a été montré uniquement pour ce polysaccharide parmi 21 α-glucanes étudiés. La formation de films d'alternane par casting est défavorisée du fait de sa forte densité, expliquée par l'important repliement de la chaîne sur elle-même dû à la répartition des liaisons, favorisant les liaisons intra-moléculaires au dépend des liaisons inter-moléculaires, en défaveur des propriétés filmogènes des films. Les propriétés mécaniques de l'alternane ne sont donc pas mesurables. Les reutéranes, qu'ils soient synthétisés par l'enzyme GS-X purifiée ou non, présentent des tailles similaires aux dextranes produits par l'enzyme DSR-OK. En revanche, le reutérane obtenu à l'aide de l'enzyme purifiée n'est pas agrégé dans l'eau et présente un spectre rhéologique différent de celui du reutérane obtenu avec l'enzyme non purifiée. Nous avons expliqué cette différence par une potentielle modification de structure du reutérane synthétisé avec l'enzyme non purifiée car cette enzyme faisait partie d'un extrait contenant des enzymes de *E. coli* aux multiples activités. La caractérisation des mutanes s'est avérée compliquée du fait de l'insolubilité dans l'eau de ces polysaccharides.

Ce travail préalable a permis d'identifier les blocs polysaccharidiques d'intérêt pour la synthèse des copolymères à bloc originaux. Les assemblages privilégiés sont ceux comportant des blocs aux propriétés les plus éloignées possibles en termes de solubilité et/ou de cristallinité et/ou de densité.

En combinant la glyco-enzymologie et l'ingénierie des protéines, deux copolymères à blocs, l'amylose-*b*-alternane et l'alternane-*b*-dextrane ainsi qu'un copolymère tribloc ont été synthétisés par voie enzymatique, voie de synthèse très peu étudiée pour l'obtention de copolymères. Des hypothèses de structures ont été émises. La présence de points de branchements en particulier a montré la complexité structurale de ces molécules. Les propriétés mécaniques de ces copolymères n'ont pas pu être déterminées du fait de leurs trop faibles tailles. Des essais préliminaires de structuration de ces copolymères ont été mis en œuvre. Si le changement de structure de ces copolymères en solution n'a pas été possible à obtenir, une organisation par effet de la température ou de l'humidité s'est montrée concluante quant à la cristallisation d'un des blocs.

Ces travaux illustrent la démarche adoptée pour le choix des blocs constitutifs de copolymères polysaccharidiques.

Plusieurs perspectives peuvent être proposées sur la base de notre travail.

Pour le moment, des copolymères de faibles masses molaires ont été obtenus. S'il est possible de les synthétiser par voie enzymatique, il serait intéressant à l'avenir d'étudier le comportement de copolymères de plus grandes masses molaires. En effet, les extrémités de chaînes sont difficilement accessibles par les enzymes lorsque le polysaccharide commence à avoir une taille conséquente. C'est pour cette raison que des oligosaccharides ont été synthétisés afin de faciliter l'accès de la deuxième enzyme sur celui-ci pour la synthèse du copolymère à bloc.

Dans notre cas, les α-glucanes étudiés étaient tous hydrophiles et neutres (non chargés) limitant les phénomènes d'organisation en solution. Une solution pourrait être la modification chimique de ces polysaccharides hydrophiles par la fixation de groupements hydrophobes pouvant leur apporter un caractère amphiphile. Les polysaccharides amphiphiles trouvent de nombreuses applications dans les domaines médicales, cosmétiques et agroalimentaires notamment grâce à leurs propriétés émulsifiantes. Ces travaux pourraient être complétés par l'utilisation de polyélectrolytes tels que le chitosane, le hyaluronane ou le xanthane. L'utilisation de ces polysaccharides permettrait d'obtenir des copolymères à blocs neutre-*b*-chargé(+ ou -) ou chargé(+)-*b*-chargé(-) où l'auto-assemblage serait régi par des interactions électrostatiques. Ces auto-assemblages sont notamment étudiés pour la délivrance de principes actifs.

Ce travail a conduit à une publication dans une revue à comité de lecture ainsi qu'à neuf communications orales et par affiche à des congrès nationaux et internationaux. La publication présentée dans le *Chapitre 6* a été acceptée en mai 2018 dans le journal Green Chemistry et une publication concernant la caractérisation de l'alternane sera soumise prochainement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aeschelmann, F., & Carus, M. (2015). In Bio-Based Building Blocks and Polymers in the World-Capacities, Production and Applications: Status Quo and Trends Towards 2020. nova-Institut GmbH: Hürth, Germany, p. 7.

Agut, W. (2008). Conception de nano-objets adaptatifs à base de polypeptides. *Thèse de doctorat*. Université de Bordeaux, France.

Aissou, K., Orsuka, I., Rochas, C., Fort, S., Halila, S., & Borsali, R. (2011). Nano-organization of amylose-b-polystyrene block copolymer films doped with bipyridine. *Langmuir*, 27, 4098–4103.

Akiyoshi, K., Kohara, M., Ito, K., Kitamura, S., & Sunamoto, J. (1999). Enzymatic synthesis and characterization of amphiphilic block copolymers of poly(ethylene oxide) and amylose. *Macromolecular Rapid Communications,* 20, 112–115.

Albenne, C., Skov, L., Mirza, O., Gajhede, M., Feller, G., d'Amico, S., André, G., Potocki-Véronèse, G., van der Veen, B. A., Monsan, P., & Remaud-Siméon, M. (2004). Molecular basis of the amylose-like polymer formation catalyzed by *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 726–734.

André, I., Potocki-Véronèse, G., Morel, S., Monsan, P., & Remaud-Siméon, M. (2010). Sucrose-utilizing transglucosidases for biocatalysis. *Carbohydrates in Sustainable Development I*, Springer Berlin Heidelberg, 25–48.

Antoniou, E., Buitrago, C. F., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2010). Solvent effects on polysaccharide conformation. *Carbohydrate Polymers*, 79, 380–390.

Antoniou, E., & Tsianou, M. (2012). Solution properties of dextran in water and in formamide. *Journal of Applied Polymer Science*, 125, 1681–1692.

Anumula, K. R., & Taylor, P. B. (1992). A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 203, 101–108.

Argüello-Morales, M. A., Remaud-Siméon, M., Pizzut, S., Sarcabal, P., Willemot, R. M., & Monsan, P. (2000). Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiology Letters*, 182, 81–85.

B

Baba, R., Yamamoto, K., & Kadokawa, J. I. (2016). Synthesis of α(1→4)-linked non-natural mannoglucans by α-glucan phosphorylase-catalyzed enzymatic copolymerization. *Carbohydrate Polymers,* 151, 1034–1039.

Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29, 54–66.

Basedow, A. M., Ebert, K. H., & Feigenbutz, W. (1980). Polymer-solvent interactions: dextrans in water and DMSO. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 181, 1071–1080.

BeMiller, J. N., & Whistler, R. L. (2009). Starch: Chemistry and Technology. Academic Press.

Benoit, H., Grubisic, Z., Rempp, P., Decker, D., & Zilliox, J. G. (1966). Etude par chromatographie en phase liquide de polystyrenes linéaires et ramifiés de structures connues. *Journal de Chimie Physique*, 63, 1507–1514.

Berry, G. C. (1966). Thermodynamic and conformational properties of polystyrene. I. Light-scaterring studies on dilute solutions of linear polystyrenes. *The Journal of Chemical Physics*, 44, 4550–4564.

Bizot, H., Le Bail, P., Leroux, B., Davy, J., Roger, P., & Buléon, A. (1997). Calorimetric evaluation of the glass transition in hydrated, linear and branched polyanhydroglucose. *Carbohydrate Polymers*, 32, 33–50

Breßler, I., Kohlbrecher, J., & Thünemann, A. F. (2015). SASfit: a tool for small-angle scattering data analysis using a library of analytical expressions. *Journal of Applied Crystallography,* 48, 1587–1598.

Brown, W., & Nicolai, T. (1993). Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications. In: W. Brown (Ed.), Clarendon Press, Oxford: New York, USA, 272–318.

Brison, Y., Fabre, E., Moulis, C., Portais, J. C., Monsan, P., & Remaud-Siméon, M. (2010). Synthesis of dextrans with controlled amounts of α-1,2 linkages using the transglucosidase GBD-CD2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 545–554.

Brison, Y., Pijning, T., Malbert, Y., Fabre, E., Mourey, L., Morel, S., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., Tranier, S., Remaud-Siméon, M., & Dijkstra, B. W. (2012). Functional and structural characterization of α-(1→2) branching sucrase derived from DSR-E glucansucrase. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 7915–7924.

Brisson, J., Chanzy, H., & Winter, W. T. (1991). The crystal and molecular structure of V H amylose by electron diffraction analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 31–39.

Buléon, A., Duprat, F., Booy, F. P., & Chanzy, H. (1984). Single crystals of amylose with a low degree of polymerization. *Carbohydrate Polymers*, 4, 161–173.

Buléon, A., Colonna, P., & Leloup, V. (1990). Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *Industries Alimentaires et Agricoles,* 107*,* 515–532.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85–112.

Buléon, A., Véronèse, G., & Putaux, J. L. (2007). Self-association and crystallization of amylose. *Australian Journal of Chemistry*, 60, 706–718.

Burchard, W. (1977). Particle scaterring factors of some branched polymers. *Macromolecules*, 10, 919–927.

Burchard, W. (1983). Static et dynamic light scattering from branched polymers and biopolymers. *Advances in Polymer Science*, 48, 1–124.

Burchard, W. (1999). Solution properties of branched macromolecules. *Advances in Polymer Science*, 143, 113–194.

Burton, B. A., & Brant, D. A. (1983). Comparative flexibility, extension, and conformation of some simple polysaccharide chains. *Biopolymers,* 22, 1769–1792.

Busetti, C., & Crimella, T. (2001). Time-specific controlled release capsule formulations and method of preparing same. U.S. patent 6190692.

C

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37, 233–238.

Carrasco, F., Chornet, E., Overend, R. P., & Costa, J. (1989). A generalized correlation for the viscosity of dextrans in aqueous solutions as a function of temperature, concentration, and molecular weight at low shear rates. *Journal of Applied Polymer Science*, 37, 2087–2098.

Cassano, R., Trombino, S., Muzzalupo, R., Tavano, L., & Picci, N. (2009). A novel dextran hydrogel linking trans-ferulic acid for the stabilization and transdermal delivery of vitamin E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 232–238.

Casadei, M. A., Cerreto, F., Cesa, S., Giannuzzo, M., Feeney, M., Marianecci, C., & Paolicelli, P. (2006). Solid lipid nanoparticules incorporated in dextran hydrogels : a new drug delivery system for oral formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 325, 140–146.

Chanzy, H., Guizard, C., & Sarko, A. (1980). Single crystals of dextran: 1. Low temperature polymorph. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2, 149–153.

Chanzy, H., Excoffier, G., & Guizard, C. (1981). Single crystals of dextran: High temperature polymorph. *Carbohydrate Polymers*, 1, 67–77.

Cheetham, N. W. H., Fiala-Beer, E., & Walker, G. J. (1991). Dextran structural details from high-field proton NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 14, 149–158.

Chevigny, C., Foucat, L., Rolland-Sabaté, A., Buléon, A., & Lourdin, D. (2016). Shape-memory effect in amorphous potato starch: the influence of local orders and paracristallinity. *Carbohydrate Polymers*, 146, 411–419.

Choma, A., Wiater, A., Komaniecka, I., Padulch, R., Pleszczynska, M., & Szczodrak, J. (2013). Chemical characterization of a water insoluble (1→3)-α-D-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*. *Carbohydrate Polymers*, 91, 603–608.

Chu, B. (1995). Structure and dynamics of block copolymer colloids. *Langmuir*, 11, 414–421.

Claverie, M., Cioci, G., Vuillemin, M., Monties, N., Roblin, P., Lippens, G., Remaud-Siméon, M., & Moulis, C. (2017). Investigations on the determinants responsible for low molar mass dextran formation by DSR-M dextransucrase. *ACS Catalysis*, 7, 7106–7119.

Colfen, H., & Antonietti, M. (2000). Field-flow fractionation techniques for polymer and colloid analysis. *Advances in Polymer Science*, 150, 67–187.

Côté, G. L., & Tao, B. Y. (1990). Oligosaccharide synthesis by enzymatic transglycosylation. *Glycoconjugate Journal,* 7, 145–162.

Côté, G. L. (1992). Low-viscosity *α*-D-glucan fractions derived from sucrose which are resistant to enzymatic digestion. *Carbohydrate Polymers*, 19, 249–252.

Côté, G. L. (2002). In: Vandamme, E. J., de Baets, S., Steinbüchel, A. (eds) Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. *Biopolymers*, 5, 323–350.

Côté, G. L., Holt, S. M., & Miller-Fosmore, C. (2003). Prebiotic oligosaccharides via alternansucrase acceptor reactions. *Oligosaccharides in Food and Agriculture*, 849, 77–89.

Côté, G. L., & Sheng, S. (2006). Penta-, hexa-, and heptasaccharide acceptor products of alternansucrase. *Carbohydrate Research*, 341, 2066–2072.

Côté, G. L. (2009). Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose. Production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness. *Carbohydrate Research,* 344, 187–190.

Cui, S., & Wang, Q. (2005). Understanding the Physical Properties of Food Polysaccharides. In *Food Carbohydrates*, CRC Press: 2005.

D

Daude, D., Champion, E., Morel, S., Guieysse, D., Remaud-Simeon, M., & Andre, I. (2013). Probing substrate promiscuity of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Chemcatchem,* 5, 2288–2295.

David, G., & Perez, J. (2009). Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline. *Journal of Applied Crystallography,* 42, 892–900.

de Belder, A. N. (1990). Dextran. *Uppsala Sweden: Pharmacia*.

Debye, P. (1947). Molecular-weight determination by light scattering. *Journal of Physical Colloid Chemistry*, 51, 18–32.

De Gennes, P. G. (1979). Scaling Concepts in Polymer Physics. Cornwell University Press: Ithaca, New York, USA.

Dellacherie, E. (1996). Polysaccharides in oxygen-carrier blood substitutes. *Polysaccharides in medicinal applications*, 525–544.

Derkaoui, S. M., Labbé, A., Purnama, A., Gueguen, V., Barbaud, C., Avramoglou, T., & Letourneur, D. (2010). Films of dextran-*graft*-polybutylmethacrylate to enhance endothelialization of materials. *Acta Biomaterialia*, 6, 3506–3513.

Dols, M., Remaud-Simeon, M., Willemot, R. M., Vignon, M., & Monsan, P. F. (1997). Characterization of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroid*es NRRL B-1299. *Applied biochemistry and biotechnology*, 62, 47–59.

E

Eliasson, A. C., Eliasson, K. C., Larsson, K., & Quaglia, G. N. A. (1993). Cereals in breadmaking: a molecular colloidal approach. Macel Dekker.

Elmalak, O., Lovich, M. A., & Edelman, E. (2000). Correlation of transarterial transport of various dextrans with their physicochemical properties. *Biomaterials*, 21, 2263–2272.

Elmgren, H. (1987). The concentration dependence of the sedimentation rate of amylose, cellulose, and dextran in aqueous solution. *Carbohydrate Research,* 160, 227–241.

Emond, S., Mondeil, S., Jaziri, K., Andre, I., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., & Potocki-Véronèse, G. (2008). Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*. *Fems Microbiology Letters,* 285, 25–32.

Englyst, H. N., & Cummings, J. H. (1988). Improved method of measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 71, 808–814.

Enomoto, N., Furukawa, S., Ogasawara, Y., Akano, H., Kawamura, Y., Yashima, E., & Okamoto, Y. (1996). Preparation of silica gel-bonded amylose through enzyme-catalyzed polymerization and chiral recognition ability of its phenylcarbamate derivative in HPLC. *Analytical Chemistry,* 68, 2798–2804.

F

Falco, C. Y., Falkman, P., Risbo, J., Cardenas, M., & Medronho, B. (2017). Chitosan-dextran sulfate hydrogels as a potential carrier for probiotics. *Carbohydrate Polymers*, 172, 175–183.

Falconer, D. J., Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2011). Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextransucrase, the sucrose concentration, and the temperature. *Carbohydrate Research*, 346, 280–284.

Faucard, P., Grimaud, F., Lourdin, D., Maigret, J. E., Moulis, C., Remaud-Siméon, M., Putaux, J. L., Potocki-Véronèse, G., & Rolland-Sabaté, A. (2018). Macromolecular structure and film properties of enzymatically-engineered high molar mass dextrans. *Carbohydrate Polymers*, 181, 337−344.

Fleury, C. (2001). Structuration et rhéologie des solutions de copolymères triblocs SBM: smectiques frustres d'intérêt industriel. *Thèse de doctorat*, Université Pierre et Marie Curie, France.

Flodin, P., & Porath, J. (1961). Process of separing materials having different molecular weight and dimensions. U.S. Patent 3002823.

Flory, P. J. (1969). Statistical mechanics of chain molecules ; Interscience: New York, U.S.A.

Frampton, J. P., Lai, D., Lounds, M., Chung, K., Kim, J., Mansfield, J. F., & Takayama, S. (2015). Elongation of fibers from highly viscous dextran solutions enables fabrication of rapidly dissolving drug carrying fabrics. *Advanced Healthcare Materials*, 4, 313–319.

Franssen, O., Vandervennet, L., Roders, P., & Hennink, W. E. (1999). Degradable dextran hydrogels : controlled release of a model protein from cylinders and microspheres. *Journal of Controlled Release*, 60, 211–221.

French, A. D., & Murphy, V. G. (1977). Computer modeling in the study of starch. *Cereal Foods World*, 22, 61–70.

Fu, D., & Robyt, J. F. (1990). Acceptor reactions of maltodextrins with Leuconostoc mesenteroides B-512FM dextransucrase. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 283, 379–387.

Fu, D., & Robyt, J. F. (1991). Maltodextrin acceptor reactions of *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases. *Carbohydrate Research,* 217, 201–211.

Fujiwara, T., Hoshino, T., Ooshima, T., Sobue, S., & Hamada, S. (2000). Purification, characterization and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from *Streptococcus oralis*. *Infection and Immunology*, 68, 2475–2483.

Fukui, K., Moriyama, T., Miyake, Y., Mizutani, K., & Tanaka, O. (1982). Purification and properties of glucosyltransferase responsible fro water-insoluble glucan synthesis from *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 37, 1–9.

Funane, K., Mizuno, K., Takahara, H., & Kobayashi, M. (2000). Gene encoding a dextransucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 29–38.

G

Gangoiti, J., van Leeuwen, S. S., Gerwig, G . J., Duboux, S., Vafiadi, C., Pijning, T., & Dijkhuizen, L. (2017). 4,3-α-Glucanotransferase, a novel reaction specificity in glycoside hydrolase family 70 and clan GH-H. *Scientific Reports*, 7, 39761.

Gekko, K. (1978). Thermal analysis of low molecular weight dextran. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 1287–1288.

Gelders, G., Goesaert, H., & Delcour, J. A. (2005). Potato phosphorylase catalyzed synthesis of amylose-lipid complexes. *Biomacromolecules,* 6, 2622–2629.

Gidley, M. J. (1989). Molecular mechanisms underlying amylose aggregation and gelation. *Macromolecules,* 22, 351–358.

Giddings, J. C. (1966). A new separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities. *Separation Science*, 1, 123–125.

Gilmore, K. S., Russell, R. R., & Ferretti, J. J. (1990). Analysis of the *Streptococcus downei* gtfS gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. *Infection and immunity*, 58, 2452–2458.

Gordon, M., & Taylor, J. S. (1952). Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry*, 2, 493–500.

Gorna, K., Hund, M., Vucak, M., Gröhn, F., & Wegner, G. (2008). Amorphous calcium carbonate in form of spherical nanosized particles and its application as fillers for polymers. *Materials Science Engineering: A*, 477, 217–225.

Granath, K. (1958). Solution properties of branched dextrans. *Journal of Colloid Science*, 13, 308–328.

Grimaud, F., Lancelon-Pin, C., Rolland-Sabaté, A., Roussel, X., Laguerre, S., Viksø-Nielsen, A., Putaux, J.-L., Guilois, S., Buléon, A., D'Hulst, C., & Potocki-Véronèse, G. (2013). In vitro synthesis of hyperbranched α-glucans using a biomimetic enzymatic toolbox. *Biomacromolecules*, 14, 438–447.

Guizard, C., Chanzy, H., & Sarko, A. (1984). Molecular and crystal structure of dextrans: a combined electron and X-ray diffraction. 1. The anhydrous high-temperature polymorph. *Macromolecules*, 17, 100–107.

Guizard, C., Chanzy, H., & Sarko, A. (1985). The molecular and crystal structure of dextrans: a combined electron and X-ray diffraction study. 2. A low temperature hydrated polymorph. *Journal of Molecular Biology*, 183, 397–408.

H

Ha, S. J., Seo, D. H., Jung, J. H., Cha, J., Kim, T. J., Kim, Y. W., Park, C. S. (2009). Molecular cloning and functional expression of a new amylosucrase from *Altermonas macleodii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 1505–1512.

Hamley, I. W. (1998). The physics of block copolymers. Oxford University Press: Oxford.

Han, J. A., & Lim, S. T. (2004). Structural changes of corn starches by heating and stirring in DMSO measured by SEC-MALLS-RI system. *Carbohydrate Polymers*, 55, 265–272.

Hanada, N., Isobe, Y., Aizawa, Y., Katayama, T., Sato, S., & Inoue, M. (1993). Nucleotide sequence analysis of the gtfT gene from Streptococcus sobrinus OMZ176. *Infection and Immunity*, 61, 2096–2103.

Hanada, N., Fukushima, K., Nomura, Y., Senpuku, H., Hayakawa, M., Mukasa, H., Shiroza, T., & Abiko, Y. (2002). Cloning and nucleotide sequence analysis of the Streptococcus sobrinus gtf U gene that produces a highly branched water-soluble glucan. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, 1570, 75–79.

Hankley, K. J., & Lodge, T. P. (2000). Phase behavior of a block copolymer in solvents of varying selectivity. *Macromolecules*, 2000, 33, 5918–5931.

Harding, S. E., & Rowe, A. J. (2010). Insight into protein-protein interactions from analytical ultracentrifugation. *Biochemical Society Transactions*, 38, 901–907.

Hare, M. D., Svensson, S., & Walker, G. J. (1978). Characterization of the extracellular, water-insoluble α-D-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. *Carbohydrate Research*, 66, 245–264.

Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B., & Stone, B. A. (1984). An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 127, 59–73.

Hatanaka, D., Takemoto, Y., Yamamoto, K., & Kadokawa, J. I. (2014). Hierarchically Self-Assembled Nanofiber Films from Amylose-Grafted Carboxymethyl Cellulose. Fibers: 2014; Vol. 2, pp 34-44.

Hehre, E. J. & M. H. (1951). With the assistance of Doris, *Journal of Biological Chemistry*, 192, 161–174.

Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., & Hornig, S. (2006). Functional polymers based on dextran. In *Polysaccharides II*. Springer Berlin Heidelberg, 199–291.

Hennink, W. E., Franssen, O., Van Dijk-Wolthuis, W. E., & Talsma, H. (1997). Dextran hydrogels for the controlled released of proteins. *Journal of Controlled Release*, 48, 107–114.

Hershline, R.K. (2004). Antiviral composition. U.S. Patent 6821958.

Hirata, Y., Sano, M., Aoki, H., Kobatake, S., Kato, J., & Yamamoto, H. (1999). Structural change in dextran: Mechanism of insolubilization by adsorption on the air-liquid interface. *Journal of colloid and interface science,* 212, 530–534.

Hirata, Y., Sano, M., Aoki, H., Shohji, S., Kato, J., Abe, S., Hitsukuri, H., & Yamamoto, H. (2003). Small-angle X-ray scattering studies of moderately concentrated dextran solution. *Carbohydrate Polymers*, 53, 331–335.

Honda, O., Kato, C., & Kuramitsu, H. K. (1990). Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* gtfD gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. *Microbiology*, 136, 2099–2105.

Holt, S. M., Miller-Fosmore, C. M., & Côté, G. L. (2005). Growth of various intestinal bacteria on alternansucrase-derived oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 385–390.

Holt, S. M., Teresi, J. M., & Côté, G. L. (2008). Influence of alternansucrase-derived oligosaccharides and other carbohydrates on α-galactosidase and α-glucosidase activity in Bifidobacterium adolescentis. *Letters in Applied Microbiology,* 46, 73–79.

Huang, L., & Yao, Y. (2011). Particulate structure of phytoglycogen nanoparticles probed using amyloglucosidase. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1665–1671.

I

I'anson, K., Morris, V. J., & Ring, S. G. (1985). Characterization of the solution behavior of starch polysaccharides. In : R.D. Hill, L. Munck (eds), New approaches to research on cereal carbohydrates. Elsevier science publishers, Amsterdam, 114–119.

Icoz, D. Z., Moraru, C. I., & Kokini, J. L. (2005). Polymer-polymer interactions in dextran systems using thermal analysis. *Carbohydrate Polymers*, 62, 120–129.

Ikeda, S., & Nishinari, K. (2001). "Weak gel"-type rheological properties of aqueous dispersions nonaggregated k-carrageenan helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4436–4441.

Imberty, A., & Perez, S. (1988). A revisit to the three-dimensional structure of B-amylose. *Biopolymers*, 27, 1205–1221.

Ioan, C. E., Aberle, T., & Burchard, W. (2000a). Light scattering and viscosity behavior of dextran in semidilute solution. *Macromolecules*, 34, 326–336.

Ioan, C. E., Aberle, T., & Burchard, W. (2000b). Structure properties of dextran. 2. Dilute solution. *Macromolecules*, 33, 5730–5739.

Ioan, C.E., Aberle, T., & Burchard, W. (2001). Structure properties of dextran. 3. Shrinking factors of individual clusters. *Macromolecules,* 34, 3765–3771.

Irague, R. (2011). Ingénierie des glucane-saccharases de la famille 70 des glycoside-hydrolases pour la synthèse de nouveaux biopolymères. *Thèse de Doctorat*. Université de Toulouse, INSA, France.

Irague, R., Massou, S., Moulis, C., Saurel, O., Milon, A., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., Portais, J.-C., & Potocki-Véronèse, G. (2011). NMR-based structural glycomics for high-throughput screening of carbohydrate-active enzyme specificity. *Analytical Chemistry*, 83, 1202–1206.

Irague, R., Rolland-Sabaté, A., Tarquis, L., Doublier, J. L., Moulis, C., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., Potocki-Véronèse, G., & Buléon, A. (2012). Structure and property engineering of α-D-glucans synthesized by dextransucrase mutants. *Biomacromolecules,* 13, 187–195.

Isenberg, S. L., Brewer, A. K., Côté, G. L., & Striegel, A. M. (2010). Hydrodynamic versus size exclusion chromatography characterization of alternan and comparison to off-line MALS. *Biomacromolecules*, 11, 2505–2511.

J

Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Jacquot, M., & Desobry, S. (2010). Poly-Lactic Acid : production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 552–571.

Janciauskaite, U., Rakutyte, V., Miskinis, J., & Makuska, R. (2008). Synthesis and properties of chitosan-N-dextran graft copolymers. *Reactive & Functional Polymers*, 68, 787–796.

Jeanes, A., Haynes, W. C., Wilham, C. A., Rankin, J. C., Melvin, E. H., Austin, M. J., Cluskey, J. E., Fisher, B. E., Tsuchiya, H. M., & Rist, C. E. (1954). Characterization and classification of dextrans from 96 strains of bacteria. *Journal of the American Chemical Society,* 76, 5041–5052.

Jellum, E., Aaseth, J., & Eldjarn, L. (1973). Mercaptodextran, a metal-chelating and disulphide-reducing polythiol of high molecular weight. *Biochemical Pharmacology*, 22, 1179–1188.

John, M., Schmidt, J., & Kneifel, H. (1983). Iodine-maltosaccharide complexes: relation between chain-length and colour. *Carbohydrate research,* 119, 254–257.

Joucla, G., Pizzut, S., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. (2006). Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain. *FEBS Letters,* 580, 763–768.

K

Kadokawa, J. (2011). Precision polysaccharide synthesis catalyzed by enzymes. *Chemical Reviews*, 111, 4308–4345.

Kadokawa, J. (2012). Preparation and applications of amylose supramolecules by means of phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization. *Polymers*, 4, 116–133.

Kadokawa, J., Shimohigoshi, R., Yamashita, K., & Yamamoto, K. (2015). Synthesis of chitin and chitosan stereoisomers by thermostable alpha-glucan phosphorylase-catalyzed enzymatic polymerization of alpha-D-glucosamine 1-phosphate. *Organic & Biomolecular Chemistry,* 13, 4336–4343.

Kang, H. K., Kim, Y. M., & Kim, D. M. (2008). Functional, genetic, and bioinformatic characterization of dextransucrase (DSRBCB4) gene in *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 1050–1058.

Kang, H. K., Oh, J. S., Kim, D. (2009). Molecular characterization and expression analysis of the glucansucrase DSRWC from *Weissella cibaria* synthesizing a $\alpha(1\rightarrow6)$ glucan. FEMS Microbiology Letters, 292, 33–41.

Kasaai, M. R. (2017). Molecular weight and molecular weight distribution for biopolymers. *Advances in Physicochemical Properties of Biopolymers*, 1, 1–27.

Kavurt, U. B., Marioli, M., Kok, W. T. & Stamatialis, D. (2015). Membranes for separation of biomacromolecules and bioparticles via flow field-flow fractionation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90, 11–18.

Khandpur, A. K., Forster, S., & Bates, F. S. (1995). Polyisoprene-polystyrene deblock copolymer phase diagram near the order-disorder transition. *Macromolecules*, 28, 8796–8806.

Kim, D., & Robyt, J. F. (1994). Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microbial Technology*, 16, 659–664.

Klok, H. A., & Lecommandoux, S. (2001). Supramolecular materials via block copolymer self-assembly. *Advanced Materials*, 13, 1217–1229.

Kobayashi, S. (2007). New developments of polysaccharide synthesis via enzymatic polymerization. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences,* 83, 215–247.

Koga, T., Oho, T., Shimazaki, Y., & Nakano, Y. (2002). Immunization against dental caries. *Vaccine*, 20, 2027–2044.

Konishi, N., Torii, Y., Yamamoto, Y., Miyagi, A., Ohta, H., Fukui, K., Hanamoto, S., Matsuno, H., Komatsu, H., Kodama, T., & Katayama, E. (1999). Structure and enzymatic properties of genetically truncated forms of

the water-insoluble glucan-synthesizing glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *The Journal of Bichemistry*, 126, 287–295.

Koppel, D. E. (1972). Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *The Journal of Chemical Physics*, 57, 4814–4820.

Kralj, S., van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Leer, R. J., Faber, E. J., van der Maarel, M. J., & Dijkhuizen, L. (2002). Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with α-(1→4) and α-(1→6) glucosidic bonds. *Applied and Environnemental Microbiology,* 68, 4283–4291.

Kralj, S., van Geel-Schutten, G. H., Dondorff, M. M., Kirsanovs, S., van der Maarel, M. J., & Dijkhuizen, L. (2004). Glucan Synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology,* 150, 3681–3690.

Kralj, S., Stripling, E., Sanders, P., van Geel-Schutten, G.H., & Dijkhuizen, L., (2005). Highly hydrolytic reuteransucrase from probiotic *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730. *Applied Environmental Microbiology,* 71, 3942–3950.

Kralj, S., Eeuwema, W., Eckhardt, T.H., & Dijkhuizen, L. (2006). Role of asparagine 1134 in glucosidic bond and transglycosylation specificity of reuteransucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Journal,* 273, 3735–3742.

Kuhn, W. (1936). Kolloïd-Z, 76, 258-.

Kuhn, W. (1939). Kolloïd-Z, 87, 3-.

L

Larm, O., Lindberg, B., & Svensson, S. (1971). Studies on the length of the side chains of the dextran elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512. *Carbohydrate Research*, 20, 39–48.

Larson, B. L., Gilles, K. A., & Jenness, R. (1953). Amperometric methods for determining the sorption of iodine. *Analytical Chemistry*, 25, 802–804.

Leach S. A., & Hayes, M. L. (1968). A possible correlation between specific bacterial enzyme activities, dental plaque formation and cariogenicity. *Caries Research*, 2, 38–46.

Leathers, T. D., Hayman, G. T., & Côté, G. L. (1995). Rapid screening of *Leuconostoc mesenteroides* mutants for elevated proportions of alternan to dextran. *Current Microbiology,* 31, 19–22.

Leathers, T. D., Ahlgren, J. A., & Côté, G. L. (1997). Alternansucrase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-21138. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 278–283.

Leathers, T. D., Nunnally, M. S., & Côté, G. L. (2002a). Penicillium isolates for modifying alternan. U.S. Patent 6479275.

Leathers, T. D., Nunnally, M. S., & Côté, G. L. (2002b). Modification of alternan by novel *Penicillium* spp.. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29, 177–180.

Leathers, T. D., Nunnally, M. S., Ahlgren, J. A., & Côté, G. L. (2003). Characterization of a novel modified alternan. *Carbohydrate Polymers*, 54, 107–113.

Leathers, T. D. (2005). Dextran. *Polysaccharides ans polyamides in the food industry*, vol. 1. Wiley-VCH, 233–255.

Lee, G., Nowak, W., Jaroniec, J., Zhang, Q., & Marszalek, P. E. (2004). Molecular dynamics simulations of forced conformational transitions in 1,6-linked polysaccharides. *Biophysical Journal,* 87, 1456–1465.

Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., Van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen L. (2013a). Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α-glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology,* 163, 250–272.

Leemhuis, H., Dijkman, W. P., Dobruchowska, J. M., Pijning, T., Grijpstra, P., Kralj, S., Kamerling, J. P., & Dijkhuizen, L. (2013b). 4,6-α-Glucanotransferase activity occurs more widespread in Lactobacillus strains and constitutes a separate GH70 subfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 181–193.

Leemhuis, H., Dobruchowska, J. M., Ebbelaar, M., Faber, F., Buwalda, P. L., van der Maarel M., Kamerling, J., & Dijkhuizen, L. (2014). Isomalto/malto-polysaccharide, a novel soluble dietary fiber made via enzymatic conversion of starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 12034–12044.

Lehmann, U., & Robin, F. (2007). Slowly digestible starch - its structure and health implications: a review. *Trends in Food Science & Technology,* 18, 346–355.

Leloup, V. M., Colonna, P., Ring, S. G., Roberts, K., & Wells, B. (1992). Microstructure of amylose gels. *Carbohydrate Polymers*, 18, 189.

Lemarchand, C., Couvreur, P., Besnard, M., Costantini, D., & Gref, R. (2003). Novel polyester-polysaccharide nanoparticles. *Pharmaceutical Research,* 20, 1284–1292.

Lin, Y. C., Tan, F. J., Marra, K. G., Jan, S. S., & Liu, D. C. (2009). Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications. *Acta Biomaterialia,* 5, 2591–2600.

Litzen, A., & Wahlund, K. G. (1991). Zone broadening and dilution in rectangular and trapezoidal asymmetrical flow field-flow fractionation channels. *Analytical Chemistry*, 63, 1001–1007.

Lodge, T. P., Pudil, B., & Hankley, K. J. (2002). The full phase behavior for block copolymers in solvents or varying selectivity. *Macromolecules*, 35, 4707–4717.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42, 490–495.

Loos, K., & Stadler, R. (1997). Synthesis of amylose-*block*-polystyrene rod-coil block copolymers. *Macromolecules*, 30, 7641–7643.

Loos, K, & Müller, A. H. E. (2002). New routes to the synthesis of amylose-*block*-polystyrene rod-coil block copolymers. *Biomacromolecules*, 3, 368–373.

Loos, K., Böker, A., Zettl, H., Mingfu, Z., Krausch, G., & Müller, A. H. E. (2005). Micellar aggregates of amylose-*block*-polystyrene rod-coil block copolymers in water and THF. *Macromolecules*, 38, 873–879.

López-Munguía, A., Pelenc, V., Remaud, M., Biton, J., Michel, J. M., Lang, C., Paul, F., & Monsan, P. (1993). Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoalternans. *Enzyme and Microbial Technology,* 15, 77–85.

Lourdin, D., Bizot, H., & Colonna, P. (1997). "Antiplasticization" in starch-glycerol films?. *Journal of Applied Polymer Science,* 63, 1047–1053.

M

Maina, N. H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., Virkki, L. (2008). NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydrate Research*, 343, 1446–1455.

Maina, N. H., Virkki, L., Pynnönen, H., Maaheimo, H., & Tenkanen, M. (2011). Structural analysis of enzyme-resistant isomaltooligosaccharides reveals the elongation of α-(1→3)-linked branches in *Weissella confusa* dextran. *Biomacromolecules,* 12, 409–418.

Maina, N. H., Pitkanen, L., Heikkinen, S., Tuomainen, P., Virkki, L., & Tenkanen, M. (2014). Challenges in analysis of high-molar mass dextrans: Comparison of HPSEC, AsFlFFF and DOSY NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 99, 199–207.

Mali, S., Sakanaka, L. S., Yamashita, F., & Grossmann, M. V. E. (2005). Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 60, 283–289.

Mao, X. Z., Wang, S., Kan, F. F., Wei, D. Z., & Li, F. L. (2012). A novel dextran dextrinase from *Gluconobacter oxydans* DSM-2003: Purification and Properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 1256–1264.

Marchessault, R. H., & Sarko, A. (1967). X-ray structure of polysaccharides. *Advances in carbohydrate chemistry*, 22, 421–482.

Martin, M. (1998). Theory of field-flow fractionation. *Advances in chromatography*, 39, 1–138.

McCurdy, R. D., Goff, H. D., Stanley, D. W., & Stone, A. P. (1994). Rheological properties of dextran related to food application. *Food Hydrocolloids*, 8, 609–623.

Mehvar, R. (2000). Dextran for target and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *Jounal of controlled released*, 69, 1–25.

Meng, X. F., Gangoiti, J., Bai, Y. X., Pijning, T., van Leeuwen, S. S., & Dijkhuizen, L. (2016). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 2681–2706.

Messaud, F. A., Sanderson, R. D., Runyon, J. R., Otte, T., Pasch, H., & Williams, S. K. R. (2009). An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers. *Progress in Polymer Science*, 34, 351–368.

Messmer, K., Ljungström, K.G., Gruber, U.F., Richter, W., & Hedin, H. (1980). Prevention of dextran-induced anaphylactoid reactions by hapten inhibition. *The Lancet* 315, 975.

Mestres, C., Matencio, F., Pons, B., Yajid, M., & Fliedel, G. (1996). A rapid method for the determination of amylose content by using differential scanning calorimetry. *Starch*, 48, 2–6.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.

Molteni, L. (1979). Dextrans as drug carriers. *Drug carriers un biology and medecine*, G. Gregoriadis, Editor. Academic Press : London, New York, San Francisco, 107–125.

Monchois, V., Willemot, R. M., Remaud-Siméon, M., Croux, C., & Monsan, P. (1996a). Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only α(1-6) and α(1-3) linkages. *Gene,* 182, 23–32.

Monchois, V., Willemot, R. M., Remaud-Siméon, M., Croux, C., Soucaille, P., & Monsan, P. (1996b). Primary structure of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 799, 151–156.

Monchois, V., Remaud-Siméon, M., Russell, R. R., Monsan, P., & Willemot, R. M. (1997). Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 465–472.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemo, R. M., & Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 675–685.

Monsan, P., Remaud-Simeon, M., & Andre, I. (2010). Transglucosidases as efficient tools for oligosaccharide and glucoconjugate synthesis. *Current Opinion in Microbiology,* 13, 293–300.

Morales, M. A. A., Remaud-Simeon, M., Willemot, R. M., Vignon, M. R., & Monsan, P. (2001). Novel oligosaccharides synthesized from sucrose donor and cellobiose acceptor by alternansucrase. *Carbohydrate Research,* 331, 403–411.

Moulis, C., Arcache, A., Escalier, P.C., Rinaudo, M., Monsan, P., Remaud-Siméon M., & Potocki-Véronèse, G. (2006). High-level production and purification of a fully active recombinant dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *FEMS Microbiology Letters,* 261, 203–210.

Moulis, C., André, I., & Remaud-Siméon, M. (2016). GH13 amylosucrases and GH70 branching sucrases, atypical enzymes in their respective families. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 2661–2679.

Morgan, K. R., Furneaux, R. H., & Stanley, R. A. (1992). Observation by solid-state C-13 CP MAS NMR-spectroscopy of the transformation of wheat-starch associated with the making and staling of bread. *Carbohydrate Research*, 235, 15–22.

Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2010). Isolation, structure, and characterization of the putative soluble amyloses from potato, wheat, and rice starches. *Carbohydrate Research*, 345, 449–451.

N

Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005a). Dextran dextrinase and dextran of Gluconobacter oxydans. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* 32, 323–334.

Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E.J. (2005b). Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 845–860.

Neelov, I. M., Adolf, D. B., McLeish, T. C. B., & Paci, E. (2006). Molecular Dynamics Simulation of Dextran Extension by Constant Force in Single Molecule AFM. *Biophysical Journal,* 91, 3579–3588.

Neubauer, H., Bauche, A., & Mollet, B. (2003). Molecular characterization and expression analysis of the dextransucrase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiology*, 149, 973–982.

Nordmeier, E. (1993). Static and dynamic light-scattering solution behavior of pullulan and dextran in comparison. *Journal of Physical Chemistry*, 97, 5770–5785.

O

Olvera, C., Fernandez-Vazquez, J. L., Ledezma-Candanoza, L., & Lopez-Munguia, A. (2007). Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology*, 153, 3994–4002.

P

Paris, M., Bizot, H., Emery, J., Buzaré, J. Y., & Buléon, A. (1999). Cristallinity and structuring role of water in native and recrystallized starches by 13C CP-MAS NMR spectroscopy : 1 : Spectral decomposition. *Carbohydrate Polymers*, 39, 327–339.

Passerini, D., Vuillemin, M., Laguerre, S., Amari, M., Loux, V., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Monsan, P., Gabriel, B., Fontagne-Faucher, C., Remaud-Siméon, M., & Moulis, C. (2014). Complete genome sequence of Leuconostoc citreum strain NRRL. *Genome Announcements*, 2, e01179-14.

Passerini, D., Vuillemin, M., Ufarté, L., Morel, S., Loux, V., Fontagné-Faucher, C., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., & Moulis, C. (2015). Inventory of the GH70 enzymes encoded by Leuconostoc citreum NRRL B-1299: identification of three novel α-transglucosylases. *FEBS Journal*, 282, 2115–2130.

Patel, S., Majumber, A., & Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52, 3–12.

Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules : A comprehensive review, *Starch-Starke*, 62, 389–420.

Petrova, V. A., Bochek, A. M., Lebedeva, M. F., Gofman, I. V., Popova, E. N., Vlasova, E. N., Volchek, B. Z., & Nud'ga, L. A. (2014). Chitosan-dextran branched copolymers : Synthesis and properties. *Polymer Science B*, 56, 314–325.

Pinder, D. N., Swanson, A. J., Hebraud, P., & Hemar, Y. (2006). Micro-rheological investigation of dextran solutions using diffusing wave spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 20, 240–244.

Piret, J., Lamontagne, J., Bestman-Smith, J., Roy, S., Gourde, P., Desormeaux, A., Omar, R. F., Juhasz, J., & Bergeron, M. G. (2000). In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulfate and dextran sulfate as microbicides against herpes simplex and human immunodeficiency viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 110–119.

Pitkanen, L., & Striegel, A. M. (2015). Polysaccharide characterization by hollow-fiber flow field-flow fractionation with on-line multi-angle static light scattering and differential refractometry. *Journal of Chromatography A,* 1380, 146–155.

Pizzut-Serin, S., Potocki-Véronèse, G., van der Veen, B. A., Albenne, C., Monsan, P., & Remaud-Siméon, M. (2005). Characterisation of a novel amylosucrase from *Deinococcus radiodurans*. *FEBS* Letters, 579, 1405–1410.

Planchot, V., Colonna, P., & Saulnier, L. (1997). Dosage des glucides et des amylases. *Guide pratique d'analyses dans les industries céréalières*, 341–398. (B. Godon, & W. Loisel, Eds.) Paris, France: Lavoisier.

Popov, D., Burghammer, M., Buléon, A., Montesanti, N., Putaux, J. L., & Rieckel, 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., & Riekel, C. (2009). Crystal structure of A-amylose: A revisit from synchrotron microdiffraction analysis of single crystals. *Macromolecules,* 42, 1167–1174.

Potocki de Montalk, G., Sarçabal, P., Remaud-Siméon, M., Willemot, R. M., Planchot, V., & Monsan, P. (2000). Amylosucrase from Neisseria polysaccharea: novel catalytic properties. *FEBS Letters,* 471, 219–223.

Potocki-Véronèse, G., Putaux, J. L., Dupeyre, D., Albenne, C., Remaud-Siméon, M., Monsan, P., & Buléon, A. (2005). Amylose synthesized *in vitro* by amylosucrase: Morphology, structure and properties. *Biomacromolecules*, 6, 1000–1011.

Powell, P. O., Sullivan, M. A., Sheehy, J. J., Schulz, B. L., Warren, F. J., & Gilbert, R. G. (2015). Acid hydrolysis and molecular density of phytoglycogen and liver glycogen helps understand the bonding in glycogen alpha (composite) particles. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0121337.

Provencher, S. W. (1982). A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications*, 27, 213–227.

Puanglek, S., Kimura, S., Enomoto-Rogers, Y., Kabe, T., Yoshida, M., Wada, M., & Iwata, T. (2016). In vitro synthesis of linear α-1,3-glucan and chemical modification to ester derivatives exhibiting outstanding thermal properties. *Scientific Reports*, 6, 30479.

Purama, R. K., & Goyal, A. (2009). Optimization of conditions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 for production of a dextransucrase and its assay. Journal of Food Biochemistry, 33, 218–231.

Putaux, J-L., Buléon, A., Borsali, R., & Chanzy, H. (1999). Ultrastructural aspects of phytoglycogen from cryo-transmission electron microscopy and quasi-elastic light scattering data. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 145–150.

Putaux, J. L., Buléon, A., & Chanzy, H. (2000). Network formation in dilute amylose and amylopectin studied by TEM. *Macromolecules*, 33, 6416–6422.

Putaux, J. L., Potocki-Véronèse, G., Remaud-Simeon, M., Buléon, A. (2006). Alpha-D-glucan-based dendritic nanoparticles prepared by in vitro enzymatic chain extension of glycogen. *Biomacromolecules,* 7, 1720–1728.

R

Radosta, S., Haberer, M., & Vorwerg, W. (2001). Molecular characteristics of amylose and starch in dimethyl sulfoxide. *Biomacromolecules*, 2, 970–978.

Rebizak, R., Schaefer, M., & Dellacherie, E. (1997). Polymeric conjugates of Gd3+ diethylenetriaminepentaacetic acid and dextran. 1. Synthesis, characterization and paramagnetic properties. *Bioconjugate Chemistry*, 8, 605–610.

Remaud-Siméon, M., Willemot, R. M., Sarcabal, P., de Montalk, G. P, & Monsan, P. (2000). Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 117–128.

Riess, G. (2003). Micellization of block copolymers. *Progress in Polymer Science*, 28, 1107–1170.

Rinaudo, M. (2011). New amphiphilic grafted copolymers based on polysaccharides. *Carbohydrate Polymers,* 83, 1338–1344.

Robyt, J. F., & Eklund, S. H. (1983). Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides*-B-512F dextransucrase. *Carbohydrate Research,* 121, 279–286.

Robyt, J. F., Yoon, S. H., & Mukerjea, R. (2008). Dextransucrase and the mechanism for dextran biosynthesis. *Carbohydrate Research*, 343, 3039–3048.

Roblin, P., Potocki-Véronèse, G., Guieysse, D., Guerin, F., Axelos, M. A. V., Perez, J., & Buléon, A. (2013). SAXS conformational tracking of amylose synthesized by amylosucrases. *Biomacromolecules,* 14, 232-239.

Roessner, D., & Kulicke, W. M. (1994). On-line coupling of flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering. *Journal of Chromatography A*, 687, 249–258.

Roger, P., & Colonna, P. (1996). Molecular weight distribution of amylose fractions obtained by aqueous leaching of corn starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 51–61.

Roger, P., Tran, V., Lesec, J., & Colonna, P. (1996). Isolation and characterization of single chain amylose. *Journal of Cereal Science*, 24, 247–262.

Roger, P., Bello-Perez, L. A., & Colonna, P. (1999). Contribution of amylose and amylopectin to the light scattering behavior of starches in aqueous solution. *Polymer*, 40, 6897–6909.

Roger, P., Axelos, M. A. V., & Colonna, P. (2000). SEC-MALLS and SANS studies applied to solution behavior of linear *α*-glucans. *Macromolecules*, 33, 2446–2455.

Rolland-Sabaté, A., Colonna, P., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., & Planchot, V. (2004). Elongation and solubilisation of alpha-glucans by the action of *Neisseria polysaccharea* amylosucrase. *Journal of cereal science*, 40, 17–30.

Rolland-Sabaté, A., Colonna, P., Mendez-Montealvo, M. G., & Planchot, V. (2007). Branching features of amylopectins and glycogen determined by asymmetrical flow field flow fractionation coupled with multiangle laser light scattering. *Biomacromolecules*, 8, 2520–2532.

Rolland-Sabaté, A., Mendez-Montealvo, M. G., Colonna, P., & Planchot, V. (2008). Online determination of structural properties and observation of deviations from power law behavior. *Biomacromolecules*, 9, 1719–1730.

Rolland-Sabaté, A. (2011). Caractérisation macromoléculaire d'*α*-glucanes branchés. *Thèse de doctorat*. INRA Nantes, France.

Rolland-Sabaté, A., Guilois, S., Jaillais, B., & Colonna, P. (2011). Molecular size and mass distributions of native starches using complementary separation methods: Asymmetrical flow field flow fractionnation (A4F) and hydrodynamic and size exclusion chromatography (HDC-SEC). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 1493–1505.

Rolland-Sabaté, A., Sanchez, T., Buléon, A., Colonna, P., Jaillais, B., Ceballos, H., & Dufour, D. (2012). Structural characterization of novel cassava starches with low and high-amylose contents in comparison with other commercial sources. *Food Hydrocolloids*, 27, 161–174.

Rolland-Sabaté, A., Guilois, S., Grimaud, F., Lancelot-Pin, C., Roussel, X., Laguerre, S., Vikso-Nielsen, A., Putaux, J. L., D'Hulst, C., Potocki-Véronèse, G., & Buléon, A. (2014). Characterization of hyperbranched glycopolymers produced in vitro using enzymes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 1607–1618.

Rolland-Sabaté, A. (2017). High-performance size-exclusion chromatography coupled with on-line multi-angle laser light scattering (HPSEC-MALLS). *Advances in Physicochemical of Biopolymers*, 1, 92–136.

Rolland-Sabaté, A., Battu, S., Bonfils, F., Chelbi, K., & Martin, M. (2017). Field-flow fractionation (FFF). In Advances in physicochemical properties of biopolymers. Martin Masuelli & Denis Renard Eds., Bentham Science Publishers, 2017, pp 142–190.

Roussel, X., Lancelon-Pin, C., Vikso-Nielsen, A., Rolland-Sabaté, A., Grimaud, F., Potocki-Véronèse, G., Buléon, A., Putaux, J-L., & D'Hulst, C. (2013). Characterization of substrate and product specificity of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 2167–2177.

Rozenfel'd, E. L., & Senko, A. S. (1964). Metabolism in vivo of clinical dextran. *Clinica Chimica Acta*, 10, 223–228.

Rundle, R. E., & French, D. (1943). The configuration of starch and the starch-iodine complex. II. Optical properties of crystalline starch fractions. *Journal of American Chemical Society*, 65, 558–561.

Russell, R. R., Gilpin, M., Mukasa, H., & Dougan, G. (1987). Characterization of glucosyltransferase expressed from a *Stroptococcus sobrinus* gene cloned in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 133, 935–944.

S

Sabatié, J., Choplin, L., Paul, F., & Monsan, P. (1986). The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran. *Biotechnology Letters*, 8, 425–430.

Sabatié, J., Choplin, L., Doublier, J. L., Arul, J., Paul, F., & Monsan, P. (1988). Rheology of native dextrans in relation to their primary structure. *Carbohydrate Polymers*, 9, 287–299.

Saenger, W. (1984). The structure of the blue starch-iodine complex. *Naturwissenschaften*, 71, 31–36.

Sarko, A. (1976). Crystalline polymorphs of cellulose: prediction of structure and properties. *Applied Polymer Symposium*, 28, 729–742.

Sarko, A. (1978). What is the crystalline structure of cellulose?. *Technical association of the pulp and paper industry*, 61, 59–61.

Schatz, C., & Lecommandoux, S. (2010). Polysaccharide-containing block copolymers: Synthesis, properties and applications of an emerging family of glycoconjugates. *Macromolecular Rapid Communications*, 31, 1664–1684.

Sciarini, L. S., Rolland-Sabaté, A., Guilois, S., Decaen, P., Leroy, E., & Le Bail, P. (2015). Understanding the destructuration of starch in water-ionic liquid mixtures. *Green Chemistry*, 17, 291–299.

Scientific Committee On Food. (2000). Opinion on the scientific committee on food on a dextran preparation produced using *Leuconostoc mesenteroides, Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* ssp as a novel food ingredient in bakery products. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussel.

Scott, D. J., & Schuck, P. (2005). A brief introduction to the analytical ultracentrifugation of proteins for beginners. *Analytical Ultracentrifugation*, 1–25.

Seymour, F. R., Chen, E. C., & Bishop, S. H. (1979). Methylation structural analysis of unusual dextrans by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 68, 113–121.

Seymour, F. R., Knapp, R. D., Chen, E. C. M., Bishop, S., & Jeanes, A. (1979). Structural analysis of leuconostoc dextrans containing 3-O-α-D-glucosylated α-D-glucosyl residues in both linear-chain and branch-point positions, or only in branch-point positions, by methylation and by 13C-NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 74, 41–62.

Seymour, F. R., & Knapp, R. D. (1980). Structural analysis of dextrans from strains of *Leuconostoc* and related genera, that contain 3-O-alpha-glucosylated-D-glucopyranosyl residues at the branched points, or in consecutive, linear position. *Carbohydrate Research*, 81, 105–129.

Shimohigoshi, R., Takemoto, Y., Yamamoto, K., & Kadokawa, J. (2013). Thermostable alpha-glucan phosphorylase-catalyzed successive alpha-mannosylations. *Chemistry Letters,* 42, 822–824.

Shiroza, T., Ueda, S., & Kuramitsu, H. K. (1987). Sequence analysis of the gtfB gene from *Streptococcus mutans*. *Journal of Microbiology*, 169, 4263–4270.

Sidebotham, R. L. (1974). Dextrans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 30, 371–444.

Simpson, C. L., Cheetham, N. W. H., Giffard, P. M. & Jacques, N. A. (1995). Four glucosyltransferases, GtfJ, GtfK, GtfL and GtfM, from *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Microbiology*, 141, 1451–1460.

Slade, L., & Levine, H. (1991). A food polymer science approach to structure-property relationships in aqueous food systems: non-equilibrium behavior of carbohydrate-water systems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 302, 29–101.

Smith, M. J., Haidar, I. A., & Striegel, A. M. (2007). Measuring the size of polymers with negative radii using MALS/QELS: an exploration of the thermodynamic radius. *The Analyst*, 132, 455–460.

Striegel, A. M., Isenberg, S. L., & Côté, G. L. (2009). An SEC/MALS study of alternan degradation during size-exclusion chromatographic analysis. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 394, 1887–1893.

Sugisaki, M., Suga, H., & Seki, S. (1968). Calorimetric study of the glassy state. IV. Heat capacities of glassy water and cubic ice. *Bulletin of the Chemical Society Japan*, 41, 2591–2599.

Sumner, J. B., & Howell, S. F. (1935). A method for determination of saccharase activity. *Journal of Biological Chemistry,* 108, 51–54.

Sun, G.M., Shen, Y.I., Ho, C.C., Kusuma, S., & Gerecht, S. (2010). Functional groups affect physical and biological properties of dextran-based hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* 93, 1080–1090.

Svihus, B., Uhlen, A. K., & Harstad, O.M. (2005). Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 122, 303–320.

Sweet, D. P., Shapiro, R. H., & Aldersheim, P. (1975). Quantitative analysis by various GLC response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydrate Research*, 40, 217–225.

T

Takahashi, M., Okada, S., Uchimura, T., & Kozaki, M. (1992). *Leuconostoc amelibiosum* Schinninger, Holzapfel, and Kandler 1989 is a later subjective synonym of *Leuconostoc citreum* Farrow, Facklam, and Collins 1989. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42, 649–651.

Takahashi, Y., Kumano, T., & Nishikawa, S. (2004). Crystal structure of B-amylose. *Macromolecules*, 37, 6827–6832.

Tallegas, S. (2015). Etude de l'auto-organisation du copolymère dibloc biosourcé hautement incompatible. *Thèse de Doctorat*, Université de Grenoble, France.

Thoren, L. (1978). Dextran as plasma volume substitute. *Blood substitutes and Plasma Expanders*, T.J. Greenwalt, Editor. A. R. Liss : New York, 265–282.

Tylianakis, M., Spyros, A., Dais, P., Taravel, F. R., & Perico, A. (1999). NMR study of the rotational dynamics of linear homopolysaccharides in dilute solutions as a function of linkage position and stereochemistry. *Carbohydrate Research*, 315, 16–34.

Till, U., Gaucher-Delmas, M., Saint-Aguet, P., Hamon, G., Marty, J. D., Chassenieux, C., Payré, B., Goudounèche, D., Mingotaud, A. F., & Violleau, F. (2014). Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi-elastic scattering for characterization of polymersomes: comparison with classical techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 7841–7853.

Tokita, M., Nishinari, K., & Nishinari, K. (2009). Some thoughts on the definition of a gel, Gels: Structures, Properties, and Functions. *Progress in Colloid and Polymer Science,* Springer Berlin / Heidelberg, p. 87.

Trappe, V., Bauer, J., Weissmuller, M., & Burchard, W. (1997). Angular dependence in static and dynamic light scattering from randomly branched systems. *Macromolecules*, 30, 2365–2372.

Tügel, I., Runyon, J. R., Gomez Galindo, F., & Nilsson, L. (2015). Analysis of polysaccharide and proteinaceous macromolecules in beer using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of the Institute of Brewing*, 121, 44–48.

Tsuchiya, H. M., Koepsell, H. J., Corman, G. B. J., Bogard, M. O., Feger, V. H., & Jackson, R. W. (1952). The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology*, 1952, 64, 521–526.

U

Ueda, S., Shiroza, T., Kuramitsu, H. H. (1988). Sequence analysis of the gtfC gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Gene*, 69, 101–109.

Ulmius, M., Onning, G., & Nilsson, L. (2012). Solution behavior of barley β-glucan as studied with asymmetrical flow field-flow fractionation. *Food Hydrocolloids*, 26, 175–180.

Ulrich, A., Losert, S., Bendixen, N., Al-Kattan, A., Hagendorfer, H., Nowack, B., Adlhart, C., Ebert, J., Lattuada, M., & Hungerbühler, K. (2012). Critical aspects of sample handling for direct nanoparticle analysis and analytical challenges using asymmetric field flow fractionation in a multi-detector approach. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27, 1120–1130

Usui, T., Kobayashi, M., Yamaoka, N., Matsuda, K., & Tuzimura, K. (1973). Structural determination of water-soluble dextran by C-13 and proton NMR spectroscopy. *Tetrahedron Letters*, 36, 3397–3400.

V

Valette, P., Pelenc, V., Djouzy, Z., Andrieux, C., Paul, F., Monsan, P., & Szylit, O. (1993). Bioavailability of new synthesized glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 121–127.

Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E., & Ladefoged, K. (2004). Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Applied and Environnemental Microbiology*, 70, 1176–1181.

Vandamme, E. J., Renard, G., Florius, C. E., Arnaut, F. R. J., Vekemans, N. M. F., & Tossu, P. P. A. (2002). Process for obtaining improved structure build-up of baked products. U.S. Patent 6627235.

Van Leeuwen, S. S., Leeflang, B. R., Gerwig, G. J., & Kamerling, J. P. (2008a). Development of a ^{1}H NMR structural-reporter-group concept for the primary structural characterisation of *α*-D-glucans. *Carbohydrate Research*, 343, 1114–1119.

Van Leeuwen, S. S., Kralj, S., van Geel-Schutten I. H., Gerwig, G. J., Djikhuizen, L., & Kamerling, J. P. (2008b). Structural analysis of the α-D-glucan (EPS35-5) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 35-5 glucansucrase GTFA enzyme. *Carbohydrate Research*, 343, 1251–1265.

Vickerman, M. M., Sulavik, M. C., Nowak, J. D., Gardner, N. M., Jones, G. W., & Clewell, D. B. (1997). Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene, gtfG. *DNA sequencing*, 7, 83–95.

Viebke, C., & Williams, P. A. (2000). The influence of temperature on the characterization of water-soluble polymers using asymmetric flow field-flow fractionation coupled to multiangle laser light scattering. *Analytical chemistry*, 72, 3896–3901.

Vuillemin, M., Claverie, M., Moulis, C., Remaud-Siméon, M., Grimaud, F., Monsan, P., Sabaté, A., Garnier, C., Dols-Lafargue, M., & Lucas, P. (2015). Very high molar mass dextrans. Patent WO/2015/193492.

Vuillemin, M., Claverie, M., Brison, Y., Séverac, E., Bondy, P., Morel, S., Monsan, P., Moulis, C., & Remaud-Siméon, M. (2016). Characterization of the first *α*-(1→3) branching sucrases of the GH70 family. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 7687–7702.

Vuillemin, M., Grimaud, F., Claverie, M., Rolland-Sabaté, A., Garnier, C., Lucas, P., Monsan, P., Dols-Lafargue, M., Remaud-Siméon, M., & Moulis, C. (2018). A dextran with unique rheological properties produced by the dextransucrase from *Oenococcus kitaharae* DSM 17330. *Carbohydrate Polymers*, 179, 10–18.

W

Wagner, M., Holzschuh, S., Traeger, A., Fahr, A., & Schubert, U. S. (2014). Asymmetric flow field-flow fractionation in the fiels of nanomedicine. *Analytical Chemistry*, 86, 5201–5210.

Walhund, K. G., & Giddings, J. C. (1987). Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. *Analytical Chemistry*, 59, 1332–1339.

Walhund, K. G. (2013). Flow field-flow fractionation: Critical overview. *Journal of Chromatography A*, 1287, 97–112.

Wang, T., Deng, L., Li, S., & Tan, T. (2007). Structural characterization of a water insoluble (1→3)-α-D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. *Carbohydrate Polymers*, 67, 133–137.

Wang, S., & Copeland, L. (2013). Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2012.684551.

Wulff, G., Steinert, A., & Höller, O. (1998). Modification of amylose and investigation of its inclusion behavior. *Carbohydrate Research,* 307, 19–31.

Wulff, G., Avgenaki, G., & Guzmann, M. S. P. (2005). Molecular encapsulation of flavours as helical inclusion complexes of amylose. *Journal of Cereal Science,* 41, 239–249.

Y

Yadav, V., Paniliatis, B. J., Shi, H., Lee, K., Cebe, P., & Kaplan, D. L. (2010). Novel in vivo-degradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered gluconacetobacter xylinus. *Applied and Environmental Microbiology,* 76, 6257–6265.

Yalin, Y., Jin, L., Jianhua, W., Da, T., & Zigang, T. (2008). Expression and characterization of dextransucrase gene dsrX from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 133, 505–512.

Yamaoka, T., Kurooda, M., Tabata, Y., & Ikata, Y. (1995). Body distribution of dextran derivatives with electric charges after intravenous administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 113, 149–157.

Yamashita, K., Yamamoto, K., & Kadokawa, J. I. (2015). Synthesis of non-natural heteroaminopolysaccharides by α-Glucan phosphorylase-catalyzed enzymatic copolymerization: α(1→4)-linked glucosaminoglucans. *Biomacromolecules,* 16, 3989–3994.

Yi, A. R., Lee, S. R., Jang, M. U., Park, J. M., Eom, H. J., Han, N. S., & Kim, T. J. (2009). Cloning of dextransucrase gene from *Leuconostoc citreum* HJ-P4 and its high-level expression in *E. coli* by low temperature induction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 829–835.

Yohannes, G., Jussila, M., Hartonen, K., & Riekkola, M. L. (2011). Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4104–4116.

Yu, L. P., & Rollings, J. E. (1987). Low-angle laser light scattering-aqueous size exclusion chromatography of polysaccharides: Molecular weight distribution and polymer branching determination. *Journal of Applied Polymer Science*, 33, 1909–1921.

Z

Zhang, X., & Mehvar, R. (2001). Dextran-methylprednisolone succinate as a prodrug of methylprednisolone: plasma and tissue disposition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 2078–2087.

Zhang, H., Hu, Y., Zhu, C., Zhu, B., & Wang, Y. (2008). Cloning, sequencing and expression of a dextransucrase gene (dexYG) from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology Letters*, 30, 1441–1446.

Zimm, B. H. (1948). Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering; preliminary results on polystyrene solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 16, 1099–1116.

Zimm, B. H., & Stockmayer, W. H. (1949). The dimensions of chain molecules containing branches and rings. *The Journal of Chemical Physics*, 17, 1301–1314.

Zobel, H. F. (1984). Gelatinization starch and mechanical properties of starch pastes. *Starch: Chemistry and Technology*, 1.

Glossaire

PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

AF4	Fractionnement par croisement de deux flux dans un canal asymétrique (asymetrical flow field-flow fractionation)
ANR	Agence nationale de la recherche
ASPiRe	Projet visant l'exploration des relations structure-propriétés de copolymères biosourcés
ATG	Analyse thermogravimétrique (TGA, thermogravimetric analysis)
BIA	Biopolymères, interactions, assemblages
^{13}CP-MAS	Cross polarization – magic angle spinning
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering), diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS, quasi-elastic light scattering)
DMA	Analyse mécanique dynamique (dynamic mechanical analyzer)
DMAc	Diméthylacétamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRI	Indice de refraction différentiel (differential refractometric index)
DRX	Diffraction des rayons X
DSC	Analyse enthalpique différentielle (differential scanning calorimetry)
FFF	Fractionnement par couplage flux force (field flow fractionation)
FFFF	Fractionnement par croisement de deux flux dans un canal asymétrique (4F, flow field flow fractionation)
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GC-ISQ	Chromatographie en phase gazeuse à simple quadripôle
HDC	Chromatographie hydrodynamique (hydrodynamic chromatography)
HPAEC	Chromatographie d'échange d'anions haute performance (high-performance anion-exchange chromatographie)
HPSEC	Chromatographie d'exclusion stérique haute performance (high-performance size-exclusion chromatography)
LISBP	Laboratoire d'ingénierie des systems biologiques et des proceeds
LS90	Diffusion de la lumière à l'angle 90°
MALLS	Diffusion de la lumière multi-angulaire (multiangle laser light scattering)
MC2	Equipe Matériaux, création et comportement
MCBL	Microscopie confocale à balayage laser

MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission (TEM, transmission electron microscopy)
PAD	Détection par ampérométrie pulsée (pulsed amperometric detection)
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
QELS	Diffusion quasi-élastique de la lumière (quasi-elastic light scaterring), diffusion dynamique de la lumière (DLS, dynamic light scaterring)
RITC	Rhodamine-B-isothiocyanate
RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton ^{1}H ou du carbone ^{13}C (NMR, nuclear magnetic resonance)
SAXS	Diffusion des rayons X aux petits angles (small angle X-ray scattering)
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique (size exclusion chromatography)
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultra-violet

ASR	Alternane-saccharase
BRS	Saccharase de branchement
BSA	Albumine de serum bovin
D500	Dextrane commercial de masse molaire moyenne de 500 000 $g.mol^{-1}$
DSR-M	Dextrane-saccharase provenant de *Ln. citreum* NRRL B-1299
DSR-OK	Dextrane-saccharase provenant de la souche *Oenococcus kitaharae* DSM17330
GTF	Glycosyle-transférase
GS-X	Glucane-saccharase confidentielle
Lm	*Leuconostoc mesenteroides*
Ln.	*Leuconostoc*
Lb.	*Lactobacillus*

LISTE DES PRINCIPAUX SYMBOLES UTILISES

b	Bloc
BT	Basse température
C	Concentration
C*	Concentration d'enchevêtrement ou de recouvrement
d_f	Dimension fractale
d_{Gapp}	Densité moléculaire apparente
DP	Degré de polymèrisation
dn/dc	Incrément d'indice de refraction
E	Module d'Young
g_i	Facteur de contraction ou paramètre de ramification de la fraction i
g_M	Facteur de contraction ou paramètre de ramification moyen
G'	Module conservatif
G''	Module dissipatif
HT	Haute temperature
HR	Humidité relative
ΔH_c	Enthalpie de recristallisation
k	Constante de Boltzmann
λ	Longueur d'onde du laser
$\overline{M}_n$	Masse molaire moyenne en nombre
$\overline{M}_w$	Masse molaire moyenne en poids
$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Indice de dispersité
ν_G	Coefficient hydrodynamique
n	Indice de réfraction du solvant
N_A	Nombre d'Avogadro
σ	Contrainte
$\overline{R}_G$	Rayon de giration moyen

$\overline{R}_H$	Rayon hydrodynamique moyen
RH	Humidité relative
t	Temps
T	Température
T_c	Température de recristallisation
T_f	Température de fusion
T_g	Température de transition vitreuse
T_R	Temps de rétention
Θ	Angle d'observation
X	Paramètre de Flory-Huggins

Liste des tableaux

Tableau 1 – Valeurs du paramètre de structure ρ pour différentes conformations d'une macromolécule en bon solvant (Burchard, 1999)..... 35

Tableau 2 - Différentes techniques pour caractériser et/ou séparer un échantillon par la taille : analyse dimensionnelle (taille, distribution en taille et/ou forme). 39

Tableau 3 - Pourcentage des liaisons glucosidiques, déterminé par RMN ^{1}H, de dextranes produits à partir de différentes souches bactériennes (adapté de Irague, 2011). 54

Tableau 4 - Déplacements chimiques obtenus par RMN ^{1}H pour différents di- et trisaccharides solubilisés dans du D_2O à 27 °C (van Leeuwen *et al*., 2008a). 57

Tableau 5 - Solubilité de quelques polysaccharides utilisés dans le projet ASPIRE (+ : soluble ; - insoluble ; n.d. : non déterminé). 57

Tableau 6 - Masse molaire moyenne en poids $\boldsymbol{MW}$, rayon de giration moyen en z $\boldsymbol{RG}$ et coefficient hydrodynamique $\boldsymbol{\nu}_G$ des dextranes recensés dans la littérature. 58

Tableau 7 – Distances interplannaires obtenues par diffraction des rayons X du dextrane haute température et basse température (adapté selon Chanzy *et al.*, 1980 et 1981). 62

Tableau 8 – Provenance de l'amylosaccharase et pourcentage liaisons osidiques présentes dans les amyloses synthétisées. 74

Tableau 9 - Comportement moléculaire en solution d'amyloses naturelles et d'amyloses de synthèse (Rolland-Sabaté *et al.,* 2011). 75

Tableau 10 – Masses molaires et rayons de giration de deux alternanes mesurés par MALLS hors-ligne, HDC/MALLS et SEC/MALLS (Isenberg *et al*., 2010). 81

Tableau 11 - Provenance des mutane-saccharases et pourcentage liaisons osidiques présentes dans les mutanes synthétisés. 83

Tableau 12 - Déplacements chimiques □ (ppm) du mutane déterminés par RMN ^{1}H et RMN ^{13}C dans le DMSO-d6 (Puanglek *et al.*, 2016). 83

Tableau 13 – Provenance des reuterane-saccharases et pourcentage liaisons osidiques présentes dans les reuteranes synthétisés. 85

Tableau 14 - Paramètres structuraux et techniques de caractérisation d'agrégats micellaires (Riess, 2003). 96

Tableau 15 - Copolymères comportant un bloc oligo- ou polysaccharidique et un bloc synthétique et leurs voies de synthèse reportées dans la littérature (adapté de Schatz & Lecommandoux, 2010). 97

Tableau 16 – Conditions de synthèse des dextranes étudiés dans le *Chapitre 3*. 105

Tableau 17 - Conditions de synthèse des dextranes étudiés dans le *Chapitre 4*. 106

Tableau 18 - Conditions de synthèse des dextranes étudiés dans le *Chapitre 5*. 106

Tableau 19 - Quantités disponibles en oligosaccharides et copolymères résultants des deux lots étudiés dans le *Chapitre 6*. 108

Tableau 20 – Tableau permettant l'attribution des signaux déterminés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-ISQ). 109

Tableau 21 – Conditions de préparation des α-glucanes avant l'analyse par AF4-UV-MALLS-DRI. 112

Tableau 22 - Conditions d'analyses des α-glucanes par AF4-UV-MALLS-DRI. 113

Table 23 - Amounts of sucrose and dextran used to synthesize the α(1→2) and α(1→3)-branched dextrans, linkage ratio determined by ^{1}H-NMR spectroscopy and sample composition determined by HPAEC-PAD and protein assay. Nomenclature: for example, a dextran containing 10% α(1→2)-linkages is referred to as D1-2B10. 142

Table 24 - Solubilization recovery, weight and number average molar masses ($\boldsymbol{Mw}$,$\boldsymbol{Mn}$), dispersity ($\boldsymbol{Mw}/\boldsymbol{Mn}$), z-average radius of gyration ($\boldsymbol{RGz}$), weight-average hydrodynamic radius ($\boldsymbol{RHw}$), apparent density ($\boldsymbol{dGapp}$) and increase in molar mass determined by AF4-MALLS. 143

Table 25 - Water content, glass transition temperature (T_g), recrystallization temperature (T_c) and recrystallization enthalpy ΔH_c of different dextrans 149

Tableau 26 - Valeurs de transmittance[a] (%T) à 650 nm et rayons hydrodynamiques $\boldsymbol{RHz0}$ obtenus par QELS de chaque dextrane à 25 °C et à 0,5 g.L^{-1} (ou 2 g.L^{-1} dans le DMSO)..... 159

Tableau 27 - Concentration C*$_{RG}$ des différents dextranes produits par l'enzyme DSR-OK..... 162

Tableau 28 - Caractéristiques des dextranes branchés et teneurs en impuretés de synthèse. 175

Tableau 29 - Caractéristiques macromoléculaires des dextranes commercial et branchés. 176

Tableau 30 - Augmentation de masse molaire calculées à partir des données de RMN ^{1}H et d'AF4-MALLS-DRI. 179

Tableau 31 - Récapitulatif des données thermiques du dextrane commercial et des dextranes qui en sont issus. 181

Tableau 32 - Données thermiques du dextrane commercial D500..... 183

Tableau 33 - Structure du dextrane commercial D500 semi-cristallin à différentes teneurs en eau..... 187

Tableau 34 - Caractéristiques des polysaccharides étudiés et teneurs en impuretés de synthèse. 197

Tableau 35 – Caractéristiques des dextranes produits par l'enzyme de synthèse DSR-M et des enzymes de branchement BRS-A et BRS-BΔ1. 199

Tableau 36 - Caractéristiques macromoléculaires des dextranes obtenus à partir de DSR-M à l'état de poudre ou en milieu de synthèse..... 200

Tableau 37 - Augmentation de masse molaire calculée à partir des données de RMN ^{1}H et d'AF4-MALLS-DRI..... 202

Tableau 38 - Récapitulatif des données thermiques du dextrane M-100 produit à partir de l'enzyme DSR-M et des dextranes branchés issus de celui-ci..... 203

Tableau 39 – Liaisons osidiques et impuretés de synthèse de l'alternane synthétisé par l'alternane-saccharase ASR au LISBP. 205

Tableau 40 – Transmittance (%T) à 650 nm et rayon hydrodynamique moyen en z $\boldsymbol{RHz}$ de l'alternane en solution à 0,5 g.L^{-1} à 25 °C et 80 °C, dans différents solvants..... 206

Tableau 41 – Caractéristiques macromoléculaires de l'alternane déterminées par AF4-UV-MALLS-DRI..... 207

Tableau 42 – Volume d'élution Ve et rayon hydrodynamique moyen en poids $\boldsymbol{R}_{Hw}$ de sphères de latex et droite de calibration..... 208

Tableau 43 – Paramètres de branchement comme proposé par Burchard (1977, 1983)..... 214

Tableau 44 - Caractéristiques thermiques de l'alternane obtenues par DSC..... 218

Tableau 45 - Données structurales des échantillons produits par GS-X. 220

Tableau 46 – Modules d'Young E, contraintes à la rupture et allongements à la rupture des films d'α-glucanes produits à partir de l'enzyme GS-X. 225

Tableau 47 – Bilan des caractéristiques des échantillons du projet produits par synthèse enzymatique. 232

Tableau 48 – Assemblages envisagés pour la synthèse de copolymères. 237

Tableau 49 – Quantités disponibles en oligosaccharides et copolymères résultants des deux lots étudiés dans le *Chapitre 6*. 245

Table 50 - Results of acceptor reactions performed using DSR-M, ASR and *Dg*AS, and various exogenous oligosaccharide acceptors. 255

Table 51 - α-glucosidic linkages in the purified acceptor blocks and copolymers, identified using ^{1}H NMR. Average DPs were determined either by HPAEC-PAD (amylose), HPSEC (alternan), and HPSEC-MALLS (dextran-*b*-alternan), or calculated from the relative proportion of each block determined by ^{1}H NMR (alternan-*b*-amylose and dextran-*b*-alternan-*b*-amylose). The details of calculation of the synthesis yields and final production yields (including both the synthesis and purification steps), are provided in the supplementary information. 258

Table 52 - Summary of the different glucosyl units detected after sample permethylation. 259

Table 53 - Structural parameters of amylose, alternan-*b*-amylose and dextran-*b*-alternan-*b*-amylose, obtained by SAXS analysis. 263

Tableau 54 - Caractéristiques thermiques de l'oligoalternane et du copolymère alternane-*b*-dextrane obtenues par DSC. 268

Tableau 55 – Proportions des différentes zones du massif C$_1$ pour l'amylose et du copolymère amylose-*b*-alternane..... 271

Liste des figures

Figure 1 – Profil de distribution de masse molaire et comparaison des différentes grandeurs. 33

Figure 2 - Schéma d'une chaîne Kuhnienne 33

Figure 3 - Recouvrement des chaînes lorsque la concentration c augmente. a. Solution diluée. b. Concentration critique de recouvrement. c. Solution semi-diluée (la solution concentrée est obtenue lorsque c >> c*). 36

Figure 4 - Représentation schématique d'une solution semi-diluée de polymère. Les cercles représentent les unités "blobs" de taille ξ..... 37

Figure 5 - Principe de la chromatographie d'exclusion stérique. 40

Figure 6 – a. Photo d'un canal AF4 ouvert avec un spacer de 350 µm et une membrance de cellulose 10 kDa. b. Représentation schématique du principe de fractionnement par AF4. 42

Figure 7 - a. Schéma du système Fl-FFF pendant l'étape de focalisation (Messaud *et al.*, 2009). b. Etape de relaxation de l'échantillon dans le cas du FI-AF4 (Wyatt Courtesy). 43

Figure 8 - Modes de fractionnement en AF4 (Rolland-Sabaté *et al.*, 2017). 44

Figure 9 - Détecteur de diffusion de la lumière à 18 photodiodes et la valeur des angles associée (MALLS) (Wyatt®, Heleos II). 45

Figure 10 - Représentation de la liaison glucosidique alpha et bêta entre deux unités de D-glucose. 49

Figure 11 - Réactions catalysées par les enzymes glucane-saccharases GH70 actives au saccharose (adaptée de Vuillemin *et al*., 2016). 51

Figure 12 - Structure chimique des dextranes (chaîne principale constituée de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et pouvant présenter une ou plusieurs ramifications en position $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$). 52

Figure 13 - Conversion du saccharose en dextrane. 53

Figure 14 - Détermination d'une liaison $\alpha(1\rightarrow6)$ du dextrane par la méthode de méthylation avec une séparation/détection GLC-MS (Heinze *et al.*, 2006). 55

Figure 15 - Représentation de différentes structures d'α-glucanes obtenus à l'aide de diverses glucane-saccharases des souches *Ln. mesenteroides* et *Streptococcus mutans*. (A*) Ln. mesenteroides* B-512F (dextrane soluble) ; (B) *S. mutans* (mutane insoluble) ; (C) *Ln. mesenteroides* B-1355 (alternane) ; (D) *S. mutans* (dextrane soluble) ; (E) *Ln. mesenteroides* B-742S (dextrane) ; (F*) Ln. mesenteroides* B-1299 (dextrane) (Naessens *et al.*, 2005b). 56

Figure 16 - Elugramme d'une solution de dextrane obtenu par AF4-MALLS-DRI. Dextrane ~ 10^9 g.mol^{-1} obtenu avec l'enzyme DSR-OK (trait pointillé gris : Signal d'indice de réfraction, Trait plein gris : Signal de diffusion de lumière à l'angle à 90° (LS90), trait plein noir masses molaires en fonction du temps d'élution) (Vuillemin *et al*., 2018). 58

Figure 17 - Courbes logarithmiques représentant le rayon de giration R_{Gi} en fonction de la masse molaire M_i (□) de dextranes commerciaux D4 (4,85.10^5 g.mol^{-1})et D5 (2,91.10^6 g.mol^{-1}), (○) d'amyloses, (×) de pullulanes et (Δ) de glycogènes et phytoglycogène obtenues dans une solution aqueuse à 0,2 g.L^{-1} NaN_3 à 40 °C (Rolland-Sabaté *et al*., 2008) (inversion des pentes 0.40 et 0.45). 59

Figure 18 - a. Cristaux de dextrane DP60 obtenus à 160 °C en solution dans un mélange PEG/eau 65/35 (v/v), b. Cristaux de dextrane DP120 obtenus à 95 °C en solution dans un mélange PEG/eau 45/55 (Chanzy *et al.*, 1980 et 1981). 60

Figure 19 - a. Modèle structural des chaînes de dextrane anhydre du polymorphe haute température. b. Structure des chaînes de dextrane du polymorphe basse température contenant 8 molécules d'eau (cercles bleus) dans la maille. Les liaisons hydrogène sont représentées en trait pointillé (adapté de Guizard *et al.*, 1984 et 1985). 61

Figure 20 - Représentation de la viscosité en fonction de la concentration pour des dextranes de différentes masses molaires, à 25 °C (Heinze *et al.*, 2006). 63

Figure 21 – Propriétés rhéologiques d'une solution de dextrane de 500 000 g.mol^{-1}. a. Module conservatif G' (symbole vide) et module dissipatif G'' (symbole creux) de solutions de dextrane à 10% (■), 20% (●) et 40% (▲) en fontion de la fréquence. b. Viscosité spécifique η_{sp} en fonction de la concentration réduite c(η) avec (▲) 5.10^5 g.mol^{-1} ((■) 2.10^6 g.mol^{-1} (●) 2.10^5 g.mol^{-1}) (Pinder *et al*., 2006). 64

Figure 22 – Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement de différents dextranes produits par synthèse enzymatique. a. dextranes produits à partir de mutants de DSR-S (Irague *et al*., 2012). b. dextrane produit à partir de l'enzyme DSR-OK et comparaison avec d'autres dextranes (Vuillemin *et al.,* 2018). 65

Figure 23 – Modules conservatifs G' et modules dissipatifs G'' en fonction de la fréquence angulaire pour des solutions de dextranes à 5% (p/v) obtenus par synthèse enzymatique. a. et b. dextranes produits à partir de mutants de DSR-S (Iragueet *al.*, 2012). c. dextrane produit à partir de l'enzyme DSR-OK (■) et comparaison avec d'autres dextranes (●) DSR-S vardel Δ4N dextran, (▲) DRS-S dextran (Vuillemin *et al.,* 2018).....66

Figure 24 – a. Effet de la masse molaire (M_w) et de l'activité de l'eau (a_w) sur la T_g (°C) de dextranes commerciaux (Icoz *et al.*, 2005). b. Evolution de la T_g (K) de divers polysaccharides ((○) dextrane T500 ; (□) pullulane ; (■) phytoglycogène ; (●) amylopectine) en fonction de la teneur en eau (g H_2O / g total) (Bizot *et al.*, 1997). 67

Figure 25 - Formation des fibres de dextranes par étirage. A) Solution de dextrane hautement visqueuse placée entre deux « palettes », F_{ad} montrant les forces d'adhésion et F_{co} les forces de cohésion. B) Au niveau moléculaire, F_{co} résultent des enchevêtrements de chaînes de dextrane grâce aux liaisons hydrogène intermoléculaires. C-E) Les fibres peuvent être allongées formant des tissus multicouches orientées à une direction (180°), deux directions (90°) et plusieurs directions (45°) respectivement. F-H) Images SEM des différents tissus orientés (échelle 50 µm). (Frampton *et al.*, 2015).....69

Figure 26 – Structure chimique de l'amylose (chaîne principale constituée de liaisons *α*(1→4). 73

Figure 27 – Diagramme de diffraction des rayons X de l'amylose de type A, B et V_H (A) et projection des mailles cristallines selon le plan (a,b) des doubles hélices de l'amylose de type A et B (en bleu, molécules d'eau).....76

Figure 28 – Représentation du complexe amylose-acide gras avec inclusion d'une chaîne aliphatique en C12 dans une simple hélice d'amylose de type V_H (Buléon *et al.*, 1998) (A) et du complexe amylose-iode (B). 77

Figure 29 – a. Relation entre le λ_{max} de complexe maltosaccharide-iode et le DP (John *et al.*, 1983). b. Couleurs de différents complexe I_3^-amylose 1. Amylose de pomme de terre linéaire 2. Amylose de pomme de terre soluble. 3. Amylose de riz soluble. 4. Amylose de blé soluble. (Mukerjea & Robyt, 2010). 78

Figure 30 – Réaction enzymatique permettant la formation de l'hydrogel à base d'amylose (Kadokawa, 2012).....79

Figure 31 – Structure chimique de l'alternane proposée par Côté (2002) : chaîne principale constituée d'une alternance de liaisons *α*(1→6)/*α*(1→3) avec des ramifications en *α*(1→6).....80

Figure 32 - Dégradation de l'alternane pendant une analyse par SEC à 50 °C dans le DMSO à deux débits : 0,2 $mL.min^{-1}$ et 1,0 $mL.min^{-1}$ (Striegel *et al.*, 2009). 80

Figure 33 - Structure chimique des mutanes (chaîne principale constituée principalement de liaisons *α*(1→3) présentant des ramifications en *α*(1→6)). 83

Figure 34 - Structure chimique des reutéranes (chaîne principale constituée de liaisons *α*(1→6) et *α*(1→4) présentant des ramifications en *α*(1→6)). 85

Figure 35 – Représentation de la structure du reutérane produit par *Lb. reuteri* 35-5 (van Leeuwen *et al.*, 2008b). 85

Figure 36 – Représentation des différentes architectures de copolymères linéaires et de copolymères non-linéaires a. Copolymère alterné. b. Copolymère statistique. c. Copolymère à blocs. d. Copolymère greffé. e. Copolymère en étoile. 87

Figure 37 - Représentation schématique de différents copolymères diblocs. a. Copolymère diblocs bobine-bobine. b. Copolymère diblocs tige-bobine (Klok & Lecommandoux, 2001). 88

Figure 38 - Représentation schématique et diagrammes de phases d'un copolymère de type A-*b*-B. a. Différentes géométries en fonction de la fraction volumique f du bloc A (bleu). b. Diagramme de phase théorique- et c. Diagramme de phase expérimental d'un système copolymère dibloc PS-*b*-PI (Khandpur *et al.*, 1995). 91

Figure 39 - Représentation schématique de la formation des domaines dans une configuration asymétrique (Fleury, 2001). 92

Figure 40 – Diagrammes de phase d'un copolymère dibloc PS(23%)-*b*-PI(77%) dissymétrique. a. Solvant neutre. b. Solvant légèrement sélectif du bloc PS. c. solvant sélectif du bloc PS (Lodge *et al.*, 2002).....93

Figure 41 - Conformation des molécules de copolymère dibloc A-*b*-B dans un solvant sélectif en fonction de la concentration en copolymère (Hamley, 1998). 94

Figure 42 - Morphologies de copolymères à blocs obtenus en solution en solvant sélectif. a. Micelles sphériques. b. Vésicule. c. Agrégats de micelles. d. Structures lamellaires. e. Micelles tubulaires ou cylindriques. (Agut, 2008). 95

Figure 43 – Différents paramètres d'une micelle en solution.....95

Figure 44 - Structure du copolymère dibloc amylose-*block*-polystyrène (Loos *et al.* 2005). 98

Figure 45 - 1. Profils HPAEC-PAD après action de l'isoamylase sur a. le milieu réactionnel contenant 15 $g.L^{-1}$ de saccharose en présence de dextrane-saccharase pendant 6 h b. le milieu réactionnel contenant 15 $g.L^{-1}$ de saccharose et 30 $g.L^{-1}$ de waxy (sans dextrane-saccharase) c. le milieu réactionnel contenant 15 $g.L^{-1}$ de saccharose et 30 $g.L^{-1}$ de waxy en présence de dextrane-saccharase pendant 6h. 2. Cryo-MET sur les produits de réaction de la dextrane-saccharase obtenus avec a. 15 $g.L^{-}$

[1] de saccharose pendant 6 h b. 15 g.L^{-1} de saccharose pendant 24 h c. 15 g.L^{-1} de saccharose et 30 g.L^{-1} de waxy pendant 6 h d. 15 g.L^{-1} de saccharose et 30 g.L^{-1} de waxy pendant 24 h (dilution par 10). 99

Figure 46 - Conversion enzymatique de l'amylopectine à l'aide de l'enzyme GTF-B. 100

Figure 47 - Représentation de l'appareillage en flux continu permettant le dosage colorimétrique par la méthode à l'orcinol sulfurique. 110

Figure 48 – Droite d'étalonnage d'une gamme de glucose dans l'eau. 111

Figure 49 - Récapitulatif des débits, flux détecteur (trait plein) et flux croisé (trait pointillé) utilisés pour l'analyse des α-glucanes par AF4-UV-MALLS-DRI. a. Dextranes produits par DSR-OK. b. Dextranes dérivés du dextrane commercial D500 (trait noir), dextranes produits par DSR-M (trait rouge), α-glucanes produits par GS-X (trait orange), alternane (trait bleu). c. Copolymère alternane-*b*-dextrane. 114

Figure 50 – Mesure de viscoélasticité en régime dynamique. 117

Figure 51 – Courbes de variations des modules conservatifs G' et dissipatifs G'' en fonction de la fréquence. a. solution macromoléculaire. b. Gel faible. c. Gel fort. 117

Figure 52 – Courbe de contrainte σ en fonction de la déformation du dextrane D1-3B37 à 2% (p/v) indiquant la valeur de déformation de 2%, déterminée dans le domaine viscoélastique linéaire, et utilisée pour les mesures en régime dynamique. 118

Figure 53 – Schéma représentatif du dispositif expérimental (DSC). 121

Figure 54 – Etude calorimétrique pour la détermination de la T_g et de la T_c d'un échantillon au deuxième passage : cas du dextrane commercial D500 à 3°C.min^{-1}. 122

Figure 55 – Schéma de principe d'une mesure par diffusion des rayons X. a. Diffraction de plans cristallins. b. Schéma du dispositif expérimental. 123

Figure 56 – Représentation du procédé de casting. 1. Support recouvert de Téflon®. 2. Dépôt de la solution sur le support. 3. Evaporation de l'eau à 40°C. 4. Obtention du film polysaccharidique. 125

Figure 57 – a. Moule ayant servi au thermomoulage. b. Presse ayant servi au thermomoulage. 126

Figure 58 – a. Système de régulation en humidité. b. Représentation du système de mesure de Dynamical Mechanical Analyzer (DMA) couplé à une régulation en humidité. 127

Figure 59 – Appareil de micro-traction Linkam 200N. 128

Figure 60 - Représentation des voies de synthèse ayant servi à obtenir les dextranes de l'étude. 133

Figure 61 - a,c) Calculated hydrodynamic radius $\boldsymbol{RH}$ distributions of dextrans obtained by AF4. The thin lines represent the DRI values and the thick lines represent the molar mass $\boldsymbol{Mw}$; b,d) Plot of apparent particular density (D_{Gapp}) *vs* molar mass. 144

Figure 62 - Schematic representation of D1-3B2, D1-3B37 and D1-2B28 dextrans: short α(1→3) branches are drawn in blue and α(1→2) branches in pink. 144

Figure 63 - TEM images of negatively stained preparations from D1-3B2 (a,b), D1-3B5 (c,d), D1-3B37 (e,f), D1-2B10 (g,h) and D1-2B28 (i,j) 0.5 g L^{-1} dextran solutions. 147

Figure 64 - a. Differential scanning calorimetry thermograms of the branched dextrans upon heating; b. calorimetric glass transition of dextrans vs water content. 149

Figure 65 - Storage modulus (E') as a function of relative humidity (RH) for the different dextrans. 151

Figure 66 – Propriétés rhéologiques du dextrane D1-3B2 à 2% (p/v) a. Spectre mécanique présentant les modules conservatifs (G') et dissipatifs (G'') avec une déformation appliquée de 2%. b. Viscosité η et contrainte τ en fonction de la vitesse de cisaillement γ. 160

Figure 67 – Evolution des modules conservatifs G' et dissipatifs G'' en fonction de la fréquence ω, pour une déformation appliquée de 2%. a. Dextrane D1-2B10 à 1%, 2%, 5% et 10% (p/v), b. Dextranes D1-3B2, D1-3B5, D1-3B37, D1-2B10 et D1-2B28 à 2% (p/v). 161

Figure 68 - Evolution des modules de conservation G' de chaque dextrane en fonction de la concentration à 1 rad.s^{-1}. 163

Figure 69 – Représentation graphique des proportions cumulées de chaque impureté (protéines, leucrose, glucose, fructose) présentes dans les échantillons. 164

Figure 70 - Propriétés rhéologiques du dextrane D1-3B5 à 1% dans l'eau contenant du fructose à 0% (▲), 2% (◆), 4% (■) et 8% (●). a. Modules conservatifs G' (symbole plein) et dissipatifs G'' (symbole vide) en fonction de la fréquence ω. b. Viscosité η et contrainte τ en fonction de la vitesse de cisaillement γ. 165

Figure 71 – Effet du pourcentage de fructose sur la température de transition vitreuse T_g de films de dextrane D1-3B5. .. 166

Figure 72 - Propriétés thermiques du dextrane D1-3B5 contenant du fructose à 0%, 2%, 4% et 8%. a. Température de recristallisation en fonction de la teneur en eau. b. Enthalpie de recristallisation en fonction de la teneur en eau. 167

Figure 73 - Propriétés mécaniques de films de dextrane D1-3B5 obtenus par casting contenant du fructose à 0%, 2%, 4% et 8%. a. Evolution du module d'Young E en fonction du taux de fructose. b. Evolution de la contrainte à la rupture σ en fonction du taux de fructose. 168

Figure 74 - Elugrammes, masses molaires, rayons de giration et densités moléculaires des dextranes commercial et branchés. a. Dextranes branchés en position *α*(1→3), signal DRI (trait fin) et masse molaire (trait épais), b. dextranes branchés en position *α*(1→2), signal DRI (trait fin) et masse molaire (trait épais), c. dextranes branchés, signal DRI (trait fin) et rayon de giration (trait épais), d. densités moléculaires apparentes d_{Gapp} des dextranes en fonction de la masse molaire. 178

Figure 75 – Evolution du module élastique G' (symbole plein) et du module dissipatif G'' (symbole vide) des différents dextranes en solution à 20% (p/v) dans l'eau en fonction de la fréquence ω (déformation 80%). 180

Figure 76 - Caractéristiques thermiques des dextranes commerciaux et branchés. a. Signal DSC des différents dextranes. b. Courbe maîtresse de la transition vitreuse en fonction de la teneur en eau du dextrane commercial D500 (trait fin d'équation $\boldsymbol{y = 33,841x + 101,3090,777x + 0,223}$) et superposition des transitions vitreuses des dextranes branchés. 182

Figure 77 – Evolution des paramètres thermiques du dextrane commercial D500 en fonction de la teneur en eau. a. Courbes maîtresses et données expérimentales de la température de transition vitreuse T_g (○) et de la température de recristallisation T_c (■) en fonction de la teneur en eau. b. Influence de la teneur en eau sur l'enthalpie de recristallisation ΔH_c 184

Figure 78 - Evolution de la température de transition vitreuse entre le deuxième et le troisième passage. 185

Figure 79 - Données DRX du dextrane commercial D500. a. Diffractogramme du D500 amorphe ; b. Evolution du diffractogramme du D500 en fonction de la teneur en eau. 186

Figure 80 – Microtraction sur les fils et les films de dextrane commercial et branchés. a. Evolution du module d'Young E des fils en fonction du branchement ; b. Evolution de la contrainte σ à la rupture des fils en fonction du branchement ; c. Evolution de l'allongement ε à la rupture des fils en fonction du branchement ; d. Evolution du module d'Young E des films en fonction du branchement. 188

Figure 81 – Photos des différents matériaux fabriqués à partir des dextranes commercial et branchés a. Fils de dextranes (Unité : 100 µm) (1. dextrane commercial D500 ; 2. Fil D500-3B8 opaque ; 3. Rupture dans la colle du D500-3B21 ; 4. Présence de bulles dans le fil de D500-2B32) ; b. Films du dextrane commercial D500 (unité : 1 cm) 189

Figure 82 – Effet de la structure du dextrane commercial D500 thermomoulé sur les propriétés mécaniques. a. Evolution du module d'Young E, de la contrainte σ et de l'allongement ε à la rupture en fonction du matériau considéré ; b. Photos du thermoulé amorphe et semi-cristallin (unité : 0,5 cm). 191

Figure 83 – Elugrammes et masses molaires des dextranes produits par l'enzyme DSR-M. a. milieux de synthèse correspondant aux échantillons M-100Sy (bleu), M-3B47Sy (violet), M-2B34Sy (jaune), signal DRI (trait fin) et masse molaire (trait épais). b. échantillons M-3B47 (rouge) et M-2B34 (vert) et milieu de synthèse M-100Sy (bleu), signal DRI (trait fin) et masse molaire (trait épais). 200

Figure 84 – Concentration normalisée et masse molaire en fonction du rayon hydrodynamique calculé des échantillons M-100Sy (bleu), M-3B47Sy (violet), M-2B34Sy (jaune), M-3B47 (rouge) et M-2B34 (vert). 201

Figure 85 - Diffractogrammes du dextrane M-100 obtenu par diffraction des RX ainsi que les polymorphes haute température et basse température obtenus avec le dextrane D500 (*Chap. 4*). 203

Figure 86 – Caractéristiques thermiques des dextranes branchés obtenus à partir de l'enzyme DSR-M représentant la température de transition vitreuse T_g en fonction de la teneur en eau (superposition des données obtenues dans le *Chapitre 4*). 204

Figure 87 - Elugrammes de l'alternane montrant les trois signaux normalisés : diffusion de la lumière (bleu), réfractométrique (rouge) et UV (vert). 207

Figure 88 – Caractéristiques moléculaires de l'alternane en solution dans l'eau déterminées par AF4-UV-MALLS-DRI. a. Concentration normalisée et rayon de giration en fonction du volume d'élution. b. Concentration normalisée et masse

molaire en fonction du rayon hydrodynamique calculé. c. Rayon de giration en fonction de la masse molaire. d. Densité moléculaire apparente en fonction de la masse molaire. 209

Figure 89 – Images de microscopie électronique en transmission obtenues par séchage d'une suspension d'alternane à 2 $mg.mL^{-1}$ et coloration négative à l'acétate d'uranyle..... 210

Figure 90 - Distribution du diamètre des particules d'alternane réalisée à partir des images de MET (300 particules)..... 210

Figure 91 - a. Modèle d'encombrement d'une nanoparticule de phytoglycogène. La périphérie plus dense que le cœur est symbolisée par un cercle rouge, l'épaisseur de cette région est d'environ 3,3 nm (Huang *et al*., 2011). b. Modèle d'un grain d'amidon représentant la structure de l'amylopectine (noir) et de l'amylose (bleu) (Wang & Copeland, 2013). c. Image MET de phytoglycogène extrait de maïs (Putaux *et al*., 1999). d. Image MET d'amylopectine en suspension aqueuse après solubilisation et refroidissement à température ambiante et e. Observation d'un réseau d'amylopectine par MET après conservation 8 mois à 6 °C (Putaux *et al*., 2000). 213

Figure 92 – a. Paramètre de branchement g_i en fonction de la masse molaire de l'alternane (violet). b. densité d_{Gappi} en fonction de la masse molaire. (données supplémentaires : dextrane D3 (○) ; dextrane D5 (□) ; amylopectine (×) ; glycogène d'huître (◊) ; glycogène de foie de lapin (Δ) ; phytoglycogène (▲) (Rolland-Sabaté *et al*., 2008)). 215

Figure 93 - Propriétés rhéologiques de l'alternane à différentes concentrations à 25 °C. a. Comparaison des spectres mécaniques de l'alternane (vert) et du dextrane D1-3B37 (bleu) (*Chap. 3*) (bleu) présentant les modules conservatifs (G') et dissipatifs (G'') à 10% (p/v). b. Evolution des spectres mécaniques de l'alternane en fonction de la concentration (5%, 10%, 15%, 20% et 30%). 217

Figure 94 – Profil de diffraction des rayons X à gradient de température de 20 °C à 150 °C de l'alternane. 217

Figure 95 – Thermogramme de l'alternane obtenu par DSC entre 0 et 140 °C. 218

Figure 96 – Morceaux de film d'alternane préparés par casting à 40 °C. 219

Figure 97 - Caractéristiques moléculaires de deux *α*-glucanes produits par l'enzyme GS-X purifiée et non purifiée (A/GS-X : vert ; B/GS-X : bleu) en solution dans l'eau déterminé par AF4-MALLS-DRI. a. Signal de diffusion de la lumière à 90° et masse molaire en fonction du volume d'élution. b. Signal de diffusion de la lumière à 90° et rayon de giration en fonction du volume d'élution. c. Rayon de giration en fonction de la masse molaire d. Densité apparente en fonction de la masse molaire. 221

Figure 98 - Images de MET par coloration négative obtenus des solutions de A/GS-X (a, b) et de B/GS-X (c, d) à 2 $mg.mL^{-1}$. 222

Figure 99 - Propriétés rhéologiques des *α*-glucanes A/GS-X (vert) et B/GS-X (bleu). a. Spectre mécanique présentant les modules conservatifs (G') et dissipatifs (G'') avec une déformation appliquée de 2%. b. Viscosité η en fonction de la vitesse de cisaillement γ..... 223

Figure 100 - Diffractogrammes des échantillons A/GS-X (vert) et B/GS-X (bleu) obtenus par diffraction des rayons X. 224

Figure 101 - Thermogrammes obtenus entre 0 et 200 °C des échantillons A/GS-X (vert) et B/GS-X (bleu) conditionnés à RH 59%..... 224

Figure 102 – Propriétés mécaniques aux grandes déformations de films d'α-glucanes produits avec l'enzyme GS-X et obtenus par casting. a. A/GS-X. b. B/GS-X..... 225

Figure 103 - Spectre de diffraction des rayons X du mutane obtenu par GTF-J (rouge) et GTF-Si (orange)..... 227

Figure 104 – Thermogramme du mutane GTF-Si obtenu entre 0 et 120 °C. 227

Figure 105 - Rayons de giration en fonction de la masse molaire des *α*-glucanes dans l'eau..... 231

Figure 106 – a. Densité moléculaire apparente en fonction de la masse molaire. b. Paramètre de structure ρ en fonction de la masse molaire. dextrane D1-3B2 (gris), A/GS-X (vert), B/GS-X (bleu), alternane (violet), amylose (croix, Rolland-Sabaté *et al*., 2008)..... 233

Figure 107 – Température de transition vitreuse des polysaccharides étudiés en fonction de la teneur en eau. 235

Figure 108 – Images obtenues par microscopie d'un mélange dextrane/alternane (50/50) (p/p). a. Microscopie confocale sur une solution du mélange à 10% (p/v) au total dans l'eau. b. Microscopie optique d'un film de mélange obtenu par casting. 239

Figure 109 – Propriétés rhéologiques du dextrane (vert), de l'alternane (rouge) et du mélange dextrane/alternane (violet) à 20 % (p/v) présentant les modules conservatifs G' (symbole plein) et dissipatifs G'' (symbole creux). 240

Figure 110 - Thermogramme du film de dextrane/alternane (50/50) entre 0 et 150 °C. 240

Figure 111 - HPAEC-PAD chromatograms of the acceptor reaction media involving the following couples : ASR/maltooligosaccharides (A), DSR-M/Oligo-alternan (B), and ASR/isomaltooligosaccharides (C). Two controls are also presented below the acceptor reaction products, these being i) the enzyme with sucrose alone, and ii) the enzyme with the acceptor alone. Only chromatograms corresponding to the final reaction times are reported here. For the control 'enzyme + acceptor', it was verified that the chromatograms obtained at the initial and final reaction times were identical. 256

Figure 112 – HPAEC-PAD chromatograms of the copolymer synthesis reaction medium involving ASR and amylose (A), and ^{1}H NMR spectra of alternan-b-amylose and amylose (B). The chemical shifts at 5.45 ppm, 5.35 and 5 ppm were assigned to *α*(1→4), *α*(1→3), and *α*(1→6) linkages respectively. Rα and Rβ correspond to the anomeric signals of the reducing →4)-D-Glc*p* units. 257

Figure 113 - HPAEC-PAD and ^{1}H NMR analysis of the copolymer synthesis reaction media involving DSR-M and alternan: (A) HPAEC-PAD chromatograms and (B) ^{1}H NMR spectra of dextran-*b*-alternan and alternan. The chemical shifts at 5.35 and 5 ppm were assigned to the *α*(1→3) and *α*(1→6) linkages respectively. 259

Figure 114 - HPAEC-PAD chromatograms of the purified copolymer obtained from the DSR-M/alternan-b-amylose pair (A), and ^{1}H NMR spectra of dextran-*b*-alternan-*b*-amylose and alternan-*b*-amylose (B). The chemical shifts at 5.45 ppm, 5.35 and 5 ppm were assigned to *α*(1→4), *α*(1→3) and *α*(1→6) linkages respectively. Rα and Rβ correspond to the anomeric signals of the reducing –(1→4)-D-Glc*p* units. 260

Figure 115 - HPAEC-PAD chromatograms showing the difference in the retention times between *α*(1→4)-glucans (maltooligosaccharides and amylose) and *α*(1→6)-glucans (isomaltooligosaccharides). 261

Figure 116 - Examples of structural models proposed for the triblock copolymer dextran-*b*-alternan-*b*-amylose. 262

Figure 117 - SAXS curves of the purified triblock copolymer and its diblock and monoblock components. 262

Figure 118 – Thermogrammes obtenus par DSC de l'oligoalternane et du copolymère alternane-*b*-dextrane. 267

Figure 119 – Diffractogrammes du bloc oligoalternane et du copolymère alternane-*b*-dextrane. a. Etat natif des échantillons. b. Comparaison des diffractogrammes du dextrane D500 (*Chap. 4*) et du copolymère alternane-*b*-dextrane après traitement thermique à 165 °C. 268

Figure 120 – a. Diffractogrammes du bloc oligoamylose et du copolymère amylose-*b*-alternane à l'état natif. b. Zone polysaccharidique des spectres ^{13}C CP-MAS annotés de l'amylose et du copolymère amylose-*b*-alternane. 269

Figure 121 - Spectres ^{13}C CP-MAS de : a. l'amylose lot 2 et b. copolymère amylose-*b*-alternane. (a) spectre déconvolué. (b) spectre expérimental (points rouges) et somme de la déconvolution (trait plein). (c) attribution des différents pics du massif C_1. 270

Figure 122 - Thermogrammes obtenus par DSC de l'oligoamylose et du copolymère amylose-*b*-alternane. 272

Figure 123 – Diffractogrammes du bloc oligoamylose et du copolymère amylose-*b*-alternane montrant l'évolution de la cristallinité du copolymère amylose-*b*-alternane en fonction de la teneur en eau de l'échantillon. 272

Figure 124 - Courbes de dégradation thermique obtenues par analyse thermogravimétrique des échantillons du lot 2. Perte de masse en fonction de la température (de 25 °C à 800 °C à 10 °C.min^{-1}). 273

Figure 125 - Images obtenues par microscopie électronique à balayage du bloc amylose et du copolymère amylose-*b*-alternane. a. oligoamylose lot 1. b. copolymère amylose-*b*-alternane lot 1. c. oligoamylose lot 2. b. copolymère amylose-*b*-alternane lot 2. 274

Figure 126 - Images obtenues par microscopie électronique à balayage du tribloc amylose-*b*-alternane-*b*-dextrane à deux grossissements différents. 275

UNIVERSITE ECOLOGIE
BRETAGNE GEOSCIENCES
LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

UNIVERSITÉ DE NANTES

Titre : Structure et propriétés de polysaccharides et de copolymères biosourcés obtenus par synthèse enzymatique

Mots clés : Alpha-glucanes, caractérisation structurale, fractionnement par couplage flux-force, propriétés thermiques et hygromécaniques, biocopolymères.

Résumé : Grâce à leur empreinte carbone limitée, les polysaccharides constituent des alternatives aux polymères issus du carbone fossile. Ces macromolécules, généralement biodégradables, biocompatibles et très hydrophiles ont des propriétés mécaniques souvent insuffisantes pour des applications dans le domaine des matériaux de structure. En revanche, leur sensibilité naturelle à l'eau et leur biocompatibilité peuvent être mises à profit dans des applications à haute valeur ajoutée, par exemple dans des matériaux stimulables ou des matériaux à usage biomédical. Le projet vise à produire des copolymères diblocs constitués uniquement de polysaccharides en combinant la glyco-enzymologie et l'ingénierie des protéines. Le but est d'obtenir de nouvelles propriétés en associant les propriétés intrinsèques des blocs constitutifs. Ainsi, une grande partie du travail a porté sur la détermination des relations entre la structure et les propriétés d'un large panel d'alpha-glucanes de synthèse, et notamment sur le rôle du type et/ou du taux de liaisons osidiques constituant la chaîne principale ou les branchements. Cette approche a permis de cibler les blocs constitutifs de copolymères originaux. Une large gamme de techniques a été utilisée afin de caractériser la structure, le comportement des molécules en solution et des matériaux formés. Ainsi ce travail fait l'objet d'avancées majeures dans la compréhension des relations structure/conformation/propriétés des polysaccharides.

Title : Relationships between structure and properties of polysaccharides and biocopolymers obtained by enzymatic synthesis

Keywords : Alpha-glucans, structural characterization, asymmetrical flow field-flow fractionation, thermal and hygromecanical properties, biocopolymers.

Abstract : Due to their limited carbon footprint, polysaccharide-based materials are attractive alternatives to fossil carbon based polymers. These macromolecules, which are generally biodegradable, biocompatible and highly hydrophilic present mechanical properties that are still insufficient for applications in the field of structural materials or most non-food uses. However, their natural sensitivity to water and their biocompatibility can be used in applications with high added value, for example stimulable materials or materials for biomedical use. The project aims to produce diblock copolymers only consists of polysaccharides by combining glyco-enzymology and protein engineering. The objective is to obtain new properties by associating the intrinsic properties of the building blocks. Therefore, much of this work has focused to determine and understand the relationships between the structure and the properties of a large panel of synthetic alpha-glucans, including the role of the type and/or the rate of osidic linkages in the main chain or in branching. This approach has made it possible to target the constituent blocks of original copolymers. A wide range of techniques has been used to characterize the structure, the behaviour of molecules in solution and the materials formed. Thus, this work is the subject of major advances in the understanding of the structure / conformation / properties relations of polysaccharides.